

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INDICADORES DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-
QUÍMICA E DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS
NO LEITE DE VACAS COLHIDOS DE TANQUES DE EXPANSÃO
INDIVIDUAIS, TANQUES COLETIVOS E LEITE INFORMAL NA
REGIÃO SUDESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

RODRIGO GARCIA MOTTA

BOTUCATU – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Motta, Rodrigo Garcia

Indicadores de qualidade microbiológica, físico-química e detecção de resíduos de antimicrobianos no leite de vacas colhido de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal na região sudeste do estado de São Paulo. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50701061

1. Saúde pública. 2. Leite - Qualidade. 3. Controle de qualidade.

Palavras-chave: Aspectos microbiológicos; Leite; Qualidade; Resíduos.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INDICADORES DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-
QUÍMICA E DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS
NO LEITE DE VACAS COLHIDOS DE TANQUES DE EXPANSÃO
INDIVIDUAIS, TANQUES COLETIVOS E LEITE INFORMAL NA
REGIÃO SUDESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista “Julio
de Mesquita Filho” - UNESP, Campus
de Botucatu, para obtenção do título de
mestre em Medicina Veterinária, Área
de Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Prof. Adj. Márcio Garcia
Ribeiro

BOTUCATU – SP

2012

Rodrigo Garcia Motta

Indicadores de qualidade microbiológica, físico-química e detecção de resíduos de antimicrobianos no leite de vacas colhidos de tanques de expansão individual, tanques coletivos e leite informal na região sudeste do estado de São Paulo

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adjunto Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Prof. Adjunto Antônio Carlos Paes

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Membro Titular

Departamento de Nutrição e Produção Animal

Universidade de São Paulo – USP – Pirassununga - SP

Prof. Assistente Doutor José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu - SP

Prof. Dr. Rogério Giuffrida

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Unoeste – Presidente Prudente -SP

Data da Defesa: 03 de fevereiro de 2012.

*Aos meus pais, José Luiz Bressito Motta e,
Solange Maria Lucarelli Garcia Motta.*

*Aos meus irmãos, Diego Garcia Motta,
Igor Garcia Motta e Vitor Garcia Motta.*

A minha namorada Arita de Cassia Marella Cremasco.

Ao Meu Tio José Fernando Lucarelli Garcia.

*Ao meu avô Benedito Ribeiro Garcia e a minha avó,
Maria Aparecida Lucarelli Garcia (Patida),
minhas rédeas, meu orgulho e, principalmente, meus exemplos de honestidade,
trabalho e respeito...*

Aos professores e amigos Márcio Garcia Ribeiro e Antônio Carlos Paes.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradecer pode parecer fácil, entretanto, lembrar o nome de todas as pessoas que direta ou indiretamente nos deram a mão nessa jornada, é impossível, então peço desculpas aos esquecidos.

Agradeço à Deus, por conceder-me o dom de adorar os animais , pois com este encontrei na Medicina Veterinária minha satisfação. Além de iluminar e proteger o meu caminho, me fortalecer nas dificuldades e permitir a felicidade das minhas conquistas.

À Nossa Senhora de Aparecida, de quem sou devoto e em seu colo aconchegante, protegeu-me nos momentos em que me senti sozinho, não deixando que jamais desistisse dos meus sonhos!

Agradeço em especial aos meus pais, José Luiz e Solange, os quais souberam colocar em meu coração um sentimento nobre chamado respeito. Esses dois anjos estiveram sempre ao meu lado, sendo os alicerces da minha vida. Meus espelhos! Meus amores! Minhas rédeas!

Obrigado, aos meus avós maternos (“Ditão” e “Patida”), com muito carinho demonstraram-me a importância da “ FAMÍLIA ”, doando o colo amigo nas horas onde mais precisei. “Ditão”, agradeço pela paciência e por mostrar-me que só com muito trabalho honesto que se consegue vencer. Quantas vezes levou-me ao sítio, ainda criança, fazendo com que eu adquirisse o gosto pela terra, pelos animais, especialmente por vacas de leite!

Agradeço aos meus avós paternos, Vô Motta e Vó “Tutti”, in memoriam, com muito carinho souberam compreender-me, demonstrando-me como é bom ser um neto querido. Infelizmente, não puderam ver o neto formado e agora pós-graduado como sempre sonharam. Mas são anjos divinos e posso senti-los ao meu lado. “ Zé Motta”

quantas festas, cavalgadas, bailes passamos juntos, dois meninos, entre nós não existia diferença de idade!

Ao meu melhor e verdadeiro amigo, “Gordo”, com certeza já formamos uma parceria em outra encarnação, hoje somos uma dupla perfeita. Valeu meu “mano”! Diego, quantas vezes olhávamos ao redor e não víamos ninguém, obrigado por você estar ao meu lado sempre, meu irmão! Hoje, iguais até na profissão!

Igãõ, companheiro, amigo, irmão para todas as horas, meu braço direito. Minha maior motivação profissional é ser seu professor e tê-lo como primeiro aluno orientado de iniciação científica. Em breve, parceiros de profissão.

Obrigado, ao meu irmão caçula Vitor, mesmo não podendo acompanhá-lo dia-a-dia, ocupa lugar especial em meu coração, afinal, você alegra minha vida mantendo sempre acesa a chama da infância, como é bom tê-lo ao meu lado.

Ao “Zezão”, que nunca vou chamar de tio, pois sempre lhe considerei como meu segundo pai. Adotou-nos com tanto carinho e atenção, dedica-se mais aos sobrinhos do que a si próprio.

