

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DAS CONTAGENS DE
CÉLULAS SOMÁTICAS OBTIDAS PELO EQUIPAMENTO
EKOMILK SCAN® E SUAS CORRELAÇÕES COM OUTROS
MÉTODOS DE ANÁLISE**

Ana Carolina Siqueira Gonçalves

Médica Veterinária

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DAS CONTAGENS DE
CÉLULAS SOMÁTICAS OBTIDAS PELO EQUIPAMENTO
EKOMILK SCAN[®] E SUAS CORRELAÇÕES COM OUTROS
MÉTODOS DE ANÁLISE**

Ana Carolina Siqueira Gonçalves

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal Martins

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Francisco Prata

Co-orientador: Dr. Luiz Carlos Roma Júnior

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área: Medicina Veterinária Preventiva.

2014

Gonçalves, Ana Carolina Siqueira
G635a Avaliação dos resultados das contagens de células somáticas obtidas pelo equipamento Ekomilk Scan® e suas correlações com outros métodos de análise / Ana Carolina Siqueira Gonçalves. - - Jaboticabal,2014
xi, 35 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientadora: Ana Maria Centola Vidal Martins
Coorientador: Luiz Francisco Prata,Luiz Carlos Roma Júnior
Banca examinadora: Luiz Augusto do Amaral, Arlindo Saran Netto
Bibliografia

1. Saúde da glândula mamária. 2. Método alternativo. 3. Contagem de células somáticas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.3:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

OBJETO: AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DAS CONTAGENS DE CÉLULAS SOMÁTICAS OBTIDAS PELO EQUIPAMENTO EKOMILK SCAN® E SUAS CORRELAÇÕES COM OUTROS MÉTODOS DE ANÁLISE

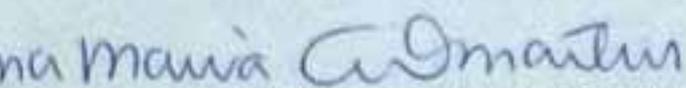
ORIENTADORA: ANA CAROLINA SIQUEIRA GONÇALVES

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA MARIA CENTOLA VIDAL MARTINS

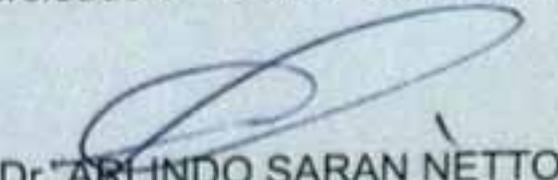
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ CARLOS ROMA JÚNIOR

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ FRANCISCO PRATA

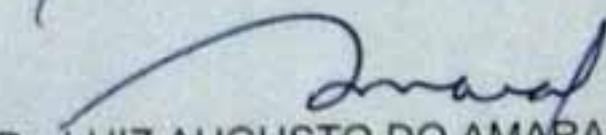
Realizada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora.



Profa. Dra. ANA MARIA CENTOLA VIDAL MARTINS
Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP


Dr. ARLINDO SARAN NETTO

Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP


Dr. LUIZ AUGUSTO DO AMARAL

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências e Veterinárias de Jaboticabal

Data de realização: 18 de dezembro de 2014.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ANA CAROLINA SIQUEIRA GONÇALVES – nascida em 03 de dezembro de 1986, na cidade de Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul, é Médica Veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, em 2011. Durante esse período, desenvolveu seu projeto de iniciação científica no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, intitulado “Ocorrência e diversidade molecular de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros e de corte nas regiões sudeste e centro-oeste do Brasil”, com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Realizou projetos de extensão com apoio da PROEX e voltados para a educação sanitária no meio rural e estudo das zoonoses. Durante a graduação, realizou cursos importantes para conhecimento na área de Medicina Veterinária Preventiva, a exemplo do “Curso de Atualização em Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal e Defesa Sanitária Animal” (108 horas). Realizou estágio curricular junto a Agencia Paulista de Tecnologia em Agronegócio – APTA – polo Centro Leste, em Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) de treinamento técnico, em que pode acompanhar e realizar projetos relacionados à bovinocultura leiteira e qualidade do leite. Durante a pós-graduação, além do projeto de pesquisa proposto, pode participar de diversos projetos de pesquisa do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, da FCAV/UNESP/Jaboticabal, com a apresentação de trabalhos em congressos e simpósios nacionais e internacionais, além da participação em projeto de extensão rural. Também pode participar e organizar diversos eventos relacionados à área de Medicina Veterinária Preventiva, e ser membro de grupos de pesquisas na área.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida e por permitir prestigiar momentos de alegria, conquista e crescimento.

À Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal Martins, orientadora, educadora e amiga. Não tenho palavras para descrever a gratidão sentida e todos os ensinamentos passados, pois estes foram extremamente valiosos e, com certeza, serão carregados para sempre. Obrigada pela confiança e pela motivação fornecida nos momentos mais difíceis, porém decisivos e enriquecedores. É um exemplo de pessoa que será eternamente recordada.

Ao Luiz Carlos Roma Júnior, co-orientador e amigo, agradeço imensamente pelo carinho e confiança. Profissional incrível e de inteligência ímpar, contribuiu para meu desenvolvimento e aperfeiçoamento. Obrigada por me fazer enxergar os diversos caminhos que poderiam ser seguidos para alcançar o mesmo objetivo, aprendi que o melhor não seria o mais rápido, mas sim aquele que fosse mais bem traçado.

Aos professores Dr. Luiz Augusto do Amaral, Dr. Arlindo Saran Netto e Dra. Angela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho pelas construtivas considerações sugeridas ao meu trabalho. O empenho, a paciência e a sabedoria transmitida por vocês contribuíram para o melhor desempenho desta dissertação.

À Profa. Dra. Maria da Glória Buzinaro, mãe de alma e coração, um exemplo de generosidade, amizade, carinho e fé. Eterna orientadora e amiga está em meu pensamento onde quer que eu esteja. Seu apoio e admiração foram essenciais em toda minha trajetória pela FCAV e serei grata eternamente. Sentirei saudades das nossas conversas e das longas risadas diárias, porém tenho a certeza que a distância não será empecilho para nossos alegres encontros.

Ao Prof. Dr. Luiz Francisco Prata, co-orientador e educador, obrigada pelos diversos ensinamentos e pela paciência. Tenho grande admiração pela pessoa que é e pelo grande mestre que representa.

A todos os demais professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, que de alguma maneira influenciaram em minha formação pessoal e profissional.

Ao meu pai José e minha mãe Maria Vera, por me darem sentido e força em todas as batalhas. Se hoje agradeço por um título conquistado, com certeza vocês foram a base e o impulso de tudo. Obrigada por acreditar em mim, fiz tudo isso valer a pena. Vocês são meus heróis. Amo muito vocês.

Ao meu irmão Pedro e minha cunhada Andressa, por me darem força em todos os momentos de minha jornada. Por fazer valer a pena todo o esforço despendido e ter a certeza que caminhamos no caminho certo.

Ao Henrico, namorado, amigo, cúmplice e companheiro. Obrigada por transformar momentos difíceis em cargas suaves, e momentos escuros em situações claras e simples. Como te admiro! Você acompanhou o meu caminho desde o início, compartilhando minhas angústias, sofrimentos, dificuldades, alegrias e conquistas. Seu apoio foi essencial e seu impulso, indispensável. Obrigada por fazer parte de todos os momentos da minha vida, obrigada por caminhar junto comigo. Te amo.

Aos pesquisadores, estudantes e funcionários da APTA Centro Leste de Ribeirão Preto, por todo apoio à realização deste projeto de pesquisa. Todos são profissionais competentes e dedicados, que estão sempre em busca da melhoria da qualidade do leite produzido no Brasil.

A todas as meninas da República Choppana e a Cláudia por ensinar o que realmente significa companheirismo e amizade. Família que tive a oportunidade de escolher, cada uma de vocês será eternas irmãs. Amo vocês.

A Chikinha, Lary, Bola, Tainá e Kadu, vocês são incríveis! Não tenho o que dizer senão muito obrigada por tudo! Nossa amizade vai muito além da pós-graduação, nossa sintonia é tão boa que me faz sofrer de saudades ao pensar que não estamos mais juntos diariamente. Irmãos, vocês são eternos!

A todos os demais colegas pós-graduandos e técnicos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

À CAPES pelo auxílio financeiro fornecido para a realização do meu trabalho e pela bolsa de estudos concedida.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| RESUMO..... | ii |
| ABSTRACT..... | iii |
| LISTA DE TABELAS..... | iv |
| LISTA DE FIGURAS..... | v |
| 1.INTRODUÇÃO | 1 |
| 2.REVISÃO DE LITERATURA..... | 2 |
| 2.1. Qualidade do leite..... | 2 |
| 2.2. A CCS e seu Impacto na produção..... | 4 |
| 2.3. Limites legais na CCS..... | 8 |
| 2.4. Métodos utilizados para a CCS..... | 10 |
| 2.5. Método de referência para determinar a CCS..... | 11 |
| 2.6. Método padrão para determinar a CCS..... | 11 |
| 2.7. Método alternativo para a CCS: Ekomilk Scan® | 12 |
| 2.8. Correlação de métodos na CCS..... | 14 |
| 3. OBJETIVOS..... | 15 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS..... | 15 |
| 4.1. Uso de conservante na amostra..... | 17 |
| 4.2. Temperatura de armazenamento..... | 17 |
| 4.3. Tempo entre a colheita e a análise..... | 17 |
| 4.4. Raças..... | 18 |
| 4.5. Composição do leite..... | 18 |
| 4.6. Repetibilidade..... | 18 |
| 4.7. Reprodutibilidade..... | 19 |
| 4.8. Comparação de métodos..... | 19 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 20 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 28 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 29 |
| 8. REFERÊNCIAS..... | 29 |

AValiação DOS RESULTADOS DAS CONTAGENS DE CÉLULAS SOMÁTICAS OBTIDAS PELO EQUIPAMENTO EKOMILK SCAN® E SUAS CORRELAÇÕES COM OUTROS MÉTODOS DE ANÁLISE

RESUMO - O advento de métodos alternativos para CCS se torna ferramenta útil aos produtores para o monitoramento da saúde da glândula mamária e também da produção animal. Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar o equipamento Ekomilk Scan® como alternativa para a contagem de células somáticas no leite, testando sua eficácia e confiabilidade além de compará-lo ao método oficial e de referência. Para isso foram colhidas amostras individuais de leite de vacas de várias idades e diferentes estágios de lactação, na região nordeste do Estado de São Paulo. Foram testadas as variáveis inerentes ao equipamento (repetibilidade e reprodutibilidade), e aquelas possíveis influenciadoras do resultado (uso de conservante, temperatura, tempo entre coleta e análise, raça e composição do leite). As variáveis dependentes foram submetidas à análise de variância através do Sistema SAS e pelo teste dos quadrados mínimos. Os resultados indicaram que o Ekomilk Scan® é um equipamento preciso, pois apresenta resultados concisos quando realizados independentemente porém sob as mesmas condições. Para a realização das análises não se deve acrescentar conservante nas amostras e devem ser realizadas no mesmo dia de coleta apesar da temperatura na qual a amostra se encontra não influenciar significativamente os resultados. Além disso, ao se comparar o Ekomilk Scan® a outros métodos de análise, verificou-se boa correlação dos resultados com a microscopia ótica. Dessa forma, conclui-se que o equipamento testado é preciso e confiável, podendo ser uma boa alternativa no monitoramento da CCS em unidades produtivas.

Palavras-chave: monitoramento, saúde da glândula mamária, método alternativo, contagem de células somáticas.

RESULTS EVALUATION OF SOMATIC CELL COUNT OBTAINED BY EKOMILK SCAN[®] AND CORRELATIONS WITH OTHER METHODS OF ANALYSIS

ABSTRACT - The advent of alternative methods for SCC becomes useful tool for producers to monitor the health of the mammary gland and also the livestock. The present study aimed to evaluate the equipment Ekomilk Scan[®] as an alternative to somatic cell count in milk, testing their effectiveness and reliability as well as compare it to the standard and reference methods. For this were collected individual cow milk samples of various ages and different stages of lactation in northeastern state of São Paulo region. Variables inherent to the equipment (repeatability and reproducibility), and those that are merely influencing the outcome (use of preservative, temperature, time between collection and analysis, breed and milk composition) were tested. The dependent variables were analyzed using the SAS System and the test of least squares. The results indicated that the Ekomilk Scan[®] is precise and presents concise results when performed independently but under the same conditions. To perform the samples should not add preservative and the analyses should be conducted on the same day of collection despite the temperature at which the sample is not significantly influence the results. Furthermore, when comparing the Ekomilk Scan[®] to other methods of analysis, that the results showed good correlation with the optical microscope method. Thus, it is concluded that the equipment tested is accurate and reliable and may be a good alternative for monitoring of SCC in production units.

Keywords: monitoring, udder health, alternative method, somatic cell count.

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|---------------|
| 1. Tipos de células no leite normal e com mastite..... | 4 |
| 2. Relação entre CCS do tanque, porcentagem de quartos infectados e porcentagem de perdas de produção de leite..... | 7 |
| 3. Valores médios da contagem de células somáticas em leite de tanques (CCST) em diferentes países..... | 7 |
| 4. Limites legais para contagem de células somáticas em leite de tanques (CCST), praticados por países produtores de leite..... | 9 |
| 5. Requisitos de CCS para o leite cru resfriado no Brasil, Instrução normativa nº 62 – MAPA | 9 |
| 6. Variável analisada, número de amostras, comparação, método de contagem de células somáticas e análise utilizada no experimento. | 16 |
| 7. Média da Contagem de Células Somáticas ($\times 1.000 \text{ céls.mL}^{-1}$) de acordo com a temperatura de armazenamento do leite..... | 21 |
| 8. Efeito do tempo entre colheita e análise na média da contagem de células somáticas ($\times 1.000 \text{ céls.mL}^{-1}$)..... | 22 |
| 9. Análise da influência dos componentes do leite sobre o resultado da CCS realizada pelo Ekomilk Scan® | 25 |
| 10. Valores médio, máximo, mínimo da contagem de células somáticas em $\times 1.000 \text{ céls.mL}^{-1}$ e o coeficiente desta variação de acordo com a faixa de CCS..... | 26 |
| 11. Comparação de métodos na contagem de células somáticas. Valores expressos em $\times 1.000 \text{ céls.mL}^{-1}$ | 27 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| 01. Coeficientes de correlação (R) dos métodos de análise das amostras de leite de vacas Jersey, Gir, Holandês e Mestiço em relação à citometria de fluxo e o Ekomilk Scan [®] . | 24 |

1. INTRODUÇÃO

O leite ocupa lugar de destaque na economia brasileira, com o país ocupando boa colocação entre os maiores produtores mundiais. O Brasil é o quarto maior produtor mundial de leite, atrás dos Estados Unidos, Índia e China (FAO, 2013). Dentre os estados brasileiros, os maiores produtores de leite, em ordem decrescente são Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e Goiás (IBGE, 2013).

No entanto, o aumento da competitividade do setor leiteiro no Brasil exige que se ultrapassem grandes desafios quanto à apropriação de conhecimentos e à adoção de tecnologias com foco na qualidade do leite e seus derivados, o que dá suporte à conquista e manutenção de mercados, interno e externo. Para tanto, deve-se priorizar a eficiência do processo produtivo, o bem estar animal, a ética e a rastreabilidade, dentre outros aspectos, sem, negligenciar o equilíbrio agroecológico, o impacto social e o retorno econômico.

O aumento da produção veio atrelado à necessidade da melhoria da qualidade do produto. É prática cada vez mais frequente o pagamento do leite por critérios como porcentagem de sólidos, composição e qualidade higiênica e, não apenas pelo volume ou peso. No que diz respeito à qualidade higiênica do leite os parâmetros usados com maior frequência são a Contagem Bacteriana Total (CBT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS). Qualidade tem sido um tema recorrente quando se decide investir em agregação de valor e, por consequência, em alimentos saudáveis e seguros. Ela está diretamente ligada à competitividade e à rentabilidade e é de fundamental importância para a conquista e manutenção dos mercados.

Uma forma de se mensurar a qualidade do leite é por meio dos resultados da CCS, que pode ser feita por métodos que expressam os resultados de forma qualitativa ou quantitativa. No Brasil, há uma rede de laboratórios de referência para a análise do leite, porém, os procedimentos de colheita, armazenamento, envio de amostras, análises e remessa dos resultados demandam ações que levam tempo. Dessa forma, dificulta ao produtor o acesso rápido aos resultados o que favorece a tomada de decisões com relação a possíveis mudanças na prática de manejo,

particularmente, da promoção da saúde do rebanho com foco na melhoria da qualidade do leite.

Neste contexto, métodos alternativos de contagem de células somáticas mais acessíveis, menos laboriosos e de fácil manipulação pelos produtores e/ou por pequenos laticínios constituem-se de grande valia para o monitoramento da produção leiteira, para a melhoria da saúde da glândula mamária da vaca e consequentemente da qualidade do leite produzido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Qualidade do leite

A qualidade do leite pode ser definida pela ausência de agentes físicos, químicos ou biológicos que apresentem riscos à saúde do consumidor, tais como substâncias estranhas, antimicrobianos, pesticidas, herbicidas, patógenos e toxinas, entre outros. No que diz respeito à qualidade nutricional, os teores de gordura, proteína, lactose, vitaminas e minerais devem corresponder à própria natureza do produto (SALOMÃO, 2012).

Durante alguns anos no Brasil, a qualidade do leite cru não tinha a devida importância. Com o passar dos anos isso foi mudando e houve alguns avanços na cadeia produtiva do leite, entre eles, a profissionalização do produtor, a granelização da captação de leite, os investimentos em modernização e ampliação do parque industrial, a regulamentação do setor pelos órgãos oficiais e o monitoramento da qualidade do leite por parâmetros internacionais. Em decorrência desses fatores, as melhorias vêm acontecendo como é o caso das mudanças na produção e produtividade, e as melhorias na qualidade do leite começaram a ser observadas (CERQUEIRA et al., 2012).

Com a necessidade de melhoria da qualidade do leite e sua comercialização, foi criado no ano de 1998, pelo Governo Federal, o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), que após várias discussões entre os setores produtivos criou a proposta da Instrução Normativa (IN) 51/2002 (BRASIL, 2002),

que teve como principal objetivo a atualização do setor para a melhoria de qualidade da matéria prima e redução dos seus custos de colheita.

Em 2011, devido à dificuldade em cumprir os prazos estabelecidos pela IN 51, foi criada a IN 62 (BRASIL, 2011), que entre outras ações revogou os prazos da IN 51 e estabeleceu novos limites para alguns requisitos, como a contagem de células somáticas, contagem bacteriana total, entre outros, referentes ao leite cru refrigerado produzido nas propriedades rurais do território nacional e destinado à fabricação de leite pasteurizado para consumo humano direto ou para transformação em derivados lácteos em todos os estabelecimentos de laticínios submetidos à inspeção sanitária oficial.

De acordo com a IN 62, é obrigatória a análise de amostra de leite de cada produtor que destina seu produto para estabelecimento sob inspeção federal, em laboratório oficial, para determinação da composição do leite (teores de gordura, proteína, sólidos totais), contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) (BRASIL, 2011).

Para a análise de CCS foi definido pela IN 62 um limite de 600 mil céls.mL⁻¹ (BRASIL, 2011), que apesar de acima dos padrões internacionais (média de 200 mil céls.mL⁻¹) já é um grande avanço para o setor visto que tal análise proporciona o conhecimento da qualidade do leite bem como a saúde da glândula mamária.

As variáveis de avaliação da qualidade do leite são amplamente utilizadas em outros países. Nos EUA (Estados Unidos da América), por exemplo, a determinação da CCS começou a ser realizada em 1967 e, o primeiro limite legal foi definido em 1986.

Paralelamente à iniciativa governamental de monitorar a qualidade do leite por meio da realização de análises periódicas em laboratórios oficiais, as indústrias e os produtores também aderiram a essa prática buscando monitorar a produção visando incrementos e melhores índices produtivos.

A CCS é um dos parâmetros mais importantes para a avaliação de programas que monitoraram a saúde do úbere e a qualidade do leite, sendo utilizada pelas indústrias, na maioria dos países, como um dos critérios para o pagamento por qualidade (GODKIN, 2000; FONSECA, 2001).

Rysanek e Babak (2005) registram que como a CCS do leite tem sido

empregada como critério de pagamento por qualidade, produtores utilizam-na crescentemente como uma ferramenta de gestão e de monitoramento da qualidade estando diretamente relacionada com programas de redução de perdas de produção e oportunidades de maior remuneração do leite.

2.2. A CCS e seu impacto na produção

As células somáticas presentes no leite compreendem as células alveolares de descamação (2 a 20% do total), sendo as demais as células de defesa (80 a 98%) conhecidas como leucócitos ou células da série branca do sangue (macrófagos, neutrófilos e linfócitos), que passam para o leite em resposta a uma agressão sofrida pela glândula mamária. Quando há uma resposta inflamatória da glândula mamária, ocorre um aumento do número de neutrófilos. (Tabela 1), esta resposta é conhecida como mastite (BRITO, 1999; SANTOS; FONSECA, 2007).

Tabela 1. Tipos de células no leite normal e com mastite.

| Tipo | Leite normal (%) | Leite com mastite (%) |
|---------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Macrófagos | 45-90 | 10-35 |
| Neutrófilos | 3-25 | 50-90 |
| Linfócitos | 7-35 | 1-20 |
| Células epiteliais | 0-2 | 0-2 |

FONTE: Monardes (1994).

Como resultado da inflamação, as paredes dos vasos sanguíneos se tornam dilatadas e diversas substâncias do sangue passam junto com os leucócitos para o leite. Entre essas substâncias estão íons de cloro e sódio, que deixam o leite com sabor salgado, e enzimas que causam alterações na proteína e na gordura. Devido às lesões no tecido mamário, as células secretoras se tornam menos eficientes, isto é, com menor capacidade de produzir e secretar o leite. Isso implica na perda de qualidade e na redução da produção do animal (BRITO, 1999; SANTOS; FONSECA, 2007).

A mastite é uma das principais doenças do rebanho leiteiro no mundo, causando prejuízo para o produtor, afetando diretamente a indústria com a redução na qualidade e no rendimento dos derivados e ainda coloca em risco a saúde da população consumidora. (CARVALHO et al., 2007).

Várias alterações ocorrem em razão da mastite nos aspectos da composição e nas características físicas e químicas do leite produzido, essas mudanças se devem ao fato de ocorrerem alterações na permeabilidade vascular (processo inflamatório), lesões do epitélio secretor (responsável pela síntese de componentes do leite) e ação de enzimas de origem somáticas e presença de micro-organismo na glândula mamária (SANTOS; FONSECA, 2007).

Na indústria, um dos maiores problemas com a elevação da CCS é a redução no rendimento industrial, resultando em problemas como aumento do tempo de coagulação do leite, diminuição da firmeza do coágulo, maior perda de componentes do leite para o soro, menor rendimento industrial, maior prolongamento do tempo de coagulação, defeitos de textura e alteração das características organolépticas (SANTOS et al., 2003). Segundo demonstrado por Andreatta (2006) o queijo Minas frescal produzido com leite contendo mais de 400 mil céls.mL⁻¹ apresentou menor rendimento quando comparado ao queijo produzido com leite contendo até 200 mil céls.mL⁻¹. Os altos valores de CCS comprometem a produção dos derivados do leite, como é o caso dos queijos que sofrem alterações na coagulação e no conteúdo de sólidos no soro o resultado é um produto com alterações sensoriais e defeitos de textura. Quanto ao leite em pó, a CCS elevada compromete o sabor e reduz o tempo de prateleira.

Cada vez mais aumenta a demanda pelos consumidores por produtos lácteos de alta qualidade. Essa demanda é sentida pela indústria que, por sua vez, necessita de matéria prima (leite cru) de qualidade. Tal demanda, juntamente com a pressão do mercado internacional por alimentos com reconhecida qualidade e segurança do ponto-de-vista da saúde pública, são os principais fatores que direcionam o amplo uso da CCS no leite.

O método mais utilizado para avaliar a saúde da glândula mamária é a CCS, que tem sido muito utilizada pelos produtores de leite de diversos países como indicativo de qualidade de leite do seu rebanho e para diagnosticar a mastite

subclínica. Ela pode ser feita pelo método direto que consiste na contagem de células no leite por meio de um microscópio ou contadores celulares eletrônicos. Leite com CCS acima de 200 mil céls.mL⁻¹ demonstra que está ocorrendo mastite subclínica ou que o quarto mamário está se recuperando de uma infecção (SANTOS; FONSECA, 2007).

O controle individual da CCS no leite, quando realizado mensalmente, auxilia na construção de um histórico do animal, a partir dos cálculos das taxas de cura, novas infecções, prevalência de mastite subclínica, identificação dos animais com mastite crônica e estimativa do impacto da CCS individual no leite de conjunto. Ou seja, a reunião desses dados é uma ferramenta fundamental para um programa de controle da mastite (COELHO, 2013).

Também é possível avaliar o grau de infecção da glândula mamária de cada animal por meio do California Mastitis Test (CMT) e do leite de conjunto ainda na propriedade pelo Wisconsin Mastitis Test (WMT), estimando assim, a incidência da mastite no rebanho como um todo (UFLA, 2012).

A avaliação da CCS no tanque (CCST) da propriedade é uma ferramenta importante para promover medidas de prevenção e controle da mastite, melhorando assim a saúde do rebanho e a qualidade do leite (MULLER, 2002). A CCS do leite de conjunto de rebanhos leiteiros tem se tornado cada vez mais disponível para os produtores brasileiros, transformando-se em uma informação bastante difundida e de fácil obtenção. A maioria das cooperativas, laticínios e demais empresas captadoras de leite realizam rotineiramente análises de CCS e composição do leite de rebanhos para fins de pagamento por qualidade. Do lado do produtor, a CCS do leite de conjunto é recebida mensalmente e pode ser uma ferramenta útil para monitoramento da saúde da glândula mamária do rebanho (SANTOS, 2007).

Alguns estudos determinaram que existe forte relação entre a CCS do tanque e a porcentagem de quartos mamários infectados no rebanho (Tabela 2), e que o aumento da CCS no tanque é reflexo direto do aumento do número de quartos infectados, o que leva a aumento nas perdas de produção (FONSECA; SANTOS, 2000).

Tabela 2. Relação entre CCS do tanque, porcentagem de quartos contaminados e porcentagem de perdas de produção de leite.

| CCS do tanque (CCST) | % de quartos mamários infectados | % de perdas de produção |
|---------------------------------|---|------------------------------------|
| 200.000 | 6 | 0 |
| 500.000 | 16 | 6 |
| 1.000.000 | 32 | 18 |
| 1.500.000 | 48 | 29 |

Fonte: NMC, 1996.

A CCST é uma medida indireta da prevalência de mastite no rebanho (SCHUKKEN et al., 1993; WILSON et al., 1997; SARGEANT et al., 1998; WELLS; OTT, 1998; NMC, 1999; SMITH; HOGAN, 2001). Diversos países realizam o monitoramento da CCST dos seus rebanhos, tendo em vista que é uma ferramenta extremamente valiosa na estimativa das perdas na produção de leite e utilizada como um indicativo da qualidade do leite produzido. Na Tabela 3 estão descritos os valores médios da CCST em diferentes países.

Tabela 3. Valores médios da contagem de células somáticas em leite de tanques (CCST) em diferentes países.

| PAÍS | CCST (x mil céls.mL⁻¹) |
|----------------|--|
| Suíça | 112 |
| Noruega | 125 |
| Finlândia | 129 |
| Reino Unido | 160 |
| Nova Zelândia | 180 |
| Suécia | 200 |
| Dinamarca | 247 |
| Canadá | 250 |
| Alemanha | 276 |
| Irlanda | 300 |
| Japão | 300 |
| Estados Unidos | 350 |
| Israel | 382 |

Fonte: Franks (2001).

No Brasil, Machado et al. (2000) avaliaram 4.785 amostras da CCST do leite de rebanhos localizados nos Estados de São Paulo e no sul de Minas Gerais, e observaram média e desvio-padrão de 505 mil e 593 mil céls.mL⁻¹, respectivamente. Assim, a CCST constitui um importante recurso para o monitoramento da qualidade do leite e da saúde da glândula mamária nos rebanhos, por indicar a ocorrência de mastite subclínica e de possíveis perdas econômicas dela decorrentes (SANTOS; FONSECA, 2007).

A análise do leite do tanque é mais barata, menos trabalhosa e mais rápida de obter, também é uma excelente ferramenta de trabalho linha para os profissionais e técnicos que dão assistência técnica à propriedade (JAYARAO; WOLFGANG, 2003).

Dessa forma, a CCS tem sido utilizada em países desenvolvidos há mais de 35 anos, desde o surgimento de equipamentos eletrônicos que tornaram esta prática acessível aos produtores (FONSECA; SANTOS, 2000; GODKING, 2000; SANTOS, 2001).

2.3. Limites legais na CCS

Os limites legais de células somáticas foram estabelecidos de maneira progressiva. Schukken et al. (1992), Dekkers, Erp e Schukken (1996) e Sargeant, Chukken e Leslie (1998) citam que em Ontário, Canadá, o programa começou com um limite de 800 mil céls.mL⁻¹ e foi reduzido para 500 mil céls.mL⁻¹ ao longo de 6 anos. Segundo Schukken et al. (1992) e Schukken et al. (1993), nos Estados Unidos, o limite legal foi reduzido de 1.000 mil céls.mL⁻¹ para 750 mil céls.mL⁻¹ em julho de 1993.

Dessa forma, desde 1992 autoridades sanitárias de diversos países têm estabelecido limites regulatórios para CCS que, inclusive, estão vigentes atualmente (Tabela 4).

Tabela 4. Limites legais para contagem de células somáticas em leite de tanques (CCST), praticados por países produtores de leite.

| Países | Limite CCST (x mil céls.mL⁻¹) | Início da Vigência |
|-----------------------|---|-------------------------------|
| Estados Unidos | 750 | 1993 |
| Canadá | 500 | 1994 |
| Nova Zelândia | 400 | 1995 |
| União Européia | 400 | 1992 |

Fonte: Monardes (1998).

O PNMQL por meio da IN62/ MAPA (BRASIL, 2011), estabeleceu a CCS como um dos critérios de avaliação da qualidade do leite cru refrigerado. A modernização do setor aconteceria em diferentes etapas, permitindo a adaptação de produtores e indústrias aos novos critérios.

Na tabela 5, observa-se que o limite legal de CCS estabelecido no Brasil nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste em julho de 2008 de 750 mil céls.mL⁻¹ foi reduzido para 600 mil céls.mL⁻¹ em janeiro de 2012. Todavia, atendendo demandas dos produtores e indústrias de laticínios, no sentido que esse valor foi considerado parâmetro muito rígido, fator que dificultaria o enquadramento da maioria dos produtores, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) postergou o limite de CCS para junho de 2014 (BRASIL, 2011).

A nova regulamentação exige maior especialização do produtor e adequação da cadeia produtiva do leite às normas estabelecidas.

Tabela 5. Requisitos de CCS para o leite cru resfriado no Brasil, IN nº 62/2011 – MAPA.

| CCST x mil céls.mL⁻¹ | | | |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| A partir de | A partir de | A partir de | A partir de |
| Jul/2008 até Dez/2011 ¹ | Jan/2012 até Jun/2014 ¹ | Jul/2014 até Jun/2016 ¹ | Jul/2016 ¹ |
| Jul/2010 até Dez/2012 ² | Jan/2013 até Jun/2015 ² | Jul/2015 até Jun/2017 ² | Jul/2017 ² |
| Máximo 750 | Máximo 600 | Máximo 500 | Máximo 400 |

Fonte: BRASIL (2011).

¹ Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste

² Regiões Nordeste e Norte

2.4. Métodos utilizados para a CCS

A determinação da contagem de células somáticas em leite cru pode ser realizada por métodos diretos ou indiretos, permitindo que sejam feitas análises de leite ainda na unidade produtiva e em laboratórios que usam equipamentos capazes de analisar várias amostras em um curto período de tempo. Como exemplo dos métodos indiretos, tem-se: o California Mastitis Test (CMT) que é bastante simples, possível de ser realizado na fazenda sendo considerado um dos primeiros métodos indiretos para determinação da CCS (RODRIGUES, 2008). Consiste em estimar a CCS por meio da reação de um detergente aniônico neutro que atua rompendo a membrana das células presentes na amostra de leite liberando o material nucleico, resultando em uma mistura de alta viscosidade. Os resultados são avaliados em função do grau de gelatinização sendo expressos em escores (FONSECA; SANTOS, 2000). De acordo com Cosulati (2004), a partir de 400 mil céls.mL⁻¹, já poderá haver uma alteração na viscosidade do leite.

O aprimoramento do CMT resultou no Wisconsin Mastitis Test (WMT) que usa o mesmo reagente do CMT diluído em 1:1 em água destilada, e tem o resultado expresso em milímetros, que está correlacionado com a contagem de células somáticas. O Somaticell[®] é uma adaptação do Wisconsin Mastitis Test (WMT), sendo um teste qualitativo por essência, mas apresenta a conversão do volume restante da mistura leite e reagente para valores quantitativos em céls.mL⁻¹ (PEREIRA NETO, 2011).

Já em relação aos métodos diretos, tem-se a contagem de células somáticas por microscopia direta e os analisadores eletrônicos. Estes fazem a contagem direta das células, geralmente com o uso de corantes que tingem as células deixando-as diferenciadas para a contagem das células em si ou de estruturas celulares (RODRIGUES, 2008). A Rede Brasileira de Controle da Qualidade do Leite (RBCQL) emprega equipamentos eletrônicos que usam diversas técnicas de análises para determinar a contagem de células somáticas no leite cru, sendo usados como alternativa para facilitar o controle leiteiro e a avaliação da qualidade do leite (SILVEIRA et al., 2005). Dentre as tecnologias usadas pelos equipamentos

eletrônicos, tem-se: a citometria de fluxo usada pelos equipamentos Somacount (Bentley Instruments Inc.) e Fossomatic (FOSS Denmark), a técnica da espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier usada no equipamento MilkoScanTM FT+ (FOSS Denmark) (PEREIRA NETO, 2011).

2.5. Método de referência para determinar a CCS

A metodologia de referência para a CCS no leite é a microscopia direta, que determina a quantidade real de células somáticas presente no leite.

O método microscópico descrito por Prescott e Breed em 1910 é clássico e baseia-se em um determinado volume de leite em uma área conhecida. Uma alíquota de leite (0,01 mL) é distribuída homogeneamente em uma área delimitada (1cm²) na superfície de uma lâmina com o auxílio de uma pipeta automática calibrada. Após a secagem, as lâminas são coradas e, em seguida, contadas por meio da observação em um microscópio óptico (MARSHALL, 1992). O número de células contadas na área delimitada é multiplicado pelo fator de trabalho do microscópio e expresso em número de células por mililitro (IDF, 1991).

Tal técnica demanda muito tempo para ser realizada, com ampla variabilidade de interpretação entre diferentes observadores, não sendo o método mais recomendado para monitorar a qualidade do leite de rebanhos com grande número de animais. Porém, ele torna-se necessário para a calibração de outros métodos, tornando-se bem atual (PRATA, 1998). É o teste padrão, reconhecido pelo International Dairy Federation (IDF), apesar de laborioso, cansativo (induz a erros de contagens) e não muito apropriado para grande número de amostras (GODKIN, 2000).

2.6. Método padrão para determinar a CCS

Os equipamentos eletrônicos são utilizados pela Rede Brasileira de Controle da Qualidade do Leite do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento como

metodologia padrão e como alternativa para facilitar o controle leiteiro e a avaliação da qualidade do leite. Os analisadores eletrônicos baseiam-se em diferentes técnicas de análises, como a contagem de impulsos elétricos gerados pela passagem de partículas entre dois eletrodos, a fluorescência óptica e a citometria de fluxo (BABAK; RYSANEK, 1999).

Na citometria de fluxo as células coradas são carregadas por um líquido sendo excitadas por um feixe de laser. Os núcleos corados emitem, por fluorescência, impulsos luminosos que são ampliados por um foto multiplicador, contados e convertidos em concentração de células somáticas (CECALAIT, 1993). Na técnica, uma alíquota da amostra, pré-aquecida a 40°C, é aspirada para o interior do equipamento e conduzida a uma seringa contendo corante tampão. O instrumento requer o uso do corante fluorescente brometo de etídio para corar os DNAs das células. Em seguida, 50µL da amostra são conduzidos por um fluido carreador para o citômetro de fluxo, onde recebem a incidência do raio laser. A luz emitida passa por uma série de filtros ópticos e lentes focalizadas em comprimentos de onda adequados e é captada como pulso elétrico. Este pulso é ampliado, filtrado e convertido em contagem de células somáticas (BENTLEY,1997).

Trata-se de um método automático, barato, de fácil processamento e muito usado na maioria dos países desenvolvidos. Os vários modelos se adaptam a diferentes exigências dos laboratórios apesar de algumas limitações como o preço do equipamento e manutenção de acordo com a região (GODKIN, 2000).

2.7. Método alternativo para CCS: Ekomilk Scan^{®*1}

O equipamento Ekomilk Scan[®] é utilizado na contagem de células somáticas como método indireto, alternativo e adicional para o diagnóstico da saúde da glândula mamária e qualidade do leite.

*¹ Como o equipamento Ekomilk Scan[®] foi avaliado no Brasil pelo presente experimento, o mecanismo de ação bem como os pontos positivos e negativos do equipamento foram observados e testados por meio deste estudo. Dessa forma, a literatura a ser descrita abaixo se fundamenta neste estudo realizado.

Trata-se de um equipamento portátil e com preço acessível, o que populariza sua aquisição em diferentes propriedades leiteiras e nos laboratórios de laticínios.

O princípio no qual o método se baseia, é o mesmo aplicado no CMT, envolve a adição de uma solução na amostra de leite, que resulta na formação de gel. Existe uma relação linear entre a viscosidade do gel e a CCS formada durante a interação da solução e do leite.

A viscosidade de um líquido é sua resistência a fluir devida à fricção entre as partículas que o compõem. No leite, é função do número e tamanho de suas partículas e também da temperatura. Segundo Pereira et al. (2001), principalmente as proteínas e a gordura influem na viscosidade do leite, sendo que o efeito da lactose e dos sais é menos importante.

Considerando que a água a 20°C tem uma viscosidade de 1 centipoise, a viscosidade do leite integral à mesma temperatura é de 2,1 e a do leite desnatado de 1,8 (PRATA, 1998). O grau de hidratação das proteínas exerce um importante papel na viscosidade. Tem-se demonstrado que a viscosidade do leite desnatado diminui inversamente com tratamentos térmicos até 62°C, temperatura a partir da qual os tratamentos térmicos aumentam esta viscosidade. Este fenômeno é explicado pela hidratação das proteínas que seguem uma curva parecida (INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS, 2001).

O tamanho e o número de glóbulos de gordura também influem na viscosidade. A homogeneização aumenta a viscosidade do leite; tal fato é explicado pelo efeito de adsorção na superfície dos glóbulos. Quando um glóbulo de 8mm se divide em glóbulos de 1mm, a superfície globular aumenta por um fator de 64. As possibilidades de adsorção superficial aumentam consideravelmente o volume de partículas em suspensão. Além disso, a aglomeração dos glóbulos ou das partículas permite a retenção de um grande volume de água no interior dos espaços intermoleculares e, conseqüentemente, aumentam o volume efetivo do material em suspensão (PEREIRA et al., 2001).

O equipamento Ekomilk Scan[®] se fundamenta no princípio da viscosidade e se utiliza de um surfactante – reagente Ekoprim – que dissolve a membrana das células e, ao entrar em contato com o material genético, adquire uma consistência gelatinosa, elevando a viscosidade do leite. Há uma relação de proporcionalidade

entre a viscosidade do leite e o número de células somáticas no leite testado. Dessa forma, o equipamento mede o tempo de escoamento do leite através do capilar homogeneizador de amostras e determina o número de células somáticas, em conformidade com este tempo. O intervalo de detecção desta contagem fica entre 90 – 1.500 mil céls.mL⁻¹, correspondendo ao tempo de 10 a 50 segundos, respectivamente. Ambos os valores, tempo e a CCS, são emitidos no visor do aparelho.

De acordo com as indicações do fabricante do equipamento, as condições de operação para a análise do leite devem obedecer: temperatura ambiente de 15-30°C, temperatura da amostra do leite e do reagente a ser adicionado de 20 – 22°C e de preferência a amostra deve ser processada no mesmo dia em que for obtida (Manual EkoMilk Scan – Guia do Usuário.).

2.8. Correlação entre métodos de CCS

Para o correto uso dos métodos de diagnóstico alternativos e interpretação dos resultados confiáveis é importante que se conheça algumas de suas características, como a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo e a eficiência (SANTOS; FONSECA, 2007). Para isso, deve-se estabelecer um “padrão ouro”, que por definição é um teste padrão que serve de comparação por parte de outros testes, com a finalidade de avaliar a exatidão dos mesmos, em resultados que nos assegurem o máximo de acertos de forma a estabelecer o diagnóstico real (GORDIS, 2004).

A sensibilidade mede a capacidade do teste em identificar corretamente a doença entre aquelas amostras que a possuem, ou seja, o quão sensível é o teste. A especificidade mede a capacidade do teste em excluir corretamente aqueles que não possuem a doença. Já os valores preditivos, indicam a probabilidade de um resultado positivo (ou negativo) corresponder a uma amostra com mastite (ou sem mastite) (BRITO et al., 2003).

Jeckel et al. (2005) e Hochman et al. (2005) citam dois objetivos distintos que cabe ressaltar quando da colheita e análise de dados a partir de instrumento de

avaliação, seja em atividades clínicas ou de pesquisa: a acurácia e a precisão. A acurácia se refere à capacidade de uma medida ser correta na média. Quando a medida não é acurada, é viciada. A precisão, também conhecida como reprodutibilidade ou confiabilidade, é a capacidade de a medida dar o mesmo resultado (ou um resultado muito semelhante) nas medições repetidas de um mesmo fato. Ambas são qualidades importantes, caso uma destas esteja ausente, os dados tornam-se inúteis, pois não são, necessariamente, fidedignos.

3. OBJETIVOS

- Avaliar os resultados da CCS obtidas pelo equipamento Ekomilk Scan[®] comparando-os com métodos padrão e de referência, e testar as variáveis inerentes.
- Averiguar a eficácia e confiabilidade do equipamento em suas análises a fim de introduzir mais uma opção de método de contagem de células somáticas, contribuindo para o controle da sanidade da glândula mamária e da busca por leite de qualidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise completa dos resultados obtidos pelo equipamento Ekomilk Scan[®], o experimento foi subdividido em etapas para avaliar cada variável com possível interferência no resultado dos testes, sejam elas variáveis inerentes ao equipamento, ou influenciadoras do resultado, além da comparação dos métodos, o que gerou diferentes tipos de colheitas bem como o número de amostras colhidas, o tratamento utilizado e o método de análise estatística empregado (Tabela 6). Dessa forma, foram gerados subitens na metodologia para facilitar o entendimento.

Tabela 6. Variável analisada, número de amostras, comparação, método de contagem de células somáticas e análise utilizada no experimento.

| Variável | N | Comparação | CCS | Análise |
|-------------------|----------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Conservante | 10 | Uso x Não uso Bronopol® | Ekomilk Scan® | Tukey |
| Temperatura | 33 | 4-8°C x 20-22°C x 30-32°C | Ekomilk Scan® | Tukey |
| Tempo | 33 | D0(0hrs) x D1(24hrs) x D2(48hrs) | Ekomilk Scan® | Tukey |
| Raça | 357 | Holandesa x Jersey x Gir x Mestiça | Ekomilk Scan® | Tukey e Coeficiente correlação |
| Composição | 73 | Componentes leite | Ekomilk Scan® | Regressão |
| Repetibilidade | 3 | Amostra repetida 17 x | Ekomilk Scan® | CV* |
| Reprodutibilidade | 10 | Três operadores | Ekomilk Scan® | Tukey |
| Métodos | 122 | Métodos | EkoMilk x Citometria x Microscopia | Tukey |

*Coeficiente de Variação

Como método geral do experimento, foram colhidas amostras individuais de leite de vaca de várias idades e diferentes estágios de lactação provenientes da primeira ordenha completa dos animais, na região Nordeste do Estado de São Paulo. A colheita foi feita no frasco coletor acoplado ao sistema de ordenha mecanizada das propriedades e a amostra obtida foi acondicionada em tubos de plásticos esterilizados. As amostras foram identificadas, acondicionadas em caixas contendo gelo e logo encaminhadas ao laboratório. Algumas análises, como a de temperatura e de tempo entre a colheita e a análise, foram realizadas no laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Unesp, Câmpus de Jaboticabal-SP, e o restante foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite (APTALAC) situado na Agencia Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – APTA - polo Centro Leste, em Ribeirão Preto – SP.

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa estatístico SAS (SAS, 2003), versão 9.2. A Análise de correlação foi realizada através do PROC CORR do SAS, já a análise de variância e a análise de regressão foram realizadas utilizando o PROC GLM do SAS. A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey com nível de significância nível de 5%.

4.1. Uso de conservante na amostra

Nesta etapa, foram colhidas dez amostras de leite de vacas mestiças e posteriormente cada uma desta foi subdividida em dois frascos, sendo que no primeiro foi adicionado o conservante bactericida Bronopol[®], e o segundo não, para ser avaliada a influência do conservante na análise da CCS do leite pelo Ekomilk Scan[®].

4.2. Temperatura de armazenamento

Foram colhidas 33 amostras de leite de vacas mestiças e, posteriormente, cada uma foi subdividida em três frascos, para serem testadas em três diferentes temperaturas de armazenamento através da análise no Ekomilk Scan[®]: refrigeração (2 - 8°C), resfriamento (20-22°C) e ambiente (30-32°C). Para isso, na primeira faixa de variação, as amostras foram conservadas na geladeira, na segunda faixa, no “banho-maria” e na terceira, em temperatura ambiente. Sua análise foi realizada por meio do teste Tukey, considerando nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e as médias foram comparadas entre si.

4.3. Tempo entre a colheita e a análise

Nesta etapa, foram colhidas 33 amostras de leite de vacas mestiças para a avaliação da influência do tempo entre a colheita e a análise do leite, no resultado do Ekomilk Scan[®]. As amostras foram analisadas em três diferentes dias: D0 (mesmo dia da colheita), D1 (24 horas após colheita) e D2 (48 horas após a colheita). Aquelas analisadas com 24h e 48h foram mantidas e conservadas na geladeira, na temperatura de 4-8°C, a espera da realização da análise de acordo com o tempo estipulado no protocolo experimental. Foi utilizado o teste de Tukey com

significância de 5% para analisar estatisticamente a influência da idade da amostra nos resultados.

4.4. Raças

Foram colhidas, um total de 357 amostras de leite de vacas das raças Holandesa, Jersey e Gir e de vacas Mestiça para serem analisadas pelo Ekomilk Scan[®] e Citometria de Fluxo a fim de comparar os resultados obtidos e apurar possíveis variações de acordo com a raça analisada. Os testes estatísticos utilizados foram o teste de Tukey ($p < 0,05$) e a análise do coeficiente de correlação (R^2).

4.5. Composição do leite

Esta fase buscou avaliar os efeitos da composição do leite nos resultados obtidos pelo Ekomilk Scan[®], para isso foram colhidas 73 amostras de leite de vacas da raça Jersey. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando regressão.

4.6. Repetibilidade

A repetibilidade se refere a testes executados em material idêntico a curtos intervalos de tempo, num mesmo laboratório, por um mesmo operador e com o mesmo equipamento (PRATA, 1998). Dessa maneira, foi utilizada para a realização deste teste três amostras oriundas de vacas mestiças, cada uma representando uma faixa de valor de CCS: alta, média e baixa. Cada amostra foi repetida 17 vezes, totalizando 51 análises, através do equipamento Ekomilk Scan[®], sendo outras variáveis mantidas sob as mesmas condições. Foram analisados os coeficientes de variação com a relação das suas médias e o desvio padrão.

4.7. Reprodutibilidade

Refere-se a diferentes laboratórios, com diferentes operadores executando um mesmo teste sobre uma mesma amostra (PRATA, 1998). Assim, as amostras de dez animais mestiços foram analisadas pelo Ekomilk Scan[®] tendo como operadores três pessoas distintas, porém sob as mesmas condições de análise. O resultado de cada operador foi analisado estatisticamente através do teste de Tukey ($p < 0,05$) comparando os resultados com os demais.

4.8. Comparação de métodos

Para esta avaliação foram colhidas 122 amostras de leite de vacas mestiças em frascos tipo Schott com capacidade de 500 mL. Cada amostra foi dividida em três frascos menores para a realização de análises com métodos distintos e posterior comparação dos resultados: Ekomilk Scan[®], Citometria de Fluxo e Microscopia Direta.

As amostras que visavam à análise pela metodologia da citometria de fluxo foram adicionadas do conservante bactericida Bronopol[®] e as mesmas foram encaminhadas ao laboratório da Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em Piracicaba-SP, que utiliza o equipamento Somacount 300 da Bentley Instruments INC, na contagem eletrônica de células somáticas por meio do método de citometria de fluxo (IDF, 1995).

Já as amostras que foram utilizadas para contagem de células somáticas por meio do método da microscopia direta foram mantidas na geladeira, sem adição de conservante, até a realização do teste. Para tal, uma alíquota da amostra de 10 μ L de leite foi distribuída em uma área de um cm^2 em lâmina de microscopia, repetindo o procedimento em suas duplicadas. Em seguida, a lâmina foi seca em temperatura ambiente por 24 horas (PRESCOTT; BREED, 1910). Depois de feito o esfregaço, a lâmina foi submetida à coloração utilizando-se a técnica de Moats (MOATS, 1972). Para efetuar a leitura, foi feita a contagem de células presentes em 120 campos

visuais das lâminas confeccionadas, usando uma objetiva de imersão (100x e objetiva 10x). Para a obtenção do resultado final, obteve-se a média das duas contagens e multiplicou-se a média pelo fator do microscópio previamente calculado, expressando-se o resultado em número de células somáticas por mL de leite (ZENG et al., 1999).

A terceira parte da subdivisão inicial da colheita foi encaminhada para análise pelo equipamento Ekomilk Scan[®]. Para isso, as amostras a serem processadas e o reagente utilizado na análise foram mantidos na faixa de temperatura de 20-22°C, conforme determinações do fabricante. Para a análise, foram adicionados, com o auxílio de uma pipeta, 10 mL da amostra de leite e posteriormente foram adicionados 5mL da solução reagente ao balão misturador do equipamento. Depois das agitações continuadas, o equipamento libera o leite que escorre por um capilar e posteriormente é emitido o resultado. Após isso, foi feita a limpeza do balão com água destilada e agitação por mais um ciclo para assim dar continuidade a uma nova análise pelo equipamento.

Os resultados foram analisados pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, utilizando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para a avaliação do equipamento Ekomilk Scan[®] buscou-se a averiguação completa de todas as fontes de possíveis variações que poderiam interferir no resultado. Variações relacionadas à amostra do leite, como temperatura, dia da análise, raças distintas e composição do leite e outras relacionadas ao equipamento como a repetibilidade do teste e a reprodutibilidade de diferentes operadores na realização da análise. Além disso, o método do Ekomilk Scan[®] foi comparado aos métodos utilizados para a contagem de células somáticas do leite bovino como teste padrão e oficial de referência a fim de verificar a sua confiabilidade.

Amostras de leite cru, destinadas à contagem de células somáticas e a determinação de componentes podem ser analisadas em até 10 dias, se utilizados conservantes e refrigeração (MEYER et al., 2002). Dos conservantes, o mais

utilizado é o Bronopol[®] (BERTRAND, 1996) que possui efeito bactericida (CHEMICAL, 2004). A metodologia de citometria de fluxo possibilitou a utilização de alguns conservantes para auxiliar na preservação da amostra conservando-a e prolongando o tempo entre a colheita e a análise (SUHREN; WALTE, 1998).

Neste experimento foi testada a adição do conservante Bronopol[®] para preservação da amostra e conseqüentemente prolongamento do período entre colheita e realização do teste. No entanto o teste não foi bem sucedido, pois com a adição do bronopol[®] não houve reação entre leite e surfactante Ekoprim devido a presença do conservante. As amostras não apresentaram algum aumento de viscosidade, formando um líquido inconsistente e escasso que impossibilitou a leitura efetuada pelo Ekomilk Scan[®]. Dessa forma, é impossível a utilização do Bronopol[®] com efeitos bactericida e conservante para a realização do teste utilizando o Ekomilk Scan[®].

Segundo Zago et al. (2006), o meio ideal de conservação das amostras de leite por vários dias antes da análise é a refrigeração, com a temperatura a mais próxima possível do ponto de congelamento, sem que as amostras congelem, pois previne a multiplicação de bactérias e todas as mudanças físicas e químicas conseqüentes dessa multiplicação.

No presente estudo, as médias das contagens de células somáticas do leite nas três diferentes temperaturas testadas, não apresentaram diferenças (estatisticamente) significativas ($p > 0,05$) em relação à temperatura de armazenamento das mesmas (Tabela 7).

Tabela 7. Média das Contagens de Células Somáticas de acordo com a temperatura de armazenamento do leite.

| Temperatura | CCS (Ekomilk Scan [®]) x mil céls.mL ⁻¹ |
|-------------|---|
| 2-8°C | 493 ^a |
| 20-22°C | 476 ^a |
| 30-32°C | 536 ^a |

* Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P > 0,05$).

O próprio fabricante do Ekomilk Scan[®] atenta no manual de instruções que a amostra e o surfactante devem estar na temperatura de 22°C, mas o presente estudo mostrou que as amostras podem estar em qualquer temperatura variando de 2 a 32°C, sem efeito significativo no resultado. Porém, não foi estudada a variação da temperatura do surfactante Ekoprim e se este causaria algum efeito significativo sobre as médias.

Como fatores adicionais para manutenção na integridade da amostra e obtenção de resultados confiáveis, Van de Voort et al. (1987), Bertrand et al. (1996), Monardes et al. (1996) e Meyer (2003) citaram que, além da importância da refrigeração do leite, a análise deve ser realizada em no máximo três dias após a colheita das amostras.

Os resultados obtidos mostram que houve efeito visível do tempo, porém esta diferença não foi significativa na análise estatística, talvez por problemas no tipo de análise efetuada e/ou a quantidade de amostras estudadas. Através da análise dos dados com o valor bruto da CCS, verifica-se decréscimo dos valores iniciais da contagem de células somáticas em função do tempo entre a colheita e a análise, como observado na tabela 8.

Tabela 8. Efeito do tempo entre colheita e análise na média da contagem de células somáticas, utilizando o Ekomilk Scan[®].

| Tempo | CCS (Ekomilk Scan[®]) x mil céls.mL⁻¹ |
|------------------------------|--|
| Dia 0 (tempo inicial) | 476 ^a |
| Dia 1 (24horas) | 409 ^a |
| Dia 2 (48 horas) | 321 ^a |

*Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si (P>0,05).

Tais resultados são semelhantes aos encontrados por Meyer et al. (2002) que também observaram o decréscimo dos valores iniciais da CCS quando relacionados à temperatura de armazenamento e do tempo entre a colheita e a análise das amostras de leite. A porcentagem de queda de CCS observada no presente experimento (aproximadamente 32%) é preocupante visto que alguns dos produtores estocam sua produção no período de 48 horas, período no qual a

legislação brasileira permite o armazenamento do produto na propriedade (tanque de expansão), mas que a maioria ultrapassa tal limite de tempo, mantendo o leite por mais que 48 horas na propriedade. Brito et al. (2003) afirmaram que apenas 60% do total das amostras de leite proveniente dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro chegam ao laboratório cinco dias após a colheita. Dessa forma, ao chegar no laboratório, as amostras podem estar com os valores de CCS subestimados.

Como a CCS é um quesito do regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado proposto pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2002), existe a possibilidade dos valores estarem abaixo desse limite e serem classificados erroneamente como adequados pela indústria. Nessa situação, valores subestimados da CCS de amostras de leite do rebanho poderiam causar prejuízos à indústria, caso se adotasse o critério de pagamento pela qualidade com base na CCS. Os valores subestimados da CCS poderiam também causar prejuízos ao produtor, que teria um falso indicador do estado de saúde das glândulas mamárias das fêmeas do rebanho. Assim, recomenda-se realizar a análise do leite no mesmo dia da colheita.

Outra importante característica da amostra é a variação racial. Neste aspecto foi realizado o teste para ver se existe a necessidade de identificação da amostra antes do processamento para constatar se é proveniente de raça pura ou mestiça, ou até mesmo amostras oriundas do tanque de expansão. Não houve efeito estatisticamente significativo da comparação dos resultados obtidos na citometria de fluxo e no Ekomilk Scan[®]. Por outro lado, ao comparar os coeficientes de correlação (R), estes foram superiores para amostras provenientes de animais mestiços, seguidos da raça Gir e Holandês. A raça Jersey foi aquela que apresentou o menor R, o que pode ser explicado pelo alto teor de gordura e proteína na composição do leite destes animais e que conseqüentemente tem grande relação com o aumento da viscosidade e assim, pode ter interferência no resultado apresentado (Figura 1).

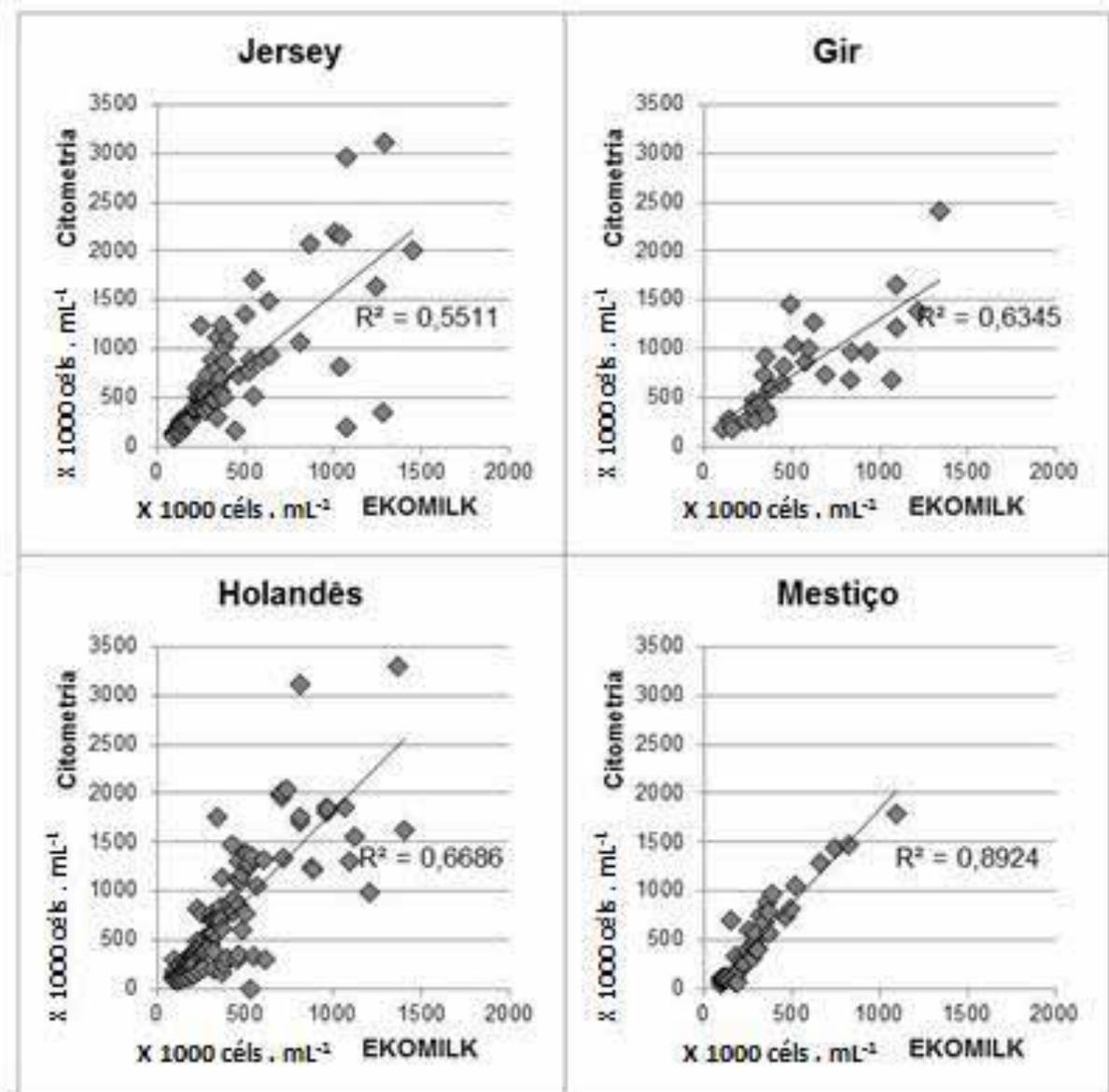


Figura 1. Coeficientes de correlação (R) dos métodos de análise das amostras de leite de vacas Jersey, Gir, Holandês e Mestiço em relação à citometria de fluxo e o Ekomilk Scan[®].

De acordo com os estudos de Maletta (2014), que apresentou a interpretação dos coeficientes de correlação de Pearson nos quais valores de R entre 0,00 a $\pm 0,20$ a correlação é insignificante ou indiferente, entre 0,21 a $\pm 0,40$ fraca ou ligeira, entre 0,41 a $\pm 0,70$ acentuada ou substancial e entre 0,71 a $\pm 1,00$ muito acentuada ou alta, as raças Jersey, Gir e Holandesa do presente experimento apresentam

acentuada correlação entre os métodos de análise enquanto que o mestiço, tal comparação foi considerada alta.

Dohoo; Meek (1982) não recomendaram a inclusão do efeito de raça nos estudos sobre CCS, discordando de Jaartsveld et al. (1983) que observaram diferença significativa entre duas raças avaliadas em seu estudo. Almeida (1996), trabalhando com dados de produção de leite e gordura em vacas da raça Holandesa no Paraná, encontrou significância entre as diferentes raças.

No entanto, ao procurar algum componente do leite no qual pudesse resultar em diferença estatisticamente significativa no resultado apresentado, nada foi significativo a 5% (Tabela 9), confirmando que nenhum componente do leite interferiu significativamente no resultado do Ekomilk Scan®.

Tabela 9. Análise da influência dos componentes do leite sobre o resultado da CCS realizada pelo Ekomilk Scan®.

| Componente | Pr>F |
|------------------------------------|----------------|
| Gordura | 0,3354 |
| Proteína | 0,2156 |
| Lactose | 0,0827 |
| Extrato Seco Desengordurado | 0,2145 |

De acordo com a Tabela 9, destaca-se que apesar do princípio utilizado na metodologia do Ekomilk Scan® se basear na viscosidade do líquido e que componentes como gordura e proteína pudessem influenciar o resultado apresentado pelo equipamento em análise, foi provado que para esta análise de componentes do leite não houve influência significativa no resultado.

Já em relação à avaliação dos fatores intrínsecos ao equipamento Ekomilk Scan®, os resultados foram comparados quando diferentes operadores realizaram a mesma técnica de análise e quando o teste foi realizado repetidas vezes.

A análise da reprodutibilidade visou medir a habilidade do método em produzir resultados consistentes quando realizados independentemente e sob as mesmas condições. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os três

operadores testados já que a média da CCS de cada um esteve bem próxima: operador 1–CCS 378, operador 2–CCS 352 e operador 3–CCS 344 (x mil céls.mL⁻¹).

Tal análise nos conduz a ideia de que o equipamento testado independe do seu operador, ou seja, não requer requisitos mínimos para utilizá-lo e nem necessita de capacitação profissional avançada para habilitar o operador. O que se torna de grande valia para os laticínios, fazendas e laboratórios que podem adquirir o equipamento sem necessidade de mão de obra específica, pois o método não requer grandes exigências, ao menos a obediência ao protocolo a ser seguido.

Ao mesmo tempo, a análise que buscava a consistência dos resultados quando o exame se repetia - a repetibilidade - foi estudada com base em dados de amostras de leite em três faixas de CCS: baixa, média e alta. Através da observação do coeficiente de variação (CV), nota-se baixa variação entre os valores máximo e mínimo na CCS, principalmente em relação à faixa de média e alta contagem de células somáticas. O observado nas amostras com faixa de baixa CCS foi coeficiente de variação maior, que pode ser explicado pela proximidade destas amostras ao limite mínimo detectável para emissão dos resultados do Ekomilk Scan[®]. Tais variações podem ser observadas na tabela 10.

Tabela 10. Valores médio, mínimo, máximo da contagem de células somáticas e o coeficiente desta variação de acordo com a faixa de CCS.

| Faixas de CCS | CCS x mil céls.mL ⁻¹ | | | |
|---------------|---------------------------------|--------|--------|------|
| | Média | Mínimo | Máximo | CV |
| Baixa | 211 | 146 | 254 | 17,2 |
| Media | 765 | 704 | 820 | 4,2 |
| Alta | 1044 | 916 | 1200 | 7 |

CV – coeficiente de variação.

Com baixa variação dos resultados quando o teste é repetido, aliada a ausência de diferença significativa quando se altera os operadores do equipamento, pode-se afirmar que o Ekomilk Scan[®] é um equipamento preciso, pois apresenta resultados concisos quando realizados independentemente, porém sob as mesmas

condições. No entanto, o aparelho deve estar calibrado corretamente caso contrário o teste pode ter alta reprodutibilidade, mas, produzir resultados consistentemente errados.

Por fim, ao se comparar os métodos padrão e de referência com o Ekomilk Scan[®], este diferiu significativamente no valor médio da CCS quando comparado à citometria de fluxo, porém, ao ser comparado com a microscopia direta, apresentou correlação significativa, apesar de todos não atenderem a IN62/2011. (Tabela 11).

Tabela 11. Comparação de métodos na contagem de células somáticas.

| Método | CCS* x mil céls.mL⁻¹ |
|---------------------------------|--|
| Citometria de Fluxo | 700 ^a |
| Ekomilk Scan[®] | 385 ^b |
| Microscopia Direta | 519 ^b |

*Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si (P>0,05), aquelas seguidas com letras diferentes, diferem entre si.

Como o resultado da Citometria de Fluxo e o Ekomilk Scan[®] diferiu significativamente, foi realizada análise para formular alguma equação que adequassem os valores do Ekomilk Scan[®] a fim de conferir correlação alta entre os resultados da Citometria de Fluxo. Assim sendo, foram geradas três equações:

$$1^a) \text{ CITOMETRIA} = - 715,52 + 106,56 \times \text{TEMPO} - 9,66 \times \text{GORD} - 150,08 \times \text{PROT}$$

Neste caso é necessário conhecer os valores de gordura e de proteína da amostra. Para esta equação, o coeficiente de correlação foi de 0,94, que é considerado alto segundo Maletta (2014), e coeficiente de variação foi de 22%. O tempo, inserido nesta equação, é o valor em segundos correspondente ao tempo de escoamento do leite através do capilar do Ekomilk Scan[®], e que apresenta relação linear positiva com a contagem de células somáticas. Esse valor foi utilizado em detrimento a CCS devido à ausência de limite de detecção do tempo, ao contrário da CCS que nos valores abaixo de 90 e acima de 1.500 não são detectados pelo aparelho.

Por outro lado, quando não se conhece uma das variáveis como a gordura ou a proteína, utiliza-se as seguintes equações:

$$2^a) \text{ CITOMETRIA} = - 1076,20 + 105,72 \times \text{TEMPO} - 50,01 \times \text{GORD}$$

$$3^a) \text{ CITOMETRIA} = - 682,88 + 106,57 \times \text{TEMPO} - 169,69 \times \text{PROT}$$

Ambas apresentam coeficiente de correlação 0,94 e coeficiente de variação de 23% na segunda e 22% na terceira equação.

Por fim, a citometria de fluxo – método eletrônico - foi utilizada como padrão ouro para definir a presença da mastite subclínica, utilizando um ponto de corte de 200 mil céls.mL⁻¹ para amostras de leite individuais. A partir desse padrão foram calculadas a sensibilidade, especificidade, e o coeficiente kappa a fim de verificar a concordância entre o teste e o Ekomilk Scan[®]. Como resultado, foi observada sensibilidade de 88,04% e especificidade de 86,21%. Já o índice kappa, para a análise de concordância entre os métodos, foi de 0,68 que, segundo Medeiros et al. (2008), representa concordância substancial entre os testes. Os resultados são superiores aos encontrados por Araújo et al. (2012) que testaram outro método alternativo qualitativo para a contagem de células somáticas (Somaticell[®]) e encontraram sensibilidade e especificidade 70% e 77%, respectivamente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O equipamento Ekomilk Scan[®] é portátil e facilmente transportado para diversos ambientes, permitindo a realização das análises a campo. Podendo ser recarregado em tomadas 12 volts presente em veículos e realiza a contagem de células somáticas em um tempo de 3 a 4 minutos. Além disso, pode armazenar dados e transferi-los ao computador e fazer a impressão. Não exige operador qualificado para realizar as análises, no entanto, requer materiais auxiliares como pipetas, equipamento de banho-maria, água destilada entre outros.

O custo para realizar as análises é baixo, R\$ 0,18 centavos por amostra, gasto quase desprezível quando comparado ao valor da análise por citometria de fluxo, R\$ 1,30/amostra, diferença de mais de 700%. E o preço do equipamento é de R\$ 7.297,00, investimento razoável quando comparado ao custo benefício oferecido.

7. CONCLUSÃO

O equipamento Ekomilk Scan[®]:

- Seus resultados se correlacionam significativamente à metodologia de referência;
- Suas análises precisam ser feitas no mesmo dia da colheita e sem utilização de conservantes, independentemente da temperatura da amostra;
- Pode ser usado como alternativa no monitoramento da CCS em unidades produtivas;
- É preciso e confiável;
- É uma excelente ferramenta para o produtor controlar a saúde da glândula mamária das vacas.

8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. **Estudo dos efeitos de meio ambiente e genéticos sobre as características produtivas de vacas da raça Holandesa na região da Batavo, Estado do Paraná**. 1996. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.

ANDREATTA, E. **Avaliação do rendimento e proteólise do queijo minas frescal produzido com diferentes níveis de células somáticas**. 2006. 110 f. Tese (Doutorado) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

ARAÚJO, V.M.; RANGEL, A.H.N; BEZERRA, K.C.; ANDRADE, K.D.; GUERRA, M.G. **Acta Veterinaria Brasilica**; v. 6, n. 4; p.321-324, 2012.

BABAK, V.; RYSANEK, D. Inter-laboratory trials milk cell counts: comparison of the Fossomatic and Somacount systems. **Milchwissenschaft** , v.54, p.126-128, 1999.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. **Somacount 300 operator's manual**. Chaska: Bentley Instruments Inc., 1997. 116 p.

BERTRAND, J. A. Influence of shipping container, preservative and breed on analysis of milk components of shipped samples. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 1, p. 145-148, 1996.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº51 de 18 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, B e C, colheita e transporte do leite. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 out. 2002. Seção I, p. 13-22.

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite cru refrigerado e do leite pasteurizado, a colheita do leite cru refrigerado e o transporte. Diário Oficial da União, Brasília, D F, 30 dez. 2011. Seção I, p. 6-11.

BRITO, J. R. F. O que são e como surgem as células somáticas no leite. In. MARTINS, C. E.; COSTA, C. N.; BRITO, J. R. F.; YAMAGUCHI, L. C. T.; PIRES, M. de F.A. MINAS LEITE I. Qualidade e produtividade de rebanhos leiteiros, 1999, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Minas Leite I, 1999. p. 35-39.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L. & et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **Revista Ecotoxicol e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

CARVALHO, B. M. A.; CARVALHO, M. L.; ALCÂNTRA, L. A. P.; BONOMO, R. C. F. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. **Revista Eletrônica de Veterinária**, Garça, v. 8, n. 6, 2007.

CECALAIT (Centre d'études et de contrôle des analyses en industrie laitière). **La lettre de CECALAIT**, n.7, 1993.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. **Impacto da qualidade da matéria-prima na indústria de laticínios**. Disponível em: <<http://cultivandotalentos.tempsite.ws/2010/10/impacto-da-qualidade-da-materia-prima-na-industria-de-laticinios/>>. Acesso em: 16 jul. 2012.

CHEMICAL LAND21. **2-BROMO-2-NITRO-1,3-PROPANEDIOL**.2004. Disponível em <http://www.chemicaland21.com/arokorhi/specialtychem/perchem/BRONOPOL.htm> . Acessado em 12 de novembro de 2012.

COELHO, G. P. **A importância da CCS individual no controle da mastite**. 2013. Informativos Técnicos - Itambé. Disponível em <<http://www.itambe.com.br/pagina/2524/a-importancia-da-ccs-individual-no-controle-da-mastite---georgea-paiva-coelho.aspx>> Acessado em 20/01/2014.

COSULATI. **Mamite e Redutase: tire suas dúvidas**. 2004. Disponível em <http://www.cosulati.com.br/int_noticias1.php?ldnews=147> . Acesso em 25 de abril de 2013.

DEKKERS, J.C.M.; ERP, T.V.; SCHUKKEN, Y.H. Economic benefits of reducing somatic cell count under the milk quality program of Ontario. **J. Dairy Sci.**, v.79, n.3,p.396-401, 1996.

DOHOO, I.R.; MEEK, A.H. Somatic cell counts in bovine milk. **Can. Vet. J.**, v. 23, p. 119-125,1982.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food and Agricultural commodities production**.Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acessado em: 23 ago. 2013.

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

FONSECA, L.F.L. Pagamento por qualidade: situação atual e perspectivas para o Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE,5., 2001, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2001. p. 17-29.

FRANKS, B. **International milk quality**. 2001 Disponível em: <<http://www.2nzdairy.co.nz-.82/suppliernews/july2001.pdf>> Acesso em: 24 out.2013.

GODKIN, A. Qualidade do leite ao redor do mundo: o papel da CCS. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2000, Curitiba. **Anais...**Curitiba, 2000. p.09-20.

GORDIS, L. **Avaliação da validade e da confiabilidade dos testes diagnósticos e de rastreamento**. Editora Revinter, 2004. p. 63-81

HOCHMAN, B.; NAHAS, F. X.; OLIVEIRA FILHO, R. S.; FERREIRA, L. M. Desenhos de Pesquisa. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 20, supl. 2, p. 2-9, 2005.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Estados. Disponível em:<ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/tabelas_pdf/tab06.pdf>. Acessado em: 23 ago. 2013.

INDÚSTRIA DE LATICÍNIOS. **EQA 5216**. Universidade Federal De Santa Catarina. 2001. Capítulo I Disponível em: <http://www.enq.ufsc.br/disci/eqa5216/material_didatico/definicao_de_leite.pdf>acesado em 21/03/2014

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, Milk. **Enumeration of somatic cells. IDF Standard 148A**, Brussels: International Dairy Federation, 1991.

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

JAARTSVELD, F.H.J.; PUFFELE, E. van; OSKAM, J.; TIELEN, M.J.M., VERSTEGEN, M.W.A.; ALBERS, G.A.A. Somatic cell counts in milk of dairy cows in relation to stage of lactation, age, production level and presence of pathogens. **Milk Dairy J. Neth**, v. 37, p.79-90, 1983.

JAYARAO, B. M. E D.R. WOLFGANG. Bulk-tank Milk analysis: A useful tool for improving milk quality and herd udder health. The Veterinary clinics of North America. **Food animal practice**, v19, n1, p.75-92, 2003.

JECKEL, J. F.; ELMORE, J. G.; KATZ, D. L. Delineamentos comuns de pesquisa usados em epidemiologia. In: _____. (2ª.Ed.). **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 80-112.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRÍES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Rev.Bras. Zootec.**, v.29, n.6, p. 1883-1886, 2000.

MALETTA, C.H.M. **Dicionário de Epidemiologia**. Belo Horizonte, Coopmed, 2014. p.141

MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products**. American Public Health Association, Baltimore, 1992. p.546.

MEDEIROS, E.S., PINHEIRO JUNIOR, J.W., PEIXOTO, R.M. & et al. Avaliação do exame microbiológico, California Mastitis Test e Somaticell® no diagnóstico da mastite subclínica em bovinos leiteiros. **Medicina Veterinária**, v. 2, p. 16-22, 2008.

MEYER, P. M.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A.; CORASSIN, C. H.; CASSOLI, L. D.; OLIVEIRA, C. Methods of milk storage and age of sample in milk components percentage, somatic cells count and urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, Champman, v. 85, supl.1, p.285, 2002.

MEYER, P.M. **Fatores não nutricionais que afetam as concentrações de nitrogênio ureico no leite**. 2003. 131p. Tese (doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MOATS, W. A. A comparison of three staining methods for microscopic count of bacteria in milk. **Journal Milk Food Technology**, v.35, n.8, p.496-98, 1972.

MONARDES, H. Somatic cell counting and Genetic Improvement of Resistance to Mastitis. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31., 1994, Maringá. **Anais....Maringá: UEM**, 1994. p. 1-19.

MONARDES, H.G.; MOORE, R.K.; CORRIGAN, B.; RIOUX, Y. Milk preservatives under different systems of sample storage in Quebec, Canada. **J. Food Prot.**, v. 59, n. 2, p. 151-154, 1996.

MONARDES, H. Programa de pagamento de leite por qualidade em Québec, Canadá. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1998. p.40-43.

- MULLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2002, Maringá. **Anais...** Maringá, 2002. p. 206-217.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. Madison, 1996. p.64
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. Madison: National Mastitis Council, 1999. p.222
- PEREIRA, D.B.C., SILVA, P.H.F., COSTA JR, L.C.G., OLIVEIRA, L.L. **Físio-química do leite e derivados – Métodos Analíticos**. Epamig, Juiz de Fora, 2001. p.234.
- PEREIRA NETO, M. **Avaliação de métodos de análise para a contagem de células somáticas no leite cru, mantido em tanque de resfriamento**. 2011. 51f. Dissertação (Mestrado em Produção animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Macaíba, 2011.
- PRATA, L. F. **Fundamentos de ciências do leite**. Jaboticabal: Funep- UNESP, 1998. p. 287.
- PRESCOTT, S. C.; BREED, R. S. The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. **Journal of Infectious Diseases**, v. 7, p. 632-640, 1910.
- RODRIGUES, A.C. DE O. **Identificação bacteriana a campo da mastite bovina para orientar protocolos de tratamento**. 2008. 95f. Tese (Doutorado em agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/ Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- RYSANEK, D; BABAK, V. Bulk tank milk somatic cell count as an indicator of the hygiene status of primary milk production. **Journal of Dairy Research**, v.72, p.1-6, 2005.
- SALOMÃO, V. S. C. **Influência de diferentes tipos de micro-organismos na contagem bacteriana total e de células somáticas por citometria de fluxo e na composição centesimal do leite cru**. 2012. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- SANTOS, M. V. **Uso de CCS do tanque para avaliar a ocorrência de mastite subclínica em rebanhos**. 2007. Radar Técnico - Qualidade do Leite – MilkPoint. Disponível em <<http://m.milkpoint.com.br/radar-tecnico/qualidade-do-leite/uso-de-ccs-do-tanque-para-avaliar-a-ocorrencia-de-mastite-subclinica-em-rebanhos-41383n.aspx>> Acessado em 20/02/2014.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri. Manole, 2007. p.314.
- 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, 2003.

SANTOS, M.V. Contagem de células somáticas e qualidade do leite e derivados. In:SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE, 5., 2001, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2001. p. 115-127.

SARGEANT, J.M.; SCHUKKEN, Y.H.; LESLIE, K.E. Ontario bulk milk somatic cell count reduction program: progress and outlook. **J. Dairy Sci.**, v.81, n.6, p.1545-1554,1998.

SAS Institute Inc. 2002-2003. **Statistical analysis system**. Release 9.1. (Software). Cary. USA.

SCHUKKEN, Y.H.; LESLIE, K.E.; WEERSINK, A.J.; MARTIN, S.W. Ontario bulk milk somatic cell reduction program. Impact on somatic cell counts and milk quality. **J. Dairy Sci.**, v.75, n.12, p. 3352-3358, 1992.

SCHUKKEN, Y.H.; WEERSINK, A.; LESLIE, K.E.; MARTIN, S.W. Dynamics and regulation of bulk milk somatic cell counts. **Can J Vet Res.**, v.57, p. 131-135, 1993.

SILVEIRA, T.M.L; FONSECA, L.M.; LAGO, T.B.N; VEIGA, D.R. Comparação entre método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.1, p.128-132, 2005.

SMITH, K.L.; HOGAN, J.S. **The world of mastitis**. 2001. Disponível: <http://www.nmconline.org/articles/wrldmast.htm>. Acessado em: 21/10/2013.

SUHREN, G.; WALTE, H. G. First experiences with automation flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**. v. 50, p.249 – 275, 1998.

UFLA –Universidade Federal de Lavras - Departamento de Medicina Veterinária. **Mastite Bovina: Controle e Prevenção**. 2012. Lavras – Minas Gerais. Boletim Técnico n. 93, p 1-30.

VAN DE VOORT, F.R; KERMASHA, S; SMITH, J.P.; MILLS, B.L.; NG-KWAI-HANG, K.F. A study of the stability of record of performance milk samples for infrared milk analysis. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.8, p.1515-1523, 1987.

WELLS, S.J.; OTT, S.L. What is the current milk quality in the US? In: NAT. MAST. COUNCIL ANN. MEET,37., 1998, St. Louis. **Anais...** Madison: Nat. Mast. Council, 1998. p. 10-18.

WILSON, D.J.; DAS, H.H.; GONZALES, R.N.; SEARS, P.M. Association between management practices, dairy herd characteristics, and somatic cell count of bulk tank milk. **JAVMA.**, v. 210, n.10, p. 1499-1502, 1997.

ZAGO, C. A.; MARTINS, T. T.; ROMA JÚNIOR, L. C.;KANASHIRO, C. Y.; RODRIGUES, A. C. O.; MACHA-DO, P. F. Estudo de proteína instável: efeito do conservante e do armazenamento sobre o pH de amostras de leite. In:REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis,SC. **Anais eletrônicos ...**Florianópolis: SBPC/UFSC, 2006. 1 CD-ROM.

ZENG, S. S.; ESCOBAR, E. N.; HART, S. P.; HINCKLEY, L.; BAULTHAUS, M.; ROBINSON, G. T.; JAHNKE, G. Comparative study of the effects of testing laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 31, p. 103-107, 1999.