

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE**  
*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*  
**DE LEITE BOVINO**

**BELAMI CASSIA DA SILVA**

**2007**

**BELAMI CASSIA DA SILVA**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus* e  
*Streptococcus agalactiae* DE LEITE BOVINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação “Stricto Sensu” em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora  
Prof<sup>a</sup> Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Belami Cassia da.

Isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus* e  
*Streptococcus Agalactiae* de leite bovino / Belami Cassia da Silva. –  
Lavras: UFLA, 2007  
49 p.: il.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli  
Dissertação (Mestrado) – UFLA.  
Bibliografia.

1. Leite cru. 2. Mastite 3. *Streptococcus agalactiae* 4.  
*Staphylococcus aureus*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

**BELAMI CASSIA DA SILVA**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E  
*STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* DE LEITE BOVINO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2007

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

UFLA

Prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra Maria Pinto

UFLA

Prof. Dr. Alexandre Tourino Mendonça

UNINCOR

Prof.<sup>a</sup> Roberta Hilsdorf Piccoli  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida e por todas as graças alcançadas.

À minha orientadora Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli pela orientação durante este trabalho, pela paciência, ensinamentos e confiança depositada.

Ao Prof. Geraldo Marcio da Costa pela amizade, orientação e colaboração constante.

Ao Prof. Luiz Ronaldo de Abreu pela efetiva participação na realização desta dissertação.

A minha querida família, em especial ao meu pai Luiz Paulo, minha mãe Sônia e meus irmãos Luiz Carlos e Cristiane, não há palavras suficientes para descrever o amor que sinto por vocês, esta conquista é nossa.

Ao meu namorado Nélio, meu bem muito obrigada pelo apoio, carinho e compreensão com que está sempre ao meu lado. E a toda sua família que sempre me apoiou com uma atenção especial.

Aos amigos que tiveram uma participação fundamental, pela convivência, conselhos e ensinamentos. Agradeço a Deus por ter colocado pessoas como vocês em meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade do curso de Pós-graduação em Ciência dos alimentos.

A todos os professores do Departamento de Zootecnia, Ciência dos Alimentos e Medicina Veterinária pela formação acadêmica e apoio.

A todos os estagiários e bolsistas de iniciação científica dos Laboratórios de Microbiologia, Físico-química e Bacteriologia pelo grande auxílio nas análises realizadas.

Aos funcionários das secretarias e da limpeza, do Departamento de Ciência de Alimentos, pela ajuda e amizade, e aos laboratoristas pela colaboração na realização das análises.

Aos produtores rurais das cidades de Aguanil, Boa Esperança, Candeias, Campo Belo, Coqueiral e Nepomuceno que participaram deste projeto agradeço de forma muito especial por disponibilizarem seus rebanhos para a realização do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

A Empresa Mineira de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER-MG) e a Cooperativa Agropecuária de Boa Esperança (CAPEBE), pelo apoio recebido.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Leite cru: microbiota epifita e contaminante.....	3
2.2 Legislação.....	4
2.3 Mastite.....	5
2.3.1 Patógenos principais da mastite.....	6
2.3.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	6
2.3.1.2 <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	8
2.4 Células somáticas no leite.....	9
2.5 Composição do leite com relação a mastite.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Amostragem.....	16
3.2 Análises microbiológicas.....	16
3.2.1 Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos.....	16
3.2.2 Quantificação e identificação bioquímica de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
3.2.3 Quantificação e identificação bioquímica de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	17
3.3 Análises físico-químicas.....	18
3.3.1 Acidez titulável.....	18
3.3.2 Gordura.....	18
3.3.3 Densidade.....	18
3.3.4 Proteína.....	18

3.3.5 Sólidos totais e desengordurados.....	18
3.3.6 Cloreto de Sódio.....	18
3.3.7 Lactose.....	19
3.3.8 Contagem de células somáticas.....	19
3.4 Análise estatística.....	19
3.4.1 Análise de Variância.....	19
3.4.2 Teste de hipótese para duas proporções.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Análises físico-químicas do leite.....	21
4.1.1 Cloretos.....	22
4.1.2 Lactose.....	23
4.1.3 Proteína bruta e verdadeira.....	24
4.1.4 Células somáticas.....	25
4.2 Análises microbiológicas do leite.....	28
4.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
4.2.2 <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	32
4.2.3 Aeróbios mesófilos.....	34
5 CONCLUSÃO.....	37
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXOS.....	47

## RESUMO

SILVA, Belami Cassia. **Isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* de leite bovino.** 2007. 49p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

Com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru de propriedades rurais da micro região de Lavras-MG, foram analisadas amostras de leite provenientes de 25 rebanhos, coletadas de latões, realizou-se análises microbiológicas como Contagem Total de Aeróbios Mesófilos, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, análises físico-químicas: densidade, acidez titulável, gordura, proteína, sólidos totais e desengordurados, cloreto de sódio, lactose e contagem de células somáticas. Não houve correlação entre a contagem de células somáticas e as demais variáveis físico-química. Para as variáveis densidade, acidez, gordura, sólidos totais e desengordurados os resultados encontrados foram estatisticamente iguais nas diferentes estações analisadas. Os teores de cloretos, proteína bruta e verdadeira foram estatisticamente diferentes. Quanto à lactose seus teores foram considerados baixo para vacas sadias. O *Staphylococcus aureus* foi o agente contagioso da mastite mais isolado devido facilidade de disseminação durante todo o processo de ordenha, diferentemente do *Streptococcus agalactiae* que é um patógeno estritamente contagioso. A contagem de Aeróbios Mesófilos apresentou-se acima do permitido pela legislação em 90% das propriedades. Quanto à contagem de células somáticas obtiveram-se comportamentos distintos nas diferentes épocas do ano. Conclui-se que a qualidade do leite pode ser significativamente melhorada por meio de assistência técnica aos produtores e sanificação adequada dos latões e utensílios de ordenha, propiciando melhor ambiente para a ordenha, resfriando o leite na fazenda e promovendo seu transporte rápido.

---

\* Comitê de Orientação: Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Orientadora); Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA

## ABSTRACT

SILVA, Belami Cassia. **Isolation and Identification of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* of the milk bovine.** 2007. p 49. Dissertation (Master Program in Food Sciences) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais-Brazil.\*

The objective of this work was to evaluate the microbiologic and physicochemical quality of raw milk of rural properties of the micro-region of Lavras-MG. Milk samples coming from 25 herds collected from cans were analyzed, microbiological analysis such as total count of mesophyll aerobes, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*, physicochemical analyses: density, titrable acidity, fat, protein, total and non-fat solids, sodium chloride, lactose and count of somatic cells. There was not correlation between the somatic cell count and the other physicochemical variables. For the variables density, acidity, fat, total and non-fat solids, the results found were statistically equal in the different analyzed seasons. The contents of chlorites, crude and true protein was statistically different. As regards lactose, its contents were considered low for healthy cows. *Staphylococcus aureus* was the most isolated contagious mastitis agent due to the ease of dissemination during all the milking process, differently from *Streptococcus agalactiae* which is a strictly contagious pathogen. The count of mesophyll aerobes proved to be above the one allowed by the legislation at 90% of the farms. Concerning the count of somatic cells, distinct behaviors in the different seasons of the year were obtained. It follows that milk quality can be significantly improved by means of technical assistance to the farmers and adequate sanitization of milking can and utensils, enabling improved environment for milking, cooling milk on the farm and promoting its fast transportation.

---

\* Guidance Committee: Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Adviser); Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu -UFLA

## 1 INTRODUÇÃO

Em Janeiro de 2006 entrou em vigor a INSTRUÇÃO NORMATIVA nº51 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2002). O antes denominado “Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite”, que tinha como objetivo implementar várias mudanças na legislação brasileira no que se refere à qualidade do leite passou por consulta pública e, após algumas alterações transformou-se na referida instrução. Devido às normas mais rigorosas, existe grande temor daqueles que trabalham na cadeia produtiva de leite e que se preocupam com a sobrevivência da pequena produção leiteira. Tal preocupação concentra-se no fato de que aqueles que obtém volume de leite abaixo de quantidades que permitam maiores investimentos, pois sua renda mensal não é suficiente, não teriam melhora da qualidade do leite obtido em sua propriedade, por consequência sendo excluídos do mercado.

Da mesma forma, muitos pequenos produtores desconhecem as condições higiênico-sanitárias adequadas para a obtenção de leite de boa qualidade, o que os leva a ter perdas mensais do produto com consequente diminuição de renda. Assim, certos procedimentos devem ser seguidos para garantir sua chegada com qualidade na indústria. Estes procedimentos começam com cuidados com o estado de saúde da vaca, limpeza e sanificação adequada de vasilhames e equipamentos, cuidados na ordenha, limpeza do local de ordenha, dentre outros. Para evitar perdas o leite deve ser refrigerado e transportado até a indústria para ser processado.

As principais mudanças que a Instrução Normativa nº51 trouxe é a adoção de parâmetros de qualidade como mudanças na contagem bacteriana total, a contagem de células somáticas, ausência de resíduos de antibióticos, entre outros. A adaptação dos produtores a esta nova lei será feita de forma

gradual até atingir os níveis finais de requerimento em um prazo de sete anos após sua entrada em vigor.

Um dos problemas que mais tem afetado a atividade leiteira quanto à qualidade do leite advém da mastite, doença essa que acarreta diminuição na produção e alterações principalmente na qualidade microbiológica e físico-química do leite. E a sua prevalência é um dos maiores fatores que determina a rentabilidade de uma fazenda. O leite proveniente de vacas com mastite também traz risco a saúde pública pelo fato de poder veicular agentes patogênicos e conter resíduos de antibióticos usados nos tratamentos desses animais. Além disso, a sua composição química é alterada devido à diminuição na concentração de proteína principalmente a caseína, sólidos totais e teor de gordura. Certos componentes como sódio e cloretos passam mais livremente do sangue para o leite nas vacas com mastite causando diminuição da acidez do leite e com a elevada concentração de cloretos diminui a concentração de lactose para compensar a maior pressão osmótica do leite em relação ao sangue.

Tais informações mostram alguns dos prejuízos causados pela mastite reduzindo o valor nutritivo do leite, levando a cadeia produtiva do leite a se preocupar com a qualidade desse.

Neste cenário, foi proposto realizar este trabalho com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica, isolando e identificando (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*) os principais agentes etiológicos da mastite e a qualidade físico-química do leite cru refrigerado, observando também o comportamento nas diferentes estações do ano.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Leite cru: microbiota epífeta e contaminante

Entende-se por leite sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (Brasil, 2002).

De acordo com Cousins & Bramley (1987), o leite é um meio de cultura ideal para os microrganismos em geral, pois apresenta uma composição quase perfeita como alimento. Assim a multiplicação dos microrganismos é muito rápida, se a temperatura for ideal para seu crescimento.

Segundo Oliveira (1976), as alterações observadas no leite, decorrentes da ação dos microrganismos, são variáveis, dependendo principalmente do tipo de microrganismo presente. Em geral, no desenvolvimento da microbiota presente, são decompostos um ou mais componentes do leite, levando a alterações das características físicas e organolépticas do produto, sendo que estas alterações serão percebidas mesmo após o tratamento térmico.

A microbiota do leite pode ser dividida em 3 grupos de microrganismos: mesófilos, psicrotróficos e termófilos/termodúricos. No grupo dos mesófilos se inclui a maioria dos contaminantes do leite, neste importante grupo está a maioria dos microrganismos acidificantes e que se desenvolvem a temperaturas entre 20 e 45°C, com tempo ótimo em torno de 30 a 40°C (Jay, 2005). Além disso, vários gêneros desses microrganismos são termorresistentes, pois o microrganismo não sobrevive a altas temperaturas, mas sua toxina sim.

A qualidade do leite *in natura* é influenciada por muitas variáveis, entre as quais destacam-se fatores zootécnicos associados ao manejo, alimentação, potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados á obtenção e

armazenamento do leite. Uma das causas que exerce influência extremamente prejudicial sobre a composição e as características físico-químicas do leite, é a mastite, acompanhada por um aumento na contagem de células somáticas no leite (Kitchen, 1981).

Tudo começa no momento da ordenha quando esta é realizada sem obedecer aos preceitos de higiene adequados. O próprio ordenhador é importante fonte de contaminação do produto. Ainda tem os equipamentos, a água utilizada para higienização dos equipamentos, o tempo decorrido entre a ordenha e o recolhimento do leite pelos caminhões, não isotérmicos, que levarão o produto até a estação de resfriamento ou usina de pasteurização, e que costuma variar de 4 a 7 horas (Wilson, 1977).

## **2.2 Legislação**

O setor leiteiro passa por transformações devido a preocupação mundial na obtenção de matéria prima de qualidade na propriedade rural e na indústria, e de um produto seguro e saudável na mesa do consumidor, sendo assim as novas regulamentações obedecidas no Brasil desde julho de 2005, exigem que todo o leite cru, recebido em laticínios sob Inspeção Federal, seja analisado mensalmente, apresentando padrões mínimos de qualidade de acordo com a Instrução Normativa 51/2002 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2002).

Para a Instrução Normativa nº51, a composição e requisitos físicos, químicos e microbiológicos do leite cru refrigerado, tipos “A e B” Integral e do leite pasteurizado tipos “A e B” são: gordura g/100g (min.3,0); acidez em g de ácido láctico/100mL (0,14 a 0,18); densidade relativa 15/15°C g/mL (1,028 a 1,034); índice crioscópico (max. -0,530°H); proteína em g/100g (min. 2,9); índice de refração do soro cúprico a 20°C (min. 37°Zeiss); sólidos não gordurosos g/100g (min. 8,4); contagem padrão em placas em UFC/mL (max.

8,0.10<sup>4</sup> ) e contagem de células somáticas/mL (max. 6.10<sup>5</sup>). Para o leite cru refrigerado tipo “C”, são relacionados os mesmos requisitos, com exceção da contagem padrão em placas que é aceitável no máximo 1,0. 10<sup>6</sup> UFC/mL e a contagem de células somáticas 1,0. 10<sup>6</sup> cél/mL.

### **2.3 Mastite**

A mastite é o processo inflamatório da glândula mamária acompanhada da redução de secreção de leite e mudança de permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue, é caracterizada por alterações físico-químicas e, em geral, bacteriológicas do leite. As alterações mais importantes são descoloração, presença de coágulo e grande número de leucócitos (Blood & Radotits, 1991; Machado et al., 1998).

É uma doença extremamente complexa que resulta em acentuada redução do leite sintetizado, e em mudanças nos níveis dos componentes específicos do leite, reduzindo a qualidade do leite total (Harmon, 1994; Platonow et al., 1970).

A mastite pode ser dividida em dois grandes grupos, quanto à sua forma de manifestação. Em uma delas é possível constatar sintomas visíveis, como alterações no úbere e no leite secretado. A glândula mamária fica inchada, intumescida e quente, o leite se apresenta com grumos ou flocos. Esta é a chamada mastite clínica, a qual pode provocar perda de apetite, alterações inflamatórias no úbere, caracterizadas por hiperemia e congestão, dor, edema e hipertermia local. Muitas vezes estão acompanhadas de distúrbios sistêmicos, como febre, anorexia, toxemia e levando até a morte do animal (Veiga & Ribeiro, 1992). A maior parte dos casos da doença não apresenta tais sintomas visíveis, a não ser redução na produção do leite, denominada de mastite subclínica, esta se espalha mais facilmente pelo rebanho. Estima-se que para

cada caso de mastite clínica existam pelo menos 20 outros casos de mastite subclínica (Smith et al., 1985).

A mastite subclínica é o principal elemento na perda econômica mundial associada à mastite bovina. O controle da mastite não só tem importância devido as grandes perdas econômicas para o produtor que tem uma parcela de prejuízo gastando com medicamentos, leite descartado, serviços veterinários e descarte prematuro de animais, como também para a indústria láctea devido a resíduos de antibióticos e as alterações na composição química do leite, e para o consumidor, pois ocorre perda da qualidade nutritiva e higiênica do leite (Costa et al., 1999).

Segundo Müller (1999), um bom programa de controle deve ter como metas principais, erradicar as mastites contagiosas por *S. agalactiae*, controlar aquelas por *S. aureus*, manter baixos os índices de mastites ambientais, diminuir a contagem de células somáticas para valores abaixo de 200.000 cél/mL de leite, redução abaixo de 2% de episódios clínicos ao mês e 85% de vacas livres de mastite subclínica.

Neste contexto a mastite subclínica pode ter impacto substancial na quantidade e qualidade do leite produzido. O nível de controle dos rebanhos e os programas de erradicação têm mostrado ter custos efetivos. Existe contínua necessidade de aumentar a capacidade de diagnosticar e melhorar o susceptível nível dos rebanhos, assim os rebanhos infectados podem ser notificados do seu estado de maneira oportuna (Keefe, 1997).

### **2.3.1 Patógenos principais da mastite**

#### **2.3.1.1 *Staphylococcus aureus***

Dentre os diversos tipos de microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos pelo leite e derivados destaca-se o *S. aureus* e *S. agalactiae*, que

são patógenos contagiosos da mastite e grandes reservatórios infecciosos, sendo disseminados entre as vacas durante o processo de ordenha (Eberhart et al., 1987; Hillerton, 1996).

Neave et al. (1969), citam que 90% das mastites são causadas por bactérias, principalmente *S. aureus* e bactérias do gênero *Streptococcus*. Além destes patógenos também podem ocorrer mastites causadas por fungos, leveduras, algas (Blood & Radotits, 1989) e vírus, porém as mastites causadas por este último patógeno são extremamente raras (Guidry, 1985).

O *Staphylococcus aureus* é classificado como microrganismo mesófilo, porém pode apresentar crescimento em temperaturas compreendidas entre 7,0 e 47,8°C, são cocos Gram positivos, coagulase positivos,  $\beta$ -hemolíticos, maltose e manitol positivos e formadores de colônias pigmentadas (Jay, 2005). Destaca-se como microrganismo causador de mastite contagiosa de maior importância e de maior ocorrência nos rebanhos mundiais, é também o microrganismo patogênico mais frequentemente isolado no leite cru (Zecconi & Hahn, 2000).

É importante esclarecer que o *S. aureus* é um microrganismo que está envolvido em infecções intramamárias de fêmeas em lactação. Sendo o principal agente causador de mastite em bovinos, capaz de produzir grande variedade de toxinas extracelulares, além de apresentar grande resistência aos antimicrobianos existentes (Matsunaga et al., 1993). Como patógeno intracelular, muitos estudos *in vitro* mostram a sua internalização e sobrevivência em macrófagos e células alveolares. Sugere-se, assim, que este processo de internalização explique o porque do sistema imune ser ineficiente e o porque do tratamento com antibióticos ser, muitas das vezes, falho ao eliminar este patógeno (Almeida et al., 1996; Hébert et al., 2000).

Este microrganismo pode causar toxinoses alimentares pela ingestão de toxinas termoestáveis produzidas nos alimentos, desencadeando severos processos de gastroenterites principalmente em crianças e idosos (Melchíades et

al. 1993). A formação efetiva de toxinas requer contagens elevadas de microrganismos por mililitro ou grama do produto, aproximadamente  $10^5$  a  $10^6$  UFC, pH  $\geq 5,0$  e temperaturas acima de  $10^\circ\text{C}$ . A pasteurização pode destruir a bactéria, mas não inativa sua toxina termorresistente (IDF, 1994).

### 2.3.1.2 *Streptococcus agalactiae*

Em 1889, Nocard e Mollereau isolaram “*Streptococcus nocardii*”, mais tarde renomearam *Streptococcus agalactiae*, numa investigação original da causa da mastite bovina. Anterior ao uso da penicilina, pesquisas colocavam que 90% de toda mastite bovina eram causadas por *Streptococcus* (Schalm et al., 1971 citado por Keefe, 1997).

Os estreptococos pertencem à família Streptococaceae, gênero *Streptococcus* e são cocos gram-positivos geralmente dispostos aos pares ou em cadeias, anaeróbios facultativos ou estritos, catalase negativos (Bier, 1990). Três espécies são mais frequentemente identificadas como causadoras da mastite, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e o *Streptococcus uberis*, sendo o *Streptococcus agalactiae* o mais prevalente (Almeida & Oliver, 1995; Fernandes, 1992).

*Streptococcus agalactiae* é uma bactéria encontrada principalmente no interior da glândula mamária, podendo sobreviver por longo período na glândula e é susceptível a terapia com penicilina, a erradicação é possível dentro de um rebanho fechado (McDonald, 1977).

Pode também ser isoladas de superfícies com leite contaminado, tais como insufladores e mãos dos ordenhadores. A infecção por esse agente manifesta-se, na grande maioria das vezes, na forma subclínica. Em termos de patogenia, esse agente também tem a propriedade de fixar-se nas células epiteliais do interior da glândula mamária, porém geralmente, o quadro

inflamatório é leve, ocorrendo forte edema, rubor ou endurecimento da glândula (Fonseca, 2000).

Do ponto de vista do diagnóstico e controle, é extremamente importante diferenciar *S. agalactiae* dos demais. Isto porque este microrganismo por ser suscetível a antibióticos, sendo facilmente erradicado dos rebanhos, enquanto as outras espécies não podem e não respondem as mesmas medidas de prevenção e controle (Brito & Brito, 1999).

#### **2.4 Células somáticas no leite**

Células somáticas são células da vaca presentes no leite. Normalmente são células de defesa do organismo, chamadas de leucócitos, sendo predominante, neutrófilos polimorfonucleares (Bervenich et al. 1995, citado por Brito et al. 1997), seguidos por macrófagos e linfócitos (Harmon, 1994), que migram do sangue para o interior da glândula mamária com o objetivo de combater agentes agressores, podendo ser também células secretoras descamadas. Esta migração de leucócitos é resultado da ocorrência da mastite (Machado et al., 1999).

A ocorrência de mastite é mais comum em propriedades que não adotam o manejo sanitário eficaz, com práticas higiênicas na obtenção do leite. A contagem de células somáticas (CCS) é um dos parâmetros mais utilizados na detecção de mastite e na avaliação da qualidade do leite.

Cerca de 25 anos atrás, iniciou-se o uso rotineiro da contagem de células somáticas (CCS) como método indireto para detecção de infecções intramamárias, tornando-se em seguida uma análise padrão para monitoramento da qualidade do leite de tanque. Para dar suporte analítico aos regulamentos técnicos, foi criada em Abril de 2002 a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade (RBQL), com a criação desses laboratórios especializados em controle de qualidade do leite no Brasil, houve

disponibilidade de estrutura de equipamentos para o monitoramento da CCS de rebanhos leiteiros para as indústria e produtores (<http://www.milkpoint.com.br>) (Milkpoint, 2006).

Durante a infecção e inflamação são expressas moléculas de adesão e os neutrófilos polimorfonucleares margeiam ou aderem ao endotélio dos capilares sanguíneos, passando entre as células destes. Mensageiros químicos ou agentes quimioatraentes liberados de leucócitos presentes no leite ou de tecidos danificados atraem grande número de neutrófilos polinucleares para o leite, resultando em aumento do número de células somáticas (Harmon, 1994).

Vários são os testes que se podem realizar no leite para detecção da mastite. Com o objetivo de detectar a mastite clínica podemos citar o Tamis ou teste da caneca de fundo preto que é utilizado ao pé do animal antes de se iniciar a ordenha, facilitando a observação de grumos, pus, filamentos e soro quando desprezados os primeiros jatos de leite (Radotits et al., 1994). Quando não existem sinais evidentes da doença, não é possível diagnosticá-la sem utilização de testes auxiliares. Dessa forma o sinal clássico da mastite subclínica é a elevação da contagem de células somáticas (CCS) e os testes auxiliares para diagnóstico desta são CMT (Califórnia Mastitis Test), o WMT (Wisconsin Mastitis Test) e a CECS (Contagem Eletrônica de Células Somáticas) (National Mastitis Council, 1996).

Esses testes podem detectar tanto os microrganismos infectantes (direta ou indiretamente) ou alterações na secreção láctea em consequência da inflamação. As análises bacteriológicas têm a vantagem de serem positivas ou negativas, ao passo que muitos testes necessitam da determinação de um valor limite que pode variar entre animais e rebanhos. Além disso, possibilitam a identificação do microrganismo causador da infecção, e testam a sensibilidade aos antimicrobianos. As desvantagens das análises bacteriológicas são os custo, complexidade e tempo gasto na sua execução (Bramley, 1991).

A medida da CCS é fácil e de baixo custo quando comparada com testes bacteriológicos para mastite, ela tem sido utilizada para monitorar a saúde da glândula indicando animais infectados ou não. O valor de corte utilizado para se classificar a glândula como sã ou mastítica é 283.000 células somáticas por mL de leite, sendo 80% eficiente nesta classificação (Reneau, 1986).

## 2.5 Composição do leite com relação à mastite

As Infecções da glândula mamária por bactérias patogênicas resultam numa diminuição da produção de leite e mudanças na sua composição como apontam a Tabela 1, que variam com a intensidade e duração da infecção (Eberhart et. al., 1987 citado por Harmon, 1994).

TABELA 1 Comparação dos componentes do leite produzido por vacas com mastite subclínica e por vacas sadias.

<b>Componentes</b>	<b>Composição (%) leite normal</b>	<b>Composição (%) leite de vacas com mastite subclínica</b>
Gordura	3,5	3,2
Lactose	4,9	4,4
Proteína total	3,61	3,56
Caseína	2,8	2,3
Proteínas do soro	0,8	1,3
Albumina sérica	0,02	0,07
Lactoferrina	0,02	0,1
Imunoglobulinas	0,1	0,6
Sódio	0,057	0,105
Cloreto	0,091	0,147
Potássio	0,173	0,157
Cálcio	0,12	0,04

Fonte: NATIONAL MASTITIS COUNCIL (1996)

TABELA 2 Alterações no leite e produtos lácteos associado ao aumento de células somáticas.

<b>Produto</b>	<b>Alterações</b>
Leite Cru	Desenvolvimento de rancidez; menor estabilidade ao calor de proteínas do soro.
Leite Pasteurizado	Redução do “flavour” e vida de prateleira.
Queijos	Redução da atividade das culturas “starter”, mudança do tempo de coagulação; redução da firmeza do coágulo; perdas de gordura e caseína com o soro; redução da produção (rendimento).
Manteiga	Alterações do “flavour” sabor oxidado e maior tempo de bateção

Fonte: Brito, 1999.

A mudança da composição do leite vem acompanhada da elevação da contagem de células somáticas, influenciando negativamente na atividade enzimática, no tempo de coagulação enzimática e na qualidade dos derivados lácteos (Philpot, 1967; Kitchen, 1981). Algumas mudanças no leite e na qualidade dos produtos lácteos podem ser observadas na Tabela 2.

Além do aumento do número de células, a mastite provoca alterações nos três principais componentes do leite, gordura, proteína e lactose. A extensão do aumento da CCS e as mudanças na composição do leite estão diretamente relacionadas com a superfície do tecido mamário atingido pela reação inflamatória. Portanto há uma relação direta entre a CCS e a concentração dos componentes do leite (Schaeffli, 2000).

A mastite ou a elevada contagem de células somáticas estão associadas com o decréscimo da lactose,  $\alpha$ -lactoalbumina, e gordura no leite devido à

redução da atividade de síntese do tecido mamário. Embora o conteúdo da proteína total possa sofrer poucas mudanças, os tipos de proteínas presentes mudam drasticamente. O conteúdo de caseína, a maior proteína do leite de alta qualidade nutricional, declina, abaixando a qualidade dos produtos lácteos e ocorre aumento das proteínas do soro. As proteínas do soro como albumina, imunoglobulinas, transferrinas, dentre outras passam para o leite devido às mudanças na permeabilidade vascular (Kitchen, 1981).

À medida que a CCS aumenta ocorre uma diminuição da caseína como porcentagem da proteína total do leite, ocorrendo juntamente um aumento da atividade enzimática, promovendo maior ativação do plasminogênio em plasmina (Sharma & Randolph, 1974). Plasminogênio é o precursor inativo da plasmina, que normalmente ocorre no plasma. Depois de uma série de clivagens proteolíticas, o plasminogênio é convertido a forma ativa da plasmina (Verdi & Barbano, 1991). A ativação pode ocorrer no lúmen dos alvéolos, ou antes, do processo de duração de síntese do leite.

A plasmina já é uma protease natural do leite e a maior parte desta enzima encontra-se no leite sob a forma de seu precursor, plasminogênio. Como a temperatura ideal para atuação da plasmina é próxima a temperatura corporal da vaca, a maior parte do dano provocado por sua atividade proteolítica na caseína ocorre no úbere (Matioli, 2005).

Esta protease natural promove proteólise principalmente da caseína e, mais especificamente, na K-caseína e na  $\beta$ -caseína, alterando a composição protéica do leite e diminuindo o rendimento na fabricação de queijos como o prato e ricota. Porém a plasmina é relativamente resistente ao calor, sendo assim se o leite for resfriado rapidamente após a ordenha, os efeitos negativos no rendimento são considerados reduzidos (Matioli, 2005).

Por causa da forte relação entre algumas mudanças inflamatórias e composicionais no leite e a presença de infecção, a medida de certos

componentes tem sido usada para monitorar a saúde do úbere e, assim, a qualidade do leite. A provável contagem de células somáticas do leite tem sido mais amplamente usada mundialmente como medida de qualidade do leite, desde do desenvolvimento da rápida técnica eletrônica de contagens de células (Kitchen, 1981).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido juntamente com a EMATER/MG regional de Lavras, as amostras de leite provenientes de seis municípios: Aguanil (1), Boa Esperança (8), Campo Belo (7), Candeias (2), Coqueiral (5) e Nepomuceno com duas propriedades.

A coleta das amostras foi baseada na primeira ordenha do dia, sendo que em todas as propriedades os animais foram ordenhados manualmente e esta ordenha feita na maioria dos estabelecimentos em currais de alvenaria, com condições higiênicas inadequadas. Os produtores na maior parte das vezes retiravam leite com bezerro ao pé, sem lavagem e desinfecção do úbere antes e após a ordenha.

As coletas foram realizadas em três períodos do ano. Sendo uma primeira coleta realizada nos meses de março a abril de 2006, a segunda coleta nos meses de agosto a setembro de 2006 e a terceira coleta durante os meses de outubro a novembro de 2006, compreendendo as estações Outono, Inverno e Primavera. O leite era coletado do latão presente nas referidas propriedades, fazendo-se uma amostra composta de uma ordenha e coletado assepticamente 350 mL da amostra em um frasco estéril que foi identificado e imediatamente transportada aos Laboratórios em caixas isotérmicas com gelo, para preservar a temperatura e as condições bacteriológicas idênticas às que tinham no momento da amostragem.

Posteriormente as amostras foram analisadas nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Laticínios do Departamento de Ciência dos Alimentos e de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### 3.1 Amostragem

Inicialmente foi determinado o tamanho da amostra por meio de um processo de amostragem aleatória simples para proporção, ou seja, das 310 propriedades rurais cadastradas foram selecionadas apenas 25; sendo a expressão (1) utilizada para o dimensionamento da amostra (Triola, 2005):

$$n = \frac{(z_{\alpha/2})^2 \hat{p}(1-\hat{p})}{e^2} \quad (1)$$

em que foram considerados:

$z_{\alpha/2} = 1,96$  (grau de confiança de 95%);

$e = 0,2$  (erro máximo da estimativa);

$\hat{p} = 0,5$  (proporção amostral).

### 3.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, segundo as metodologias propostas pelo “International Commission on Microbiological Specification for Foods Method” (ICMSF, 2000) e por Silva et al. (1997).

#### 3.2.1 Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos

Os microrganismos aeróbios mesófilos foram quantificados pelo método de plaqueamento em profundidade, utilizando Plate Count ágar (PCA), sendo as placas inoculadas sempre em duplicata. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 37°C, por 24-48 horas. Após o período de incubação realizaram-se as contagens (Silva et al., 1997).

### **3.2.2 Quantificação e identificação bioquímica de *Staphylococcus aureus***

Foram feitas diluições seriadas até a diluição  $10^{-5}$ . De cada diluição inicial retirou-se com o auxílio de uma pipeta, uma alíquota de 0,1 mL que foi distribuída nas placas pelo método de plaqueamento em superfície (*spread plate*), utilizando a alça de drigalski, o plaqueamento foi feito em duplicata contendo o meio seletivo indicador ágar Baird-Parker (BP), sendo as placas incubadas a 37°C por 24-48 horas após a absorção da amostra pelo meio. Após incubação e leitura, foram coletadas 5% de colônias típicas, isto é, de cor negra ou cinza escuro, lisas, convexas, podendo apresentar zona opacas e/ou claro em torno e atípicas para estafilococos, foram selecionadas de placas com BP contendo de 30 a 300 colônias.

As colônias selecionadas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo cerca de 2 mL de caldo infusão cérebro coração e incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias suspeitas foram purificadas e confirmadas por meio de coloração de Gram, catalase, coagulase, termonuclease, crescimento em 10% de NaCl e utilização anaeróbica de manitol (Bergey's Manual, 1994; Silva et al., 1997), como *S. aureus*.

### **3.2.3 Quantificação e identificação bioquímica de *Streptococcus agalactiae***

Microrganismos que se apresentaram com colônias incolores e com hemólise, no meio base Edwards Modificado, suplementado com 5% de sangue de carneiro desfribinado, foram isolados após ter sido incubados a 37°C, por 24-48 horas e identificados como *Streptococcus agalactiae* após o prova de catalase e reação de CAMP, que é uma hemólise rápida que ocorre quando os eritrócitos de carneiro são expostos e combinados com a  $\beta$ -hemolisina estafilocócica e o produto da difusão dos estreptococos do grupo B (Brown, 1974).

### **3.3 Análises físico-químicas**

#### **3.3.1 Acidez Titulável**

A acidez titulável expressa em graus Dornic (g de ácido láctico/mL de leite) foi determinada utilizando-se acidímetro Dornic, com solução de NaOH N/9 (solução dornic) e solução alcoólica de fenolftaleína devidamente calibrada como indicador, conforme metodologia descrita na (A.O.A.C., 1995).

#### **3.3.2 Gordura**

Os teores de gordura foram determinados pelo método do butirômetro de Gerber, descrito pela (A.O.A.C., 1995).

#### **3.3.3 Densidade**

Foi utilizada a leitura direta em termolectodensímetro, previamente calibrado, corrigindo-se o efeito da temperatura segundo (A.O.A.C., 1995).

#### **3.3.4 Proteína**

A percentagem de proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, segundo (A.O.A.C., 1995).

#### **3.3.5 Sólidos totais e desengordurados**

Os teores de sólidos totais e desengordurados foram obtidos através da fórmula de Fleishmann, descrito pela (A.O.A.C., 1995).

#### **3.3.6 Cloreto de sódio**

A percentagem de cloreto de sódio foi determinada por titulação com tiocianato de potássio à 0,1 N, como descrito pela (A.O.A.C., 1995).

### **3.3.7 Lactose**

O teor de lactose foi determinado pelo equipamento Bentley 2000, que foi devidamente calibrado pelos métodos oficiais, na EMBRAPA Gado de Leite-Juiz de Fora, segundo metodologia descrita pelo (IDF, 1996).

### **3.3.8 Contagem de células somáticas**

As células somáticas do leite foram analisadas pelo contador de células somáticas, Bentley Somacount 300, na EMBRAPA Gado de Leite – Juiz de Fora segundo metodologia descrita pelo (IDF, 1995).

## **3.4 Análise Estatística**

As análises estatísticas foram divididas em dois grupos de acordo com a metodologia utilizada.

### **3.4.1 Análise de Variância**

Para analisar os dados de físico-química, densidade(g/mL), acidez (°D), gordura(%), ST (%), SD(%), cloretos (%), lactose (%), proteína verdadeira (%), contagem de células somáticas (mil/mL) e o logaritmo da contagem total de Aeróbios Mesófilos das três estações do ano utilizou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC).

Foram realizadas análises de correlação entre a variável contagem de células somáticas e as demais variáveis, pelas quais foram determinadas os coeficientes de correlação de Spearman, sendo testados em nível de significância de 5%. Para todas as análises estatísticas realizadas neste trabalho foi utilizado o software estatístico SAS.

Para a variável contagem de células somáticas realizou-se também uma análise exploratória dos dados, por meio da construção de Boxplot.

Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância (nível de significância 5%). Sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com nível de 5% de probabilidade.

### 3.4.2 Teste de Hipótese para duas proporções

As contagens de *S. aureus* e *S. agalactiae*, foram transformadas em porcentagem de acordo com cada estação do ano (Outono, Inverno e Primavera).

Os dados foram interpretados estatisticamente por meio do teste de hipótese Z unilateral de igualdade para proporções de duas épocas, ao nível de significância de 5 %. Ou seja, foram testadas as igualdades entre as proporções das épocas Outono/Inverno, Outono/Primavera e Inverno/Primavera.

O valor da estatística do teste é dada pela expressão1 (Triola, 2005).

$$z = \frac{(\hat{p}_i - \hat{p}_j)}{\sqrt{\frac{\bar{p}\bar{q}}{n_i} + \frac{\bar{p}\bar{q}}{n_j}}} \quad (1)$$

em que:

$$\bar{p} = \frac{x_i + x_j}{n_i + n_j},$$

$$\bar{q} = 1 - \bar{p},$$

$n_i$  e  $n_j$  = número totais de isolados para duas épocas (i e j),

$x_i$  e  $x_j$  = número totais do isolado em estudo para duas épocas

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análises físico-químicas do leite

As médias obtidas das 3 estações do ano das análises físico-químicas das amostras de leite correlacionadas com a contagem de células somáticas obtidos neste trabalho estão apresentados na Tabela 3.

Os teores médios de densidade, acidez, gordura, sólidos totais, sólidos desengordurados, podem ser considerados dentro da média, quando comparados aos requisitos encontrados no padrão de identidade e qualidade do leite cru refrigerado (Brasil, 2002). E para estas variáveis os resultados encontrados foram estatisticamente iguais nas diferentes estações analisadas.

TABELA 3 Resumo das médias das variáveis respostas e os coeficientes de correlação de Pearson da variável CCS com as demais variáveis

Variáveis	Médias <sup>1</sup>			CV (%)	Coeficiente de Correlação
	Outono	Inverno	Primavera		
Densidade	1,0321a	1,0322a	1,0320a	0.08	-0,1925 (ns)
Acidez	16,67a	17,04a	16,79a	9.40	0,0071 (ns)
Gordura	3,80a	3,63a	3,53a	15.04	-0,0034 (ns)
ST	12,86a	12,67a	12,50a	5.35	-0,0607 (ns)
SD	9,05 a	9,04a	8,97a	2.52	-0,1747 (ns)
Cloretos	0,20 a	0,17 b	0,14 c	23.10	0,0867 (ns)
Lactose	4,47a	4,50a	4,52a	2.43	-0,1713 (ns)
Prot.Bruta	3,49a	3,20 b	3,25 b	7.42	0,0484 (ns)
Prot.Verd.	3,33 a	3,05 b	3,07 b	7.61	0,0423 (ns)
CCS	368,67a	313,13a	490,21a	16.78	

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

(ns) Não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Correlação de Pearson.

CV= Coeficiente de variação

Pelos dados da Tabela 3 de médias conclui-se que não existe correlação entre os valores de CCS com as demais variáveis.

A mastite bovina determina uma série de alterações na composição e nas características físico-químicas do leite produzido por uma glândula mamária infectada. Pode-se atribuir estas alterações a três fatores principais, alterações na permeabilidade vascular devido ao processo inflamatório; lesão do epitélio secretor responsável pela síntese de alguns componentes do leite; e ação de enzimas originadas das células somáticas e de microrganismos presentes no leite (Fonseca & Santos, 2000).

#### **4.1.1 Cloretos**

O cloreto é um dos íons presentes na circulação sanguínea que durante os processos inflamatórios, com o aumento da permeabilidade vascular, destruição das junções celulares e do sistema de bomba ativa, atravessa os capilares venulares e direciona-se ao lúmen dos alvéolos da glândula mamária. Assim mesclado ao leite, cuja composição deste elemento é proporcional ao equilíbrio eletrolítico, acarreta alterações na sua qualidade. O cloreto que mais se faz presente é o cloreto de sódio (NaCl) (Wegner e Stull, 1978).

O sódio e o cloro, presentes em altas concentrações no fluido extracelular, vazam para o lúmen do alvéolo aumentando suas concentrações no leite (Nielen et al., 1992).

Os dados apresentados na Tabela 3 apontam para uma média estatisticamente diferente ( $P < 0,05$ ) para a concentração de cloretos entre as diferentes estações do ano, o teor de cloretos foram superiores ao considerado normal pela NATIONAL MASTITIS COUNCIL (1996), como se pode observar na Figura 1, a razão pela qual no outono a concentração de cloretos foi maior é a alta concentração de chuvas ocorridas no final do verão e início da primavera. Alguns autores (Batra & Mcallister, 1984) encontraram maiores valores na

condutividade elétrica do leite nas épocas da primavera e outono e menores no inverno, porém estas diferenças não foram significativas.

Vasconcelos (1996), também observou que as estações do ano influenciaram o percentual do teor de cloretos de modo a acarretar a ocorrência de maiores médias na época do verão e menores na época da primavera, entre as amostras de leite.

Apesar da correlação entre CCS e o teor de cloretos ter sido não significativa de acordo com a Tabela 3, autores como Roger e Smith, citados por Callamari et al. (1992), trabalhando em duas propriedades, obtiveram coeficiente de correlação entre CCS e cloreto de 0,76% ( $P < 0,01$ ) para a fazenda A e 0,90% ( $P < 0,01$ ) para a fazenda B.

Os valores médios superiores de cloretos advém de leites com altas contagens de células somáticas que pode ser explicado pela alteração da concentração iônica devido ao aumento da permeabilidade capilar, assim como pela destruição de junções celulares e do sistema de bombeamento ativo de íons.

#### **4.1.2 Lactose**

Altas contagens de células somáticas levam a redução do teor de lactose do leite, estes reduzidos níveis de lactose podem ser causados por menor disponibilidade de glicose na glândula como resultado da redução do fluxo sanguíneo.

Na Tabela 3 verifica-se que não houve diferença significativa no teor de lactose entre as estações do ano, no entanto, esses teores são considerados anormais para vacas sadias, pois os valores apresentados na tabela foram baixos, mostrando haver uma influência das contagens de células somáticas nos leites analisados. Isso pode ser explicado com base em Fonseca e Santos (2000) que afirmam que o teor de lactose diminui no leite de vacas com mastite ocorrendo mecanismo de compensação para restabelecer o equilíbrio osmótico do leite em

relação ao sangue, pelo aumento da passagem de íons sódio e cloro, aumentando, dessa maneira, o teor de cloretos.

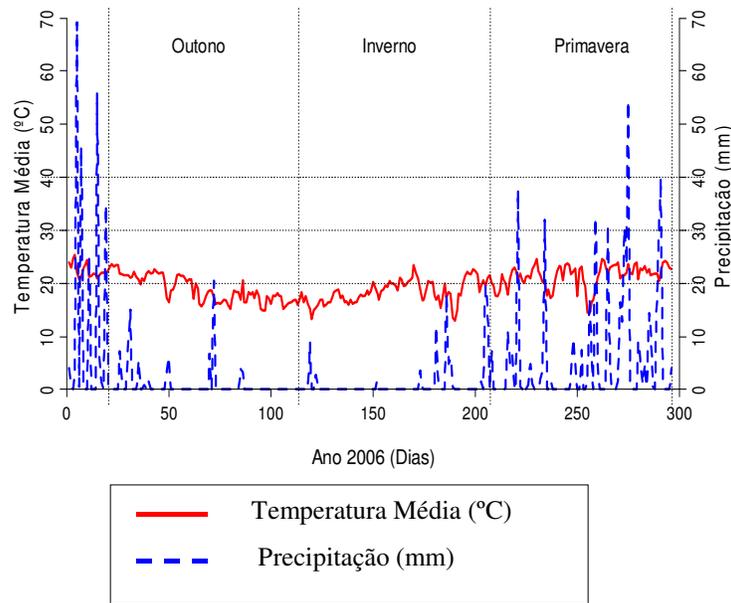
Matioli (2005), estudando a influência que diferentes CCS exercem sobre a qualidade físico-química geral do leite, verificou valores de lactose menores nas maiores contagens de células somáticas. Dados compatíveis com o deste experimento foram encontrados por Froeder (1985), verificando que a percentagem de lactose foi maior no inverno e na primavera e menor no outono.

#### **4.1.3 Proteínas bruta e verdadeira**

Apesar da percentagem de proteína total do leite não variar, pode haver decréscimo significativo na porcentagem de caseína total e aumento das proteínas do soro, lactoferrina e imunoglobulinas (Urech et al., 1999), proteínas associadas com respostas inflamatórias da glândula mamária.

A colonização da glândula mamária bovina por bactérias patogênicas capazes de provocar uma inflamação, leva a vaca a liberar no leite maior quantidade de células somáticas e proteínas características da resposta imune, principalmente as imunoglobulinas. Normalmente, a percentagem de proteínas do leite aumenta com o aumento das células somáticas, não representando melhoria da qualidade da composição do leite, pois os teores de caseína/proteínas do soro diminuem (Machado et al., 1998).

Observa-se na Tabela 3 que não houve diferença significativa entre o teor de proteína no inverno e primavera, porém houve diferença significativa entre o outono e as demais estações, sendo o teor mínimo de proteína encontrado na primavera e o teor máximo no outono o que pode ser explicado pelo maior volume de chuvas concentrada na primavera (Figura 1). Os maiores teores de proteína total e proteína verdadeira foram encontradas no outono isto devido às coletas terem sido feitas no início da estação o que levou a ter tido influência das chuvas de verão.



Estação Metereológica da Universidade Federal de Lavras/UFLA (2006)

FIGURA 1 Dados de Precipitação (mm) e de Temperatura Média (°C) diárias das estações Outono, Inverno e Primavera.

Dados compatíveis com o deste experimento também foram encontrados por Santos et al. (1981), na região de Juiz de Fora-MG, que estudando a influência das estações na composição do leite, encontraram diferenças notáveis, sobressaindo o teor máximo de proteína no outono e o teor mínimo na primavera.

Block (2000), cita que, devido à importância da porcentagem de proteína verdadeira do leite usado no processamento, há interesse nos Estados Unidos em analisar e pagar o produto por esta fração protéica, ao invés de remunerar por proteína total. O autor relata que tal fato é relevante, pois certas condições de

alimentação, não especificada, podem causar consideráveis variações no percentual de nitrogênio não protéico e, assim, na proteína total.

#### **4.1.4 Células somáticas**

A CCS de animais individuais ou de tanque tem sido utilizada em países desenvolvidos durante as últimas décadas, desde que a ampla disponibilidade de contadores eletrônicos tornou esta metodologia acessível em grande escala. Atualmente, a CCS do tanque tem sido usada como uma importante ferramenta para monitoramento da qualidade do leite e da saúde da glândula mamária visando detectar mastite subclínica no rebanho, para estimar as perdas de produção de leite em decorrência da mastite e como um indicador das características qualitativas/higiênicas do leite (Brito et al., 1998).

A facilidade com que estas células podem ser contadas eletronicamente fez delas um parâmetro muito utilizado para o pagamento do leite segundo a qualidade em muitos países economicamente desenvolvidos.

A contagem de células somáticas é influenciada por vários fatores, mas especialmente pela presença de infecções intramamárias, tornando-se um indicador bastante confiável de sanidade da glândula mamária. Outros fatores podem interferir na CCS como a época do ano, raça, estágio de lactação, produção de leite, número de lactações, estresse causado por deficiências no manejo, problemas nutricionais, efeito rebanho, condições climáticas e doenças intercorrentes (Abreu, 1999; Ostrensky, 1999; Viana, 2000).

Observa-se na Figura 2 comportamentos distintos de CCS nas diferentes épocas do ano, porém a maior média foi observada na primavera juntamente com os maiores números de células. Estes aumentos na CCS durante a primavera são justificados pelos efeitos de variação climática como temperatura e chuva como pode ser observado na Figura 1, caracterizando nesta variação climática um estresse térmico sofrido pelo animal devido à invasão sofrida pela

glândula mamária por microrganismos. Assim estas células por fazerem parte do mecanismo natural de defesa do animal, migram da corrente circulatória para a glândula mamária, e conseqüentemente para o leite.

Esta justificativa é compatível a de Dohoo & Meek (1982), que também afirmam que a CCS é baixa no inverno e elevada por todo o período de primavera e início do outono, o que pode ser observado pela quantidade de chuvas e pela elevada temperatura nesse período.

Vasconcelos (1996), evidenciou também que a época do ano apresentou influência sobre o número de células somáticas do leite. Todavia tais alterações não foram suficientes para evidenciar diferenças significativas entre as distintas épocas do ano.

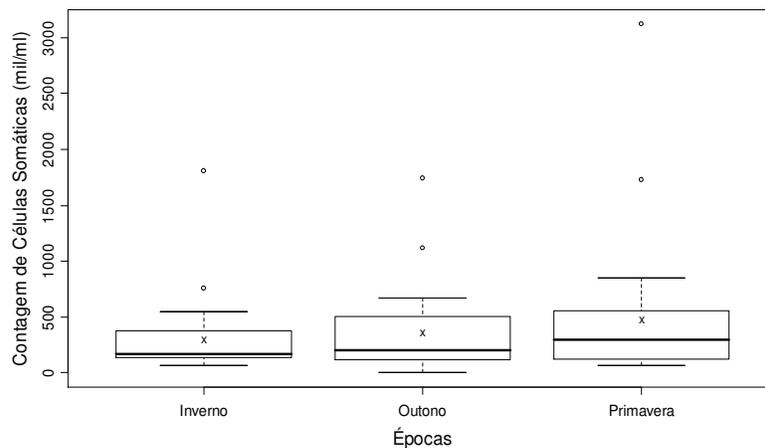


FIGURA 2. Box plot para a variável Contagem de Células Somáticas (mil/ml) de acordo com a época do ano no ensaio com leite, sendo as médias representadas pelo símbolo “x”.

O aumento da célula somática é a principal característica utilizada para diagnóstico da mastite subclínica, observou-se na Figura 2, que sua prevalência nos diferentes rebanhos situou-se numa faixa de 64.000 a 3.123.000 cél/mL, mostrando uma variação muito grande, nos diferentes rebanhos e estações.

## **4.2 Análises microbiológicas do leite**

### **4.2.1 Staphylococcus aureus**

Na Tabela 4 encontra-se a proporção de *S. aureus* para as três estações estudadas, as proporções outono e primavera foram diferentes em nível de probabilidade de 5% sendo esta significativo para essas estações. Esta diferença significativa se da principalmente ao fato de que os produtores com relação a cada coleta modificavam principalmente as condições de higiene de ordenha pois sabiam que iríamos voltar para coletarmos novamente o seu leite sendo assim quando chegamos na última coleta que foi na primavera, percebemos que houve melhorias quanto a manipulação dos ordenhadores, limpeza do local de ordenha e do teto da vaca dentre outros.

A importância da participação de *S. aureus* em quadros crônicos de infecções intramamárias e a dificuldade em combater a bactéria, mesmo por meio de combinações de trabalhos com drogas mais potentes *in vitro*, reafirmando os resultados de trabalhos prévios da natureza intratável dessas infecções causadas por *S. aureus* (Owens et al., 1997).

TABELA 4 Teste de Hipótese para igualdade entre as proporções das épocas para contagem de *Staphylococcus aureus* nas amostras de leite.

Testes	Épocas	Proporção	Z <sub>calculado</sub>
1	Outono	0,4914	1,6045(ns)
	Inverno	0,2660	
2	Outono	0,4914	2,7938**
	Primavera	0,1220	
3	Inverno	0,2660	1,2653 (ns)
	Primavera	0,1220	

(ns), (\*\*) respectivamente não significativo e significativo em nível de 5% de probabilidade.

A prevenção e o tratamento da mastite devem ser preocupações primárias da indústria leiteira. Assim, medidas higiênico-sanitárias conduzidas de maneira não adequadas podem facilitar a contaminação do leite por microrganismos indesejáveis e esses podem causar alterações físico-químicas no leite, limitando sua durabilidade e de seus derivados, além de determinar problemas econômicos e de saúde pública, principalmente quanto à formação de enterotoxinas termorresistentes que, se ingeridas, podem levar a toxinoses.

No presente trabalho foram isolados 292 cepas suspeitas de serem estafilococos para a identificação bioquímica, destas 93 (31,85%) eram cocos Gram positivos, catalase, coagulase, termonuclease positivos e apresentaram crescimento em 10% de NaCl e utilização anaeróbica de manitol, sendo assim identificadas como *S. aureus*. Dados compatíveis foram encontrados por Oliveira (2003), que avaliou seis propriedades de exploração leiteira da região de Lavras, sul de Minas Gerais e dentre os 226 isolados, 111 (49,1%) foram identificados como *S. aureus* apresentando-se em maior frequência.

Nas infecções causadas pelos principais patógenos da mastite, o *S. aureus* é o que se apresenta em maior frequência, concordando com dados de

Oliveira (2003), que dentre as espécies que isolou em seu estudo 49,1% eram *S. aureus*.

A literatura cita que provavelmente o *S. aureus* é o patógeno mais comumente isolado das mastites bovinas tanto clínica como subclínica. No Brasil, a frequência de isolamento deste agente tem variado de 5,0 a 83,54%, de acordo com dados de diferentes pesquisas (Ferreiro, 1980). A presença de *S. aureus* em leite de rebanho tem sido verificada em 46,9 a 100% das amostras estudadas (Nader Filho, 1987).

Na Tabela 5 estão apresentados os valores de contagem total de microrganismos (UFC/mL) quando cultivados no meio seletivo Baird-Parker que variou de <10 a  $2,5 \cdot 10^7$  UFC/mL. Sabe-se que o crescimento deste agente em altos níveis ( $\geq 10^6$ ) em alimentos é perigoso, pois cerca de metade das cepas de *S. aureus* produz enterotoxinas termoestáveis quando presente neste nível (Bergdoll, 1991).

TABELA 5 Contagem total (CT) de microrganismos (UFC/mL) de 25 amostras de leite cru de propriedades rurais, quando cultivados no meio seletivo Baird-Parker.

Propriedades	CT (UFC/mL)		
	Outono	Inverno	Primavera
1	$6,6 \cdot 10^3$	$2,1 \cdot 10^3$	$7,1 \cdot 10^2$
2	<10	<10	$2,5 \cdot 10^4$
3	$1,4 \cdot 10^3$	$6,6 \cdot 10^4$	$9,1 \cdot 10^4$
4	$9,1 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^3$
5	$8,6 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^4$
6	$2,2 \cdot 10^3$	<10	$5,9 \cdot 10^3$
7	$4,7 \cdot 10^4$	$9,7 \cdot 10^4$	$6,4 \cdot 10^3$
8	<10	$4,7 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^3$
9	$3,6 \cdot 10^5$	$8,6 \cdot 10^3$	$5,7 \cdot 10^3$
10	$4,0 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^5$	$7,6 \cdot 10^4$
11	$1,3 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$
12	$3,4 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^6$
13	$1,7 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^5$
14	$1,3 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$	$2,9 \cdot 10^5$
15	$3,8 \cdot 10^4$	$3,2 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^5$
16	$8,7 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^5$
17	$1,0 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^3$	$5,8 \cdot 10^5$
18	$7,9 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^5$	$9,7 \cdot 10^3$
19	$4,9 \cdot 10^3$	$4,4 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^3$
20	$4,9 \cdot 10^5$	$5,2 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^5$
21	<10	$1,3 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^6$
22	$8,5 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^3$	$9,4 \cdot 10^4$
23	$2,7 \cdot 10^3$	$5,6 \cdot 10^2$	$3,9 \cdot 10^6$
24	$1,1 \cdot 10^4$	<10	$1,0 \cdot 10^6$
25	$2,2 \cdot 10^3$	<10	<10

#### 4.2.2 *Streptococcus agalactiae*

As proporções são ditas estatisticamente iguais de acordo com a Tabela 6 para a contagem de *S. agalactiae*. Dentre os 233 isolados do Edwards modificado, 19 (8,15%) expressaram-se como *S. agalactiae*. A baixa prevalência deste agente pode ser devida a sua erradicação em muitos rebanhos leiteiros devido a este patógeno ser susceptível aos antibióticos aplicados para controle desta infecção, e também por ser um patógeno encontrado principalmente no interior da glândula mamária. Dados parecidos foram, obtidos por Khaitsa et al. (2000), que não isolou *Streptococcus agalactiae* de amostras de leite do tanque de expansão.

Observa-se que as infecções causadas por *Streptococcus agalactiae* são reduzidas de forma significativas com o tratamento, porém, naquelas infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, a taxa de cura é reduzida durante a lactação, e no período seco, há apenas discreta melhoria na cura das infecções (<http://www.milkpoint.com.br>).

TABELA 6 Teste de Hipótese para igualdade entre as proporções das épocas para contagem de *Streptococcus agalactiae* nas amostras de leite.

Testes	Épocas	Proporção	Z <sub>calculado</sub>
1	Outono	0,1055	0,1756 (ns)
	Inverno	0,1216	
2	Outono	0,1055	1,1504 (ns)
	Primavera	0,0241	
3	Inverno	0,1216	1,2942 (ns)
	Primavera	0,0241	

(ns) não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

A Tabela 7 apresenta os resultados de contagem total para *Streptococcus sp*, mostrando que algumas propriedades apresentaram valores abaixo de 10 UFC/mL, pesquisas têm mostrado que medidas simples de controle podem reduzir significativamente a incidência deste grupo de microrganismos.

TABELA 7 Contagem total (CT) de microrganismos (UFC/mL) de 25 amostras de leite cru de propriedades rurais, quando cultivados no meio seletivo Edwards modificado.

Propriedades	CT (UFC/mL)		
	Outono	Inverno	Primavera
1	7,6.10 <sup>2</sup>	<10	<10
2	<10	<10	<10
3	8,4.10 <sup>2</sup>	1,4.10 <sup>4</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>
4	6,9.10 <sup>2</sup>	4,7.10 <sup>2</sup>	<10
5	4,0.10 <sup>4</sup>	2,5.10 <sup>3</sup>	3,5.10 <sup>3</sup>
6	<10	2,5.10 <sup>3</sup>	6,3.10 <sup>2</sup>
7	5,9.10 <sup>6</sup>	<10	9,0.10 <sup>3</sup>
8	3,6.10 <sup>5</sup>	<10	4,5.10 <sup>2</sup>
9	7,4.10 <sup>4</sup>	2,2.10 <sup>6</sup>	<10
10	<10	1,2.10 <sup>5</sup>	9,2.10 <sup>4</sup>
11	6,4.10 <sup>3</sup>	1,0.10 <sup>6</sup>	6,3.10 <sup>4</sup>
12	<10	106,00	8,7.10 <sup>4</sup>
13	8,1.10 <sup>6</sup>	3,5.10 <sup>4</sup>	1,9.10 <sup>4</sup>
14	1,0.10 <sup>6</sup>	3,0.10 <sup>5</sup>	6,3.10 <sup>6</sup>
15	6,7.10 <sup>6</sup>	4,3.10 <sup>3</sup>	1,4.10 <sup>5</sup>
16	2,8.10 <sup>4</sup>	<10	8,7.10 <sup>3</sup>
17	4,2.10 <sup>5</sup>	<10	3,9.10 <sup>4</sup>
18	2,7.10 <sup>4</sup>	<10	5,2.10 <sup>5</sup>
19	8,3.10 <sup>4</sup>	<10	1,3.10 <sup>4</sup>
20	1,0.10 <sup>3</sup>	2,5.10 <sup>4</sup>	<10
21	<10	4,0.10 <sup>6</sup>	1,3.10 <sup>5</sup>
22	<10	3,7.10 <sup>3</sup>	1,7.10 <sup>6</sup>
23	8,9.10 <sup>2</sup>	<10	7,2.10 <sup>3</sup>
24	8,7.10 <sup>4</sup>	<10	3,9.10 <sup>3</sup>
25	1,0.10 <sup>5</sup>	<10	<10

### 4.2.3 Aeróbios mesófilos

As contagens observadas na Tabela 8 foram elevadas e muito próximas nas duas estações do ano, sendo que 78% das amostras analisadas no inverno e 75% das analisadas na primavera foram consideradas acima do permitido pela legislação com contagens acima de  $1,0 \cdot 10^6$  UFC/mL, refletindo indiscutivelmente em uma má qualidade microbiológica, mostrando graves deficiências na obtenção, estocagem e transporte do leite cru. Entretanto o manejo, as práticas de higiene e o nível cultural dos ordenhadores têm um papel importante, porém para se produzir leite com condições higiênicas não é necessário grandes investimentos em tecnologia, mas sim, de uma ligeira mudança de hábito.

Estes resultados estão de acordo com o encontrado por Froeder (1985), que encontrou contagens de mesófilos altas e semelhantes em todas as estações, não diferindo estatisticamente entre primavera, verão e outono, apresentando menores contagens no inverno.

TABELA 8 Médias da Contagem Total de Aeróbios Mesófilos (log UFC/mL) em 2 épocas (inverno e primavera) nas amostras de leite

<b>Épocas</b>	<b>Médias</b>
Inverno	8,59
Primavera	8,64

Conforme pode ser observado na Tabela 9 os valores obtidos na contagem padrão de bactérias variaram de  $3,3 \cdot 10^4$  a  $2,4 \cdot 10^{17}$  UFC/mL. Trabalho realizado por Souza (2006), acompanhando a qualidade microbiológica do leite

cru proveniente de nove propriedades rurais situadas na região da Gameleira, município de Sacramento-MG, obteve contagem padrão de bactérias que variaram de  $6,2 \cdot 10^2$  a  $2,2 \cdot 10^7$  UFC/mL. Esses resultados foram inferiores aos obtidos no presente estudo.

TABELA 9 Contagem total (CT) de microrganismos aeróbios mesófilos (UFC/mL) de 25 amostras de leite cru de propriedades rurais, quando cultivados no meio Plate Count agar (PCA).

Propriedades	CT(UFC/mL)	
	Inverno	Primavera
1	<10	$6,5 \cdot 10^{12}$
2	<10	$2,5 \cdot 10^{12}$
3	$6,9 \cdot 10^7$	$4,7 \cdot 10^6$
4	$1,5 \cdot 10^{17}$	$3,3 \cdot 10^4$
5	$2,8 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^5$
6	$1,7 \cdot 10^{17}$	$3,2 \cdot 10^7$
7	$2,4 \cdot 10^{17}$	$2,5 \cdot 10^5$
8	$3,1 \cdot 10^8$	<10
9	$2,2 \cdot 10^{11}$	$1,1 \cdot 10^5$
10	$9,7 \cdot 10^9$	$1,6 \cdot 10^8$
11	$7,0 \cdot 10^{13}$	$6,3 \cdot 10^6$
12	$6,5 \cdot 10^{11}$	$6,5 \cdot 10^{12}$
13	$2,7 \cdot 10^8$	$2,2 \cdot 10^{12}$
14	$7,1 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^7$
15	$3,4 \cdot 10^{13}$	$6,5 \cdot 10^{12}$
16	$4,2 \cdot 10^{13}$	$7,6 \cdot 10^5$
17	$5,8 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^7$
18	$2,5 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^7$
19	$2,5 \cdot 10^{12}$	$1,9 \cdot 10^6$
20	$1,3 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^9$
21	$2,7 \cdot 10^8$	$6,5 \cdot 10^{12}$
22	$3,4 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^{12}$
23	<10	$2,5 \cdot 10^{12}$
24	<10	$2,5 \cdot 10^{12}$
25	<10	<10

A qualidade e vida útil de um produto dependem, em grande parte, da qualidade da matéria prima utilizada, sendo praticamente impossível melhorar as propriedades de um produto derivado do leite se o número de microrganismos inicialmente presentes no leite “in natura” for elevado (Huhn et al., 1980).

Em estudo realizado por Tavares et al. (2003), analisando 20 amostras de leite cru, tanto de latões como de tanque de refrigeração, observaram que 65% das amostras para contagem de aeróbios mesófilos foram consideradas fora do padrão.

## 5 CONCLUSÕES

- O *Staphylococcus aureus*, foi o agente contagioso da mastite isolado com maior frequência por ser um microrganismo mais prevalente da mastite e apresentar baixas taxas de cura pela resistência antibiótica.
- Observou-se uma baixa prevalência neste estudo de *Streptococcus agalactiae*, por ser um microrganismo encontrado principalmente no interior da glândula mamária e susceptível a antibióticos.
- A contagem de microrganismos Aeróbios Mesófilos foi elevada em 78% das amostras analisadas no inverno e 75% das analisadas na primavera nas propriedades rurais, apresentando-se acima do permitido pela legislação que é de  $1,0 \cdot 10^6$  UFC/mL, podendo comprometer a qualidade do produto que chega a mesa do consumidor.
- A composição físico-química do leite diferiu significativamente para alguns componentes como Cloretos, Proteína Bruta e Verdadeira, porém não houve correlação de nenhum componente com as células somáticas.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Verificou-se que a qualidade do leite pode ser significativamente melhorada por meio de assistência técnica aos produtores e sanificação adequada dos latões e utensílios de ordenha, propiciando melhor ambiente para a ordenha, resfriando o leite na fazenda e promovendo seu transporte rápido.

Devemos ter uma preocupação com a análise do leite de conjunto, devido à existência do efeito de diluição para não acarretar na ocorrência de interpretações equivocadas.

Aos técnicos responsáveis pela elaboração de normas que regem o controle da qualidade do leite, deve-se levar em consideração a localização geográfica do Brasil, que sendo um país tropical apresenta estações do ano pouco definidas, cujos valores de temperatura e de umidade relativa são elevados e muito variáveis.

## REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. R. Considerações sobre a qualidade do leite. In: ENCONTRO DE PECUÁRIA LEITEIRA DO SUL DE MINAS, 3., 1999, Lavras. **Anais...**Lavras: UFLA-DAC. 1999.

ALMEIDA, R. A.; MATTHEWS, E. C.; GUIDRY, A. J.; OLIVER, S. P. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 6, p. 1021-1026, June 1996.

ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Invasion of bovine mammary epithelial cells by *Streptococcus dysgalactiae*. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 78, n. 6, p. 1310-1317, June 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 12. ed. Washington, 1995. 1094p.

BATRA, T. R.; McLLISTER, A. J. A comparison of mastitis detection methods in dairy cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 64, n. 2, p. 305-312, 1984.

BERGDOLL, H. S. *Staphylococcus aureus*. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry**, Gainesville, v.74, n.4, p. 706-710, July/Aug. 1991.

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. **Bacteriological analytical manual**. 9.ed. Baltimore:Willians & Wilkins, 1994. 1687p.

BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1990. 1324p.

BLOCK, E. Nutrição de vacas leiteiras e composição do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2., Curitiba. **Anais...** Curitiba: 2000. p. 85-88.

BLOOD, D. C.; RADOTITS, O. M. **Clínica Veterinária**. 7 ed. Rio de Janeiro Guanabara Kogan, 1991. 1263p.

BLOOD, D. C.; RADOTITS, O. M. **Veterinary medicine**: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. Londres: Bailliere Tindall, 1989. 1502p.

BRAMLEY, A. J. Mastitis: physiology or pathology? **Flemmish Veterinary Journal**, Ghent, v. 62, p. 3-11, 1991. Supplement 1.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2002.

BRITO, J. R. F.; CALDEIRA, G. A. V.; VERNEQUE, R. S.; BRITO, M. A. V. P. Sensibilidade e especificidade do “California Mastitis Test” como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação a contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2, p. 49-53, abr./jun. 1997.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. **Diagnóstico microbiológico da mastite**. Juiz de Fora: EMBRAPA, 1999. 26 p. (EMBRAPA. Circular Técnico, 55).

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M.; VARGAS, O. L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 39-44, jan./mar. 1998.

BROWN, J.; FARNSWORTH, R.; WANNAMAKER, L. W.; JOHNSON, D. W. CAMP factor of group b streptococci: production, assay, and neutralization by sera from immunized rabbits and experimentally infected cows. **Infection and Immunity**, v.9, n.2, p. 377-383, Feb. 1974.

CALLAMARI, L. et al. Comparison of indirect methods for evaluating damage to mammary gland epithelial cells. **Atti Società Italiana di Buiatria**, Genova, v. 24, p. 129-140, 1992.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; SILVA, L. A. B.; GARINO JR., F.; BENITES, N. R.; HORIUTI, A. M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **NAPGAMA**, São Paulo, v.2, n.2, p.16-20, mar/abr. 1999.

COUSINS, C. M.; BRAMLEY, A. J. **Microbiologia lactológica**. Zaragoza : Acribia, 1987. Cap.4, p.109-150.

DOHOO, I. R.; MEEK, A. H. Somatic cell counts in bovine milk. **Canada Veterinary Journal**, Ottawa, v. 23, n. 4, p. 119-125, 1982.

EBERHART, R. J.; HARMON, R. J.; JASPER, D. E.; NATZKE, R. P.; NICKERSON, S. C.; RENEU, J. K.; ROW, E. H.; SMITH, K. L.; SPENCER, S. B. **Current Concepts of Bovine Mastitis**. 3rd ed. Natl. Mastitis Council, Inc., Arlington, VA, 1987.

FERNANDES, J. C. T. Agentes etiológicos de mastite bovina no RS no período de 1972-1989. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 20, p. 151-163, 1992.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FROEDER, E. **Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru da bacia leiteira de Viçosa-MG**, Viçosa, 1985. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa.

GUIDRY, A. J. Mastitis and the immune system of the mammary gland. In: ANDERSON, R. R. et al. **Lactation**. 1ed. Iowa State University Press: Bruce Larson, p.229-258, 1985.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, July 1994.

HÉBERT, A.; SAYASITH, K.; SÉNÉCHAL, S.; DUBREUIL, P.; LAGACÉ, J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 193, n. 1, p. 57-62, Dec. 2000.

HILLERTON, J. E. Controle da mastite bovina. Workshop sobre programa de controle integrado na mastite bovina. **Anais...** estado, P.06-25. 1996.

HUHN, S.; HAJDENWURCEL, J. R.; MORAES, J. M.; VARGAS, O. L. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha manual e mecânica e ao chegar a plataforma. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 35, n. 209, p. 3-8, maio/jun. 1980.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos. I.** Técnicas de análises microbiológicas. Zaragoza: Acribia, 431p., 2000.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Spoilage and pathogenic bacteria in milk based products. **Bulletin International Dairy Federation**, La Haye, n. 292, p. 28-32, 1994.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1995. Milk. **Enumeration of somatic cells.** IDF Standard 148A, Brussels, 8 pp.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1996. **Determination of milkfat, protein and lactose content. Guide for the operation of mid-infra-red instruments.** IDF Standard 141B, Brussels, 12 pp.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 668p..

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 38, n. 7, p. 429-437, July 1997.

KHAITSA, M. L.; WITTUM, T. E.; SMITH, K. L.; HENDERSON, J. L.; HOBLET, K. H. Herd characteristics and management practices associated with bulk-tank somatic cell counts in association programs in Ohio. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 61, n. 9, p. 1092-1098. Sept. 2000.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, Champaign, v. 48, n. 1, p. 167-188, Jan. 1981.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRIES, G. A. Efeitos da contagem de células somáticas na qualidade do leite e a atual situação de rebanhos brasileiros. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, n. 309, p. 10-16, 1999.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SILVA, L. F. P. Fatores que afetam a composição do leite. **Indústria de Laticínios**, Pinheiros, n. 29, p. 32-36, 1998.

MACDONALD, J. S. Streptococcal and Staphylococcal mastitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 170, n. 10, p. 1157-1159, 1977.

MATIOLI, G. P. **Influência da contagem de células somáticas na qualidade do leite e nas propriedades do queijo minas padrão ao longo da maturação.** 2005.100p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MATSUNAGA, T.; KAMATA, S.; KIKIICHI, N. et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **Journal of Medicine Science**, Tokyo, v. 55, n. 2, p. 297-300, Apr. 1993.

MELCHÍADES, L. E. A.; VEIGA, V. M. O.; RIBEIRO, M. T.; DUTRA, I. S. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica bovina. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 48, n. 288, p. 80-81, 1993.

MILKPOINT. **Avanços no controle da saúde da glândula mamaria.** Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/mn/radarestecnicos/artigo.asp>. Acesso em 30/06/2006.

MULLER, E. E. **Profilaxia e controle da mastite.** In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3, 1999. Botucatu, UNESP, 1999. P. 57-61.

NADER FILHO, A. **Mastite estafilocócica e características microbiológicas do leite tipo B “In Natura” e pasteurizado. Isolamento de cepas *S. aureus*, produção de enterotoxina e determinação da origem provável, humana ou bovina.** Tese de livre docência, 1987.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Cut concepts of bovine mastitis.** 4. ed. Madison, 1996. 64p.

NEAVE, F. K.; DODD, F. H.; KINGWILL, R. G.; WESTGARTH, D. R. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 52, n. 5, p. 696-707, May 1969.

NIELEN, M. et al. Electrical conductivity of milk: measurement, modifiers and meta analysis of mastitis detection performance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 2, p. 606-614, Feb. 1992.

OLIVEIRA, R. M. **Avaliação da microbiota e estudo da diversidades genética de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas mastíticas.** 2003. 144p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, J. S. Qualidade microbiológica do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 31, n. 186, p. 15-20, 1976.

OWENS, W.E; RAY, C. H.; WATTS, J. L.; YANCEY, R. J. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 2, p. 313-317, Feb. 1997.

OSTRENSKY, A. **Efeitos de ambiente sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça holandesa no Paraná**. Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

PHILPOT, W. N. Incidence of subclinical mastitis on milk production and milk composition. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 50, n. 6, p. 978-981, June 1967.

PLATONOW, I.; KATHEIN, R. A. Some observations on the epidemiology of mastitis organisms. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 11, n. 8, p. 157, 1970.

RADOTITS, O. M.; LESLIE, K. E.; FETROW, J. Herd health. **Food animal production medicine**. 2. ed. Sandres: Philadelphia, 1994. p. 229-276.

RENEAU, J. K. Effective use of dairy herd improvement somatic cell count in mastitis control. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 69, n. 6, p. 1708-1720, June 1986.

SANTOS, E. C.; HAJDENWURCEL, J. R.; VILELA, M. A. P. Influência sazonal na composição de alguns constituintes do leite da bacia leiteira de Juiz de Fora. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 36, n. 219, p. 03-09, jan./fev. 1981.

SCHÄELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CIETEP/FIEP, 2000. p. 21-26.

SHARMA, K. K.; RANDOLPH, H. J. Enzymes in bovine milk: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 56, n. 5, p. 531-543, May 1974.

SILVA, N. da; JUNQUIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 295 p.

SMITH, K. L.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 68, n. 6, p. 1531-1553, June, 1985.

SOUZA, V. **Características físico-químicas, microbiológicas, celulares e detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite de tanque comunitário**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

TAVARES, J. Análise bacteriológica e físico-química de leite cru resfriado, provenientes de postos de refrigeração, sob inspeção federal, em Rio Bonito-RJ. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE HIGIENISTA DE ALIMENTOS, 1. CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 7. 2003, Belo Horizonte. **Resumos...** Minas Gerais: 2003. p. 209-210.

TRIOLA, M.F. **Introdução à Estatística**. 9<sup>a</sup> ed. LTC Livros Técnicos e Científicos Editora: Rio de Janeiro. 2005. 656p.

URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHALLIBAUM, M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 11, p. 2402-2411, Nov. 1999.

VASCONCELOS, C. G. C. **Estudo da variação do teor de cloretos e do número de células somáticas no leite bovino oriundo de quartos sadios, durante os diferentes meses do período de lactação, estações do ano e ordenhas da manhã e da tarde**. Jaboticabal, 1996. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-FCAVJ/UNESP.

VEIGA, V. M. O.; RIBEIRO, M. T. Mamite bovina. In: CHARLES, T. P.; FURLONG, J. (Ed.). **Doenças dos bovinos de leite adultos**. Coronel Pacheco: EMBRAPA – CNPGL, 1992. p.123.

VERDI, R. I.; BARBANO, D. M. Effect of coagulants, somatic cell enzymes, and extracellular bacterial enzymes on plasminogen activation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 3, p. 772, Mar. 1991.

VIANA, L. C. **Duração das infecções naturais por estafilococos coagulase negativos e contagem de células somáticas em vacas primíparas.** Londrina, 2000. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal), Universidade Estadual de Londrina.

WEGNER, T. N.; STULL, J. W. Relation between mastitis test score mineral composition of milk, and blood electrolytes profiles in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 61, n. 12, p. 1755-1759, Dec. 1978.

WILSON, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em leite a ser pasteurizado. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 1-11, 1977.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, Geneve, v. 345, p. 15-18, 2000.

## ANEXOS

<b>ANEXO A</b>		<b>Página</b>
TABELA 1A.	Análise de variância das variáveis Densidade (g/ml), Acidez (°D), Gordura (%), ST (%), SD (%) nas amostras de leite.....	48
TABELA 2A.	Análise de variância das variáveis Cloretos (%), Lactose (%), Proteína Bruta (%), Proteína Verdadeira (%), Contagem de células somáticas (mil/ml) nas amostras de leite.....	48
TABELA 3A.	Análise de variância Análise para o logaritmo da variável Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em 2 épocas (inverno e primavera) nas amostras de leite.....	49

TABELA 1A Análise de variância das variáveis Densidade (g/mL), Acidez (°D), Gordura (%), ST (%), SD (%) nas amostras de leite.

<b>Quadrado Médio do Resíduo</b>						
<b>Fonte de Variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>Densidade</b>	<b>Acidez</b>	<b>Gordura</b>	<b>ST</b>	<b>SD</b>
Épocas	2	0,0000	0,8618	0,4528	0,7526	0,0463
Erro	68	0,0000	2,5036	0,3025	0,4595	0,0516
Total	70					
Média Geral		1,03	17,00	3,66	12,67	9,02
C.V. (%)		0,08	9,40	15,04	5,35	2,52

TABELA 2A Análise de variância das variáveis Cloretos (%), Lactose (%), Proteína Bruta (%), Proteína Verdadeira (%), Contagem de células somáticas (mil/mL) nas amostras de leite.

<b>Quadrado Médio do Resíduo</b>						
<b>Fonte de Variação</b>	<b>G.L.</b>	<b>Cloretos</b>	<b>Lactose</b>	<b>Prot. Bruta</b>	<b>Prot. Verd.</b>	<b>CCS</b>
Épocas	2	0,0210**	0,0210	0,5629**	0,5743**	0,4748
Erro	68	0,0016	0,0123	0,0604	0,0574	0,8565
Total	70					
Média Geral		0,17	4,49	3,32	3,15	392,00*
C.V. (%)		23,10	2,47	7,42	7,61	16,78

(\*\*)significativo e significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

\*Média sem transformação.

TABELA 3A Análise de variância para o logaritmo da variável Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em 2 épocas (inverno e primavera) nas amostra de leite

Fonte de Variação	G.l.	Quadrado Médio do Resíduo
Época	1	0,0212 (ns)
Resíduo	45	18,5863
Total	46	
Média		8,61
C.V (%)		50,05

(ns) não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.