A minha namorada Arita, ao meu lado sempre e de coração.

Aos amigos da Fait-Itapeva, vocês são pessoas especiais que nos passam, com experiência e grande força, nossa amizade vai além da relação professor aluno, Thais Bulka, Thais Perreti, Ricardo Benedito de Vasconcelos, Creyton Camargo, Everton Felipe Fernandes e Karla H. de Oliveira.

Ao técnico de laboratório Fernando José Paganini Listoni, pela amizade desde a residência, por ser sempre prestativo e auxiliar de forma incondicional em todas as atividades do laboratório de microbiologia do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Obrigado pelos conselhos, apoio e incentivo.

Aos professores José Paes de Almeida N. Pinto, Hélio Langoni, Paulo Francisco Domingues, Jane Megid, Cassiano Vitória. Pelas discussões e sugestões nos corredores do MI, decisivas no meu desenvolvimento profissional, que se iniciaram ainda na residência.

Aos pós-graduandos Jaqueline, Ariane, Marília, Amanda, Tatiana, Larissa e Gustavo pela amizade e companheirismo, pelas discussões construtivas, que muito acrescentaram na minha formação pessoal.

Ao meu amigo especial Padre Benedito Romão da Silva, olhos que vêem além!

A pós-graduação pela forma como nos conduz, respeito, carinho e agilidade, José Roberto, Patrícia e Maria.

Ao Prof. Aristeu pela realização de análise estatística e pelo auxílio na delimitação do projeto.

Ao Prof. Rogério Giuffrida, pelo carinho, paciência e apoio na identificação dos fungos e leveduras no Laboratório de Microbiologia da Unoeste.

Ao Prof. Marcos Veiga dos Santos por ser tão prestativo nos momentos finais do meu trabalho, aceitando o convite para a banca.

Ao Prof., mestre e amigo Antônio Carlos Paes, com quem tive a honra de conviver nestes cinco anos de formado, grato pelas discussões, sugestões e incentivo ao desenvolvimento intelectual. Obrigado por me ensinar a clínica médica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, por permitir essa oportunidade, confiando em mim, acompanhando meu desenvolvimento pessoal profissional a cada dia, sempre com muita paciência e dedicação. Ao seu lado, aprendi a gostar da pesquisa, com certeza, ser seu orientado me transformou numa pessoa melhor.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Obrigado aos animais, por serem a razão do meu viver!

GRATIDÃO.

Você deixou seus sonhos para que eu sonhasse.
Derramou lágrimas para que eu fosse feliz.
Você perdeu noites de sono para que eu dormisse tranquilo.
Acreditou em mim, apesar dos meus erros.
Ser educador é ser um poeta do amor.
Jamais esqueça que eu levarei para sempre
Um pedaço do seu ser dentro do meu próprio ser...

(Augusto Cury)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões microbiológicos e de celularidade para o leite cru refrigerado de vaca segundo Instrução Normativa 51 no Brasil.	40
Tabela 2 - Medidas descritivas das variáveis quantitativas, da produção diária em litros das propriedades, número de animais em lactação e produção média (litros\vaca\dia), obtidas de criatórios com tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal na região sudeste do estado de São Paulo, 2010-2011.	59
Tabela 3 - Distribuição das raças, cruzamentos das vacas destinadas á exploração leiteira, em propriedades com tanques de expansão individuais, tanques coletivos e que comercializam leite informal na região Sudeste do estado de São Paulo, 2010-2011.	61
Tabela 4 - Refrigeração do leite informal de vacas comercializado na região sudeste de estado de São Paulo, 2010-2011	62
Tabela 5 - Tipo de assistência técnica veterinária recebida em propriedades produtoras de leite de vacas, com tanque individual, tanques coletivos e leite informal. Região Sudeste do Estado de São Paulo, 2010-2011.....	64
Tabela 6 -Medidas descritivas das variáveis de amostras de leite de vacas obtidas em tanques individuais, coletivos, e leite informal, segundo o tipo de assistência técnica recebido em criatórios da região Sudeste do Estado de São Paulo, 2010-2011.	65
Tabela 7 -Frequência de medidas de controle e profilaxia da mastite bovina e de higiene de ordenha em amostras de leite obtidas de criatórios com tanques de expansão individual, tanques coletivos e que comercializam leite informal na região Sudeste do Estado de São Paulo, 2010-2011.....	66
Tabela 8 - Contagem de células somáticas do leite obtido de 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e de 100 amostras de leite informal em propriedades da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 – 2011.....	68

Tabela 9 - Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da contagem de células somáticas em amostras de leite de vacas oriundas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal. Região Sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011	71
Tabela 10 - Contagem bacteriana total (UFC/mL) do leite em 100 tanques individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal de vacas obtidas em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.....	73
Tabela 11 - Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da contagem bacteriana total (CBT) em amostras de leite obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal de vacas de criatórios da região sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011.....	74
Tabela 12 - Teores de sólidos totais (%/mm) em 100 amostras de leite obtidas de tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal de vacas, em criatórios da região sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011.	77
Tabela 13 - Teores de proteína (g/100g) em leite obtido de 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal de vacas, em criatórios da região sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011	79
Tabela 14 - Teores de lactose (%/mm) em leite obtido de 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal de vacas, em criatórios da região sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011.....	81
Tabela 15 - Teores de gordura (g/100g) em leite obtido de 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal, em criatórios da região sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011	83
Tabela 16 - Teores de extrato seco desengordurado (g/100g) em leite obtido de 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal de vacas, em criatórios da região sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011.....	85

Tabela 17 - Número Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 dos constituintes sólidos do leite de vacas, amostras obtidas de tanques individuais, tanques coletivos e leite informal, em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011	87
Tabela 18 - Teores de nitrogênio uréico (mg/dl) em leite de tanques de expansão individuais, coletivos e leite informal de vacas, em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 – 2011	88
Tabela 19 - Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 do nitrogênio uréico em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste de estado de São Paulo, 2010 -2011	89
Tabela 20 - Frequências absolutas (N) e relativas (%), e intervalos de confiança 95% (IC95%) para a presença de resíduos de antimicrobianos ou substâncias inibidoras da multiplicação de micro-organismos em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal. Região sudeste do estado de São Paulo 2010 -2011	90
Tabela 21 - Micro-organismos de origem bacteriana e fúngica isolados do leite de vacas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal na região sudeste do estado de São Paulo, 2010 -2011.	93
Tabela 22 - Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 do número de micro-organismos isolados por amostras de leite de vaca oriundas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.....	94
Tabela 23 - Frequências absolutas (N) e relativas (%) de amostras de leite de vacas oriundas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal, segundo o número de isolamentos de micro-organismos por amostras (NIMA), em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.	93
Tabela 24 - Distribuição das espécies do gênero <i>Streptococcus</i> identificadas no leite dos tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 -2011.	95

Tabela 25 - Distribuição das espécies de enterobactérias e outras bactérias gram negativas identificadas no leite de vacas dos tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal, em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.	96
Tabela 26 - Distribuição das espécies de ECP e ECN identificadas no leite de vacas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.....	97

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Tipos de leite produzidos na região sudeste do estado de São Paulo. A= Tanques de expansão comunitários da Associação dos produtores de leite de Itararé, SP (APRI); B= Garrafas plásticas de refrigerante utilizadas para a comercialização do leite informal em município da região sudeste do estado de São Paulo. 53
- Figura 2 - Leite informal acondicionado em garrafas de plástico de refrigerante, mantidos em temperatura ambiente comercializado nas ruas de município da região sudeste do estado de São Paulo, 2011. 62
- Figura 3 - Distribuição da contagem de células somáticas em 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal de vacas em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011..... 70
- Figura 4 - Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da contagem de células somáticas em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal. Região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011. 71
- Figura 5 - Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da contagem bacteriana total em amostras de leite obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal de vacas, em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011. 74
- Figura 6 - Contagem bacteriana total (1000 x células/mL) em 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal de vacas obtidos em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011. 75
- Figura 7 - Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 dos sólidos totais em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011..... 78

Figura 8 - Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da proteína em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 – 2011.....	80
Figura 9 - Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da lactose em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.....	82
Figura 10 - Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da gordura em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 – 2011.....	84
Figura 11 - Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 do extrato seco desengordurado em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.....	86
Figura 12 - Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 dos teores de nitrogênio uréico em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.....	89
Figura 13 - Frequências relativas (%), e intervalos de confiança 95% (IC95%) para a presença de resíduos de antimicrobianos ou substâncias inibidoras do crescimento de micro-organismos em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.	91

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1 Aspectos gerais da qualidade do leite bovino no Brasil	25
2.2 Leite informal	27
2.3 Composição do leite.....	28
2.4 Propriedades físico químicas do leite bovino	30
2.5 Indicadores de qualidade no leite bovino	34
2.5.1 Contagem de células somáticas	35
2.5.2 Contagem bacteriana total	37
2.5.3 Resíduos de antimicrobiano	41
2.6 Mastite	42
2.6.1 Aspectos gerais	42
2.6.2 Complexidade etiológica	43
2.6.2.1 Micro-organismos conatgiosos	44
2.6.2.1 Micro-organismos ambientais	46
3. OBJETIVOS	50
3.1 Geral	50
3.2 Específico	50
4. MATERIAL E MÉTODOS	51
4.1. Amostras de leite	51
4.2. Colheita de material	52
4.2.1. Tanques de expansão	52
4.2.2. Leite informal	53
4.3. Análise da composição do leite	53
4.4. Contagem eletrônica de células somáticas	54
4.5. Contagem bacteriana total (CBT)	54
4.6. Avaliação dos resíduos de antimicrobianos no leite	54

4.7.	Isolamento e caracterização dos micro-organismos	55
	4.7.1 Identificação de <i>Staphylococcus spp.</i>	55
	4.7.2 Identificação das enterobactérias	56
	4.7.3 Identificação de fungos e leveduras	56
4.8.	Principais dados indicadores de produção nas propriedades	56
4.9.	Assistência veterinária	57
4.10.	Consentimento (ética)	57
4.11.	Orientação dos produtores	57
4.12.	Análise estatística	58
5.	RESULTADOS	59
	5.1 Informações sobre as características de produção nas propriedades	59
	5.2 Contagens de células somáticas	67
	5.3 Contagem bacteriana total	72
	5.4 Composição do leite de vacas	76
	5.4.1 Sólidos totais	77
	5.4.2 Proteína	78
	5.4.3 Lactose	80
	5.4.4 Gordura	82
	5.4.5 Extrato seco desengordurado	84
	5.4.6 Avaliação do nitrogênio uréico	88
	5.5 Pesquisa de resíduo de antimicrobiano ou substâncias inibidoras do crescimento bacteriano	90
	5.6 Cultivo microbiológico	92
	5.6.1. Identificação de ECP e ECN	97
6.	DISCUSSÃO	98
7.	CONCLUSÃO	128
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	130
9.	TRABALHO CIENTÍFICO.....	161
	Anexos	188

MOTTA, R.G. **Indicadores de qualidade microbiológica, físico-química e detecção de resíduos de antimicrobianos no leite de vacas colhidos de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal na região sudeste do estado de São Paulo.** ede Medicina Veterinária e Zootecnia.

RESUMO

Foi avaliada a qualidade microbiológica, constituintes nutricionais, celularidade, presença de resíduos de antimicrobianos e micro-organismos patogênicos, em amostras de leite de vacas, com base na IN 51 do MAPA, obtidas de tanque de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal, provenientes de propriedades da região sudeste do estado de São Paulo. Foram utilizadas 300 amostras de leite obtidas de 100 tanques individuais e 100 tanques coletivos colhidas nas propriedades, e 100 amostras de leite informal comercializadas na região. Foi verificado que 41% dos tanques individuais, 24% dos coletivos e 67% das amostras de leite informal estavam em desacordo com os valores máximos de CCS exigidos pela Instrução Normativa 51 (IN 51) do MAPA, Brasil. Foi observado que 10% das propriedades com tanques individuais, 71% dos coletivos e 86% de leite informal estão em desacordo com a IN 51, que prevê limite máximo de CBT de 750.000 UFC/mL. Em relação aos teores de sólidos totais, 48,0% dos tanques individuais, 89,0%, dos coletivos e 64,0% do leite informal apresentaram valores considerados normais. Em 32% do leite obtido dos tanques individuais, 5% dos coletivos e 3% do leite informal foram observados teores de proteína em desacordo com a IN 51, enquanto 54% do leite dos tanques individuais, 41% dos coletivos e 38% do leite informal, acusaram teores de gordura em desacordo com a legislação vigente. Para o extrato seco desengordurado, 52% do leite dos tanques individuais, 23% dos coletivos e 43% do leite informal, foram encontrados teores irregulares. Os teores de nitrogênio uréico foram considerados normais em 34% das amostras de leite dos tanques individuais, 50% dos tanques coletivos e 27% do leite informal. Em 42% das amostras de leite dos tanques individuais, 35% dos coletivos e 59% do leite informal foi detectada a presença de resíduos de antimicrobianos. Foram isoladas 605 linhagens de micro-organismos nas 300 amostras de leite, com predomínio de enterobactérias e dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, seguidos em menor frequência por actinomicetos, certos grupos de bactérias Gram-negativas e fungos. Foram identificadas 79\605 (13,06%) linhagens de *Staphylococcus* spp., das quais 52 (65,82%) foram classificadas como estafilococos coagulase positivas (ECP) e 27 (34,18%) estafilococos coagulase negativas (ECN). Linhagens ECP foram identificadas em 26 (61,90%) amostras dos tanques individuais, 18 (62,06%) dos coletivos e 8 (100,00%) no leite informal. Estirpes ECN foram identificadas em 16 (38,10%) das amostras de leite dos tanques individuais e 11 (37,93%) dos tanques coletivos. Não houve isolamento de ECN nas amostras de leite informal.

Palavras-chave: Vaca, composição do leite, mastite, IN 51, resíduos de antimicrobianos, CBT, celularidade

MOTTA, R.G. **Indicators of microbiological quality, physical chemistry and detection of antimicrobial residues in milk from cows collected from individual bulk tanks, collective tanks and informal milk in the Southeastern state of Sao Paulo.** Botucatu, 2012. 168 p. Dissertation (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, School of Veterinary Medicine and Animal Science.

SUMMARY

Assorted tests were run on samples from cow milk based on Brazil's MAPA IN 51 (Normative Instruction Nr. 51), obtained from individual bulk tanks, collective tanks and informal milk from breeders located in the southeast area of São Paulo state, Brazil. Their microbiological quality as well as their nutritional constituents, cellulosic characteristics (SCC), presence of anti-microbial residuals and pathogenic microorganisms was investigated. A total of three hundred samples of milk, comprised of 100 samples from individual tanks, one hundred from collective tanks plus one hundred samples of milk commercialized in the area mentioned above was utilized for the experiment.

As a result we learnt that 41% of the individual tanks, 24% of the collective tanks and 67% of informal milk samples were in violation with SCC maximum limits values required by MAPA's IN 51. It has also been observed that 10% of the breeders with individual tanks, 71% of the collective tanks and 86% of informal milk were in disagreement with MAPA's IN 51, which requires maximum CBT level/limit of 750,000 UFC/mL. As for total solid contents 48% of the individual tanks, 89% of the collective tanks and 64% of the informal milk showed values considered normal. In terms of protein content, 32% of the milk from individual tanks, 5% of the collective tanks and 3% of the informal milk were in disagreement with MAPA's IN 51. On the other hand 54% of the individual tanks, 41% of the collective tanks and 38% of the informal milk failed to present fat content in accordance to legislations demands. As for the non-fat dry extract, in 52% of samples from individual tanks, in 23% of the collective tanks and in 43% of the informal milk, irregular contents have been found. The ureic nitrogen contents were considered normal in 34% of the samples from individual tanks, in 50% of the collective samples and in 27% of the informal milk. The presence of antimicrobial residuals was detected in 42% of the samples from individual tanks, in 35% of the collective tanks and in 59% of the samples from informal milk.

An amount of 605 lineages of micro-organisms was isolated from the 300 samples of milk, showing a predominance of enterobacteria as well the *Staphylococcus* and *Streptococcus* kinds, followed by *Actinomycetales*, certain groups of Gram negative bacteria and fungi. 79/605 (13,06%) lineages of *Staphylococcus* were identified, of which 52 (65,82%) were classified as positive coagulase and 27 (34,18%) coagulase-negative *Staphylococcus*. Lineages were identified, of which 26 (61,90%) of the samples individual tanks, 18 (62,06%) collective tanks and 8 (100,00%) in informal milk. Lineages of the coagulase negative *Staphylococcus* were identified, of which 16 (38,10%) of the samples from individual tanks, 11 (37,93%) of the collectives tanks. There was no isolation of coagulase-negative *Staphylococcus* of the informal milk.

Keys words: Cow, milk, mastitis, IN 51, antimicrobial residuals, CBT, cellulosic

1. INTRODUÇÃO

Registros históricos, como pinturas rupestres, ilustram que o leite é consumido há mais de 10 mil anos. O primeiro fato concreto da sua utilização como alimento é o desenho encontrado em Tell Ubaid, atual Iraque, datado de 3.100 a.C., onde são retratadas de forma primitiva a ordenha e a filtragem do leite (Pratiqueleite, 2008). Para as diferentes espécies de mamíferos domésticos e humanos, o leite é a principal fonte natural de proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais (Ribeiro, 2008).

No Brasil, o produto e seus derivados possuem grande impacto no agronegócio, representando importante fonte geradora de renda, tributos e empregos (Fonseca e Santos, 2000; Gomes, 2001). A exploração leiteira é praticada em todo o território nacional em cerca de 930 mil propriedades rurais. Somente na produção primária, a atividade gera acima de três milhões de empregos e agrega mais de seis bilhões ao valor da produção agropecuária nacional (IBGE, 2010).

Diferentes fatores marcaram o setor leiteiro nacional, particularmente na última década, destacando o aumento da produção, a redução do número de pequenas propriedades, as mudanças nas regiões produtoras e a oscilação dos preços pagos ao leite brasileiro (Vilela et al., 1998, Guerreiro et al., 2005, Martins, 2006, IBGE, 2010).

A produção e o consumo de leite e derivados vêm crescendo no Brasil, fato verificado pela mudança na balança comercial láctea em 2004, na qual o país assumiu a posição de exportador de leite (Ponchio et al., 2005; Martins, 2006). Paralelamente, aumentou a necessidade de melhorar rendimento industrial, ganhando destaque as exigências dos consumidores em relação à qualidade do leite e seus derivados (Fonseca e Santos, 2000). Dados fornecidos pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) revelaram que, em 2006, o Brasil ocupava a sexta posição mundial na produção leiteira, sendo superado pelos EUA, Índia, China, Rússia e Alemanha. No ano de 2004, foram produzidos 515,8 bilhões de litros de leite em todo mundo, dos quais 70% procederam da Europa e Américas (Zoccal, 2004). Em 2010, a pecuária leiteira nacional produziu 31 bilhões de litros, com rebanho superior a 25 milhões de animais, e produtividade média de 1.145

litros vaca\ano, ou 3,82 litros de leite animal\dia, para lactação estimada em 305 dias (Brito, 2008, IBGE, 2010). Em contraste, determinadas bacias leiteiras especializadas, como a região de Campos Gerais (Castro, Carambei) no Paraná, destacam-se por elevada produtividade animal, ao redor de 7.900 litros de leite por lactação de 300 dias, correspondendo a 25,90 litros de leite\animal\dia (Machado, 2005). A região Sudeste produziu em 2010 cerca de dez bilhões de litros de leite, correspondendo a aproximadamente 38% da produção nacional (IBGE, 2010).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2010), a produção de leite no Brasil cresceu 69,4% no período compreendido entre 1990 e 2005, passando de 14,5 bilhões para 24,6 bilhões de litro/ano. Em valores percentuais, a região Norte foi a que apresentou o crescimento mais expressivo, com variação de 214% de crescimento da produção.

De acordo com dados oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005), o sistema agroindustrial do leite no Brasil movimentou R\$ 64,78 bilhões em 2004. Do total de leite produzido, 33,7% foi destinado para a produção de queijos, que movimentou cerca de R\$ 5,54 bilhões, compreendido por 18,7% leite UHT (longa vida) e 18,6% de leite em pó. No entanto, estima-se que 20 a 30% do leite produzido no Brasil seja comercializado sem inspeção sanitária, tratamento térmico e\ou sob condições inadequadas de coleta, armazenamento e distribuição, denominado “leite informal” (Villa, 2009). Apesar dos dados crescentes de produção, o setor leiteiro brasileiro apresenta limitações na eficiência produtiva e de qualidade da matéria-prima, perdendo em competitividade quando comparado a outros países (Magalhães et al., 2004; Martins, 2006).

A baixa qualidade do leite cru no Brasil, dos leites pasteurizados, esterilizados e dos derivados lácteos, está relacionada principalmente às deficiências no manejo e higiene da ordenha, elevada ocorrência de mastite, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos de ordenha, refrigeração ineficiente ou inexistente do leite e mão de obra desqualificada (Vilela et al., 1998; Teixeira, 1998; Santos, 2003; Martins, 2006).

A mastite é a doença mais preocupante na criação de vacas de leite gerando prejuízos na indústria láctea por alterações físico-químicas,

microbiológicas e elevação na celularidade do leite, as quais acarretam baixo rendimento industrial de derivados e diminuição da qualidade do produto final (Frasier e Westhoff, 2000; Langoni, 2000).

Nos EUA, estimou-se prejuízo de 1,8 bilhões de dólares ao ano em decorrência da mastite (NMC, 1996). No Brasil, os índices de ocorrência de mastite subclínica e clínica são estimados, respectivamente, em 72% e 17,5% dos animais (Costa et al., 1995a,b), gerando perdas de produção entre 12% e 15%, correspondendo prejuízo de 2,8 bilhões de litros anuais (Fonseca e Santos, 2000). Arashiro et al. (2008) relataram que, em 2005, o Brasil teve prejuízo estimado em 1,2 bilhões de litros devido à mastite.

Em 2002, foi sancionada a Instrução Normativa 51 (IN-51), pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que normatizou os procedimentos da cadeia de produção de leite no Brasil. Foram contemplados os procedimentos desde a ordenha, armazenamento em tanques de expansão, coleta do leite a granel e industrialização, bem como, maior rigor nos indicadores de qualidade, com ênfase a avaliação dos constituintes (proteína, gordura, extrato seco desengordurado, lactose e sólidos totais), contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e presença de resíduos de antimicrobianos ou inibidores da multiplicação bacteriana no leite (BRASIL, 2002)

No Brasil, o leite cru também conhecido por leite *in natura* apresenta, em geral, altas contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos e coliformes, que indicam, respectivamente, a contaminação total que o alimento sofreu até o momento em que a amostra foi colhida para análise, e a contaminação ambiental agregada ao produto, geralmente devido às deficiências técnicas durante a higiene de produção (Cardoso et al., 1999; Santos, 2003; Martins, 2006; Carvalho et al., 2007).

Os micro-organismos aeróbios mesófilos constituem-se em importante grupo de indicadores de qualidade do leite, por incluírem a maioria das bactérias acidificantes do produto, assim como patógenos relacionados às toxi-infecções alimentares em humanos (Fonseca e Santos, 2000; Martins, 2006; Carvalho et al., 2007). As bactérias acidificantes alteram o pH do leite devido ao acúmulo de ácido láctico produzido pela degradação microbiana da

lactose, que é o carboidrato mais importante do leite (Godkin, 2000; Guerreiro et al., 2005; Bordolla, 2007).

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos no leite é determinada pela Contagem Bacteriana Total (CBT), realizada de forma eletrônica pelos laboratórios credenciados pela Rede Brasileira de Qualidade do Leite (BRASIL, 2002). A estimativa da CBT, quantificadas em unidades formadoras de colônias (UFC), é utilizada para o controle da qualidade do leite, bem como da eficiência das práticas de sanitização de equipamentos de ordenha e utensílios durante a produção e beneficiamento do produto (Kitchen, 1981; Freitas Filho et al., 2009). A IN-51 determinou que a CBT do leite deveria ser $\leq 1.000.000$ UFC/mL até julho de 2008, para as regiões sul, sudeste e centro-oeste. Em seguida, seria reduzida para 750.000 UFC/ml até julho de 2011. A partir desta data, estes valores passariam a ser limitados, no máximo, 100.000 UFC/mL para tanques de expansão individuais e 350.000 UFC/mL para tanques coletivos ou comunitários (BRASIL, 2002). Entretanto, no mês de agosto de 2011 a IN-51 foi revogada, já que, grande parte dos produtores de leite no país não conseguiriam atingir os valores de CBT exigidos pelo MAPA. Assim, foi mantido o mesmo parâmetro de 750.000 UFC/mL até 30 de dezembro de 2011 (Santos, 2011).

Outro importante indicador de qualidade incluído na IN 51, como requisito para aceitação do leite na indústria, é a contagem de células somáticas (CCS). As células somáticas do leite são constituídas por leucócitos (principalmente neutrófilos) e células epiteliais de descamação da glândula mamária (Domingues et al., 2001; Santos, 2005; Carvalho et al., 2007). A contagem de CCS reflete o estado de saúde da glândula mamária dos animais. Inúmeras são as perdas relacionadas com alta CCS (Bueno et al., 2005). Diferentes estudos têm reforçado para o prejuízo significativo na produção do leite de vacas com valores de $CCS \geq 750.000$ células/mL (Fonseca e Santos 2000; Machado et al., 2000; Langoni, 2000; Leclerc et al., 2002).

A IN-51 intensificou também o rigor na detecção de resíduos de antimicrobianos, ou qualquer outro fármaco ou produto químico inibidor da multiplicação de micro-organismos. A presença de resíduos de antimicrobianos no leite prejudica a produção de derivados pelos laticínios, bem como pode ser

nocivos aos consumidores, causando distúrbios gastrintestinais, hepáticos e reações de hipersensibilidade (Cardoso et al., 1999; Santos, 2003; Martins, 2006).

Diferentes fatores da criação das vacas influenciam a produção e a composição do leite, tais como condições de ordenha, alimentação e manejo dos animais, raça, idade e estágio da lactação, temperatura ambiental, estações do ano e, principalmente, infecções na glândula mamária (Santos, 2003; Guerreiro, 2005; Bordolla, 2007). Seguindo tendência mundial, o Brasil adotou o sistema de pagamento por qualidade do leite, notadamente para teores mais elevados de gordura e proteína. A análise individual do leite é fundamental para o monitoramento de qualidade e a identificação de infecções mamárias, assim como para a adoção de ações de controle e profilaxia das mastites (Reis et al., 2007).

O conceito de qualidade é bastante complexo, pois envolve o processo de produção, manejo, nutrição e idade das vacas, e pode ser ainda mais amplo quando se contempla requisitos como rastreabilidade, sustentabilidade, responsabilidade social, bem estar dos trabalhadores e dos animais e questões ambientais (Frasier e Westhoff, 2000; Bueno, 2005; Brito, 2008). O incremento da produção e da exportação de leite bovino está relacionado à melhoria da qualidade da matéria-prima, ponto de extrema importância para o futuro da cadeia produtiva leiteira no Brasil, e que apresenta reflexos diretos no aumento do poder aquisitivo da população (Vilela et al., 1998; Teixeira et al., 2003; Zoccal, 2008). Neste cenário, a melhoria da qualidade do leite desencadeia crescimento tanto nas exportações, quanto no consumo interno (Santos, 2003; Carvalho et al., 2007).

A hipótese deste estudo foi comparar os principais indicadores de qualidade do leite de vacas (CCS, CBT, presença de resíduos) colhidos de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal, assim como, avaliar os principais constituintes do produto (gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado, sólidos totais), baseados na IN-51, com o intuito de salvaguardar a qualidade final do leite e derivados oferecidos ao consumidor na região sudeste do estado de São Paulo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da qualidade do leite bovino no Brasil

O leite com qualidade deve possuir três atributos: qualidade higiênica, valor nutritivo e manutenção das propriedades organolépticas (Frazier e Westhoff, 2000; Fonseca e Santos, 2000; Gomes, 2001; Nader Filho et al., 2007a). A saúde e o manejo do rebanho são fundamentais para assegurar a qualidade do leite, que incluem os procedimentos higiênicos adotados na produção, coleta, armazenamento, industrialização e distribuição do produto (Almeida et al., 1999; Polegato et al., 2003; Ponchio et al 2008).

O leite é excelente substrato para os micro-organismos, devido à riqueza dos constituintes como lactose, proteínas, ácidos graxos, sais minerais e vitaminas (Almeida et al., 1999; Frazier e Westhoff, 2000; Radostits et al., 2007). O exterior do úbere e tetos, o meio ambiente, a superfície dos equipamentos e utensílios de ordenha constituem-se nas principais fontes de veiculação de micro-organismos para a glândula mamária e, conseqüentemente, para o leite (Rubhun, 2000, Sá et al., 2004). Aspectos relacionados ao ordenhador, como a higiene pessoal e treinamento deficiente (Barbosa et al, 2002, Arashiro, 2008), o uso de tanques de expansão comunitários ou coletivos (Mendonça, 2001), temperatura inadequada de refrigeração e a conservação do leite acima de 7°C (Harmon, 1998; Chapaval e Piekarski, 2000), influenciam diretamente na qualidade do produto final. A presença de micro-organismos no leite determina grandes prejuízos industriais devido á acidificação, coagulação, produção de gás, alterações na cor e sabor, além de odores desagradáveis (Leclerc et al., 2002; Paula et al., 2004; Bansal et al., 2005).

A necessidade de implementar medidas para melhorar e padronizar a qualidade do leite no Brasil motivou a elaboração do Plano Nacional da Qualidade do Leite (PNQL), por iniciativa do MAPA no ano de 2002, que culminou na publicação da Instrução Normativa 51 do MAPA, na qual se definiram regulamentos técnicos para a produção, identidade e qualidade dos diversos tipos de leite, bem como as condições para a refrigeração na propriedade rural e transporte do leite a granel até a indústria (BRASIL, 2002).

A IN-51 determinou também que a qualidade do leite de cada propriedade rural seja monitorada de forma continuada por análises laboratoriais, visando identificar os problemas na origem, evitando que a qualidade da matéria prima seja inspecionada somente no recebimento do leite pela indústria (BRASIL, 2002; Muller, 2002). Com a adoção da IN 51, foi adotada a denominação “leite cru refrigerado” para a matéria prima recebida pela indústria (BRASIL, 2002). Ademais, exigiu-se também a refrigeração do leite cru na propriedade, a coleta de leite a granel e rigor na adoção de novos critérios mínimos de qualidade para o leite cru comercializado no país (BRASIL, 2002). A fiscalização da matéria prima passou a ser realizada também na propriedade, permitindo que os problemas sejam identificados nos próprios criatórios (Muller, 1999; BRASIL, 2002).

A IN-51 admite o uso coletivo de tanques de refrigeração ("tanques coletivos ou comunitários") pelos produtores de leite, desde que baseados no princípio de operação por expansão direta. A localização do equipamento deve ser estratégica, facilitando a entrega do leite da ordenha de cada criatório. O armazenamento do leite em latões é permitido, no máximo, duas horas após a ordenha. Em seguida, deve ser acondicionado em tanques de expansão. Não são admitidos tanques de refrigeração comunitários que operem pelo sistema de imersão de latões. Os latões devem ser higienizados logo após a entrega do leite, enxaguados com água corrente, e higienizados com detergentes biodegradáveis e escovas apropriadas. A capacidade do tanque de refrigeração para uso coletivo deve ser dimensionada de modo a propiciar condições adequadas de operacionalização do sistema, particularmente quanto à velocidade de refrigeração da matéria-prima (BRASIL, 2002)

A padronização da coleta do leite cru refrigerado a granel no Brasil também foi contemplada na IN-51, indicando o recolhimento do produto em caminhões com tanques isotérmicos, revestidos internamente por aço inoxidável. O leite é recolhido por mangote flexível e bomba sanitária, diretamente do tanque de refrigeração por expansão direta, ou dos latões contidos nos refrigeradores de imersão (BRASIL, 2011).

2.2 Leite informal

Estima-se que cerca de 40% da produção de leite bovino no Brasil seja comercializada sem inspeção sanitária, ou tratamento térmico adequado (Almeida et al., 1999; Freitas Filho et al., 2009). Este produto é denominado “leite informal” e é comercializado em utensílios plásticos ou de vidro, elaborados originalmente para o comércio de outros produtos, como refrigerantes (Almeida, 2001; Gomes, 2001). Apesar da produção estimada desta “modalidade” de leite atingir cerca de oito bilhões de litros por ano no país, são escassas as informações sobre a presença de micror-organismos e suas toxinas, resíduos de antimicrobianos, contagens bacterianas totais e de células somáticas, bem como dos teores dos principais constituintes nutricionais e físico-químicos do leite comercializado de modo informal no Brasil (Albuquerque et al., 1996; Freitas Filho et al., 2009). Tal ausência de informações de qualidade deste leite expõe a população ao consumo de produto com baixa qualidade, sob riscos de reações orgânicas indesejáveis, além de veicularem toxinas e micro-organismos com potencial zoonótico (Almeida et al., 1999; Adwan et al., 2005; Vasconcelos e Ito, 2011).

O consumo de leite “in natura”, sem qualquer tratamento térmico, é comum no interior do estado de São Paulo e em outras regiões do país, devido à crença popular que este tipo de leite seja mais rico em nutrientes e vitaminas (Villa, 2009). Além disto, possui como atrativo o baixo custo, pois é consumido principalmente pela população de menor poder aquisitivo (Freitas Filho et al. 2009). Não há garantia de que os padrões físico-químicos e microbiológicos do leite estabelecidos pela IN 51 (BRASIL, 2002) sejam considerados pelos produtores e comerciantes de leite informal, visto que a fiscalização sobre este tipo de produto é incipiente.

Apesar de todos os riscos advindos do consumo de leite informal, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, estima-se que 35 a 42% do leite produzido no país, entre 1998 e 2001, não foi inspecionado por nenhum órgão de controle federal, estadual ou municipal (IBGE, 2006). Especula-se que o consumo do leite informal, ou clandestino, tem crescido também na parcela da população de maior poder aquisitivo, cuja justificativa

também estaria creditada ao consumo de produto “mais natural”, íntegro, com seus constituintes em proporções brutas preservadas e sem a presença de produtos químicos ou conservantes (Freitas Filho et al., 2009). Entretanto, a marginalização da produção do leite informal, o comércio ambulante e a ausência de inspeção e tratamento térmico deste produto, propiciam condições para fraudes e adulterações, visto que este leite é comercializado, provavelmente em condições muito aquém das exigidas para a qualidade organoléptica, composicional e microbiológica (Freitas Filho et al., 2009; Villa, 2009).

2.3 Principais constituintes do leite bovino

Os métodos físico-químicos aplicados ao controle dos constituintes do leite bovino são caracterizados por aferições de grandezas físicas e avaliações de composição química das propriedades do produto e derivados, visando à definição de sua qualidade (Bueno et al., 2005, BRASIL, 2011).

A composição do leite é determinante para o estabelecimento da sua qualidade nutricional e aptidão para processamento e consumo humano (Cullor et al. 1993; Bansal, 2005). A biossíntese do leite ocorre na glândula mamária, sob controle hormonal (Costa et al., 2005; Radostits et al., 2007). Muitos constituintes são sintetizados nas células secretoras e, outros, diretamente a partir do sangue e do epitélio glandular (Costa, 1998, Fonseca e Santos, 2000; Godkin, 2000). Estima-se que o leite contenha ao redor de 100.000 constituintes distintos, embora a maioria deles ainda não foram identificados (Schalm, 1971; Serra, 2004).

A água é o constituinte quantitativamente mais importante do leite, no qual estão dispersos, com grau de afinidade variável, os demais componentes (Bordolla et al., 2007). A maior parte da água apresenta-se na forma livre, e outra fração ligada às proteínas, lactose e aos minerais (Sumner 1996; Bordolla, 2007).

Convencionalmente, com exceção da água, os principais constituintes do leite, são agrupados, em extrato seco total, ou sólidos totais (Souza et al., 1995; Fonseca e Santos, 2000; Polegato et al., 2003). Se desconsiderarmos a gordura, deste grupo, temos o extrato seco

desengordurado ou os sólidos não gordurosos do leite (Amaral, 2004; Brito, 2008). Atualmente, estes constituintes do leite (Anexo 1) têm sido frequentemente considerados como parâmetros para o pagamento da matéria-prima pelas indústrias de lácteos e derivados (Gomes et al., 2001; Guerreiro et al.; 2005; Santos, 2005)

A gordura do leite se apresenta sob a forma de pequenos glóbulos contendo principalmente glicerídeos, envolvidos por membrana lipoprotéica (Langoni, 2000; Gomes, 2001; Zoccal., 2008). A gordura é constituinte do leite de vacas mais influenciado por fatores como alimentação, raça, estação do ano e período de lactação (Van Horn et al., 1992; Bansal et al., 2005).

As proteínas podem ser consideradas como a fração mais expressiva dos compostos nitrogenados do leite, visto que, para o leite bovino, aproximadamente 95% dessa fração nitrogenada do produto é constituída por proteínas e somente 5% por compostos nitrogenados não-protéicos (Fonseca e Santos, 2000; Arashiro, 2008; Beserra et al., 2009). Cerca de 80% do nitrogênio protéico do leite é composto por nitrogênio caseínico e 20% de nitrogênio não-caseínico (Bueno et al., 2005, Santos, 2003). Diversos fatores influenciam na composição e na distribuição das frações nitrogenadas do leite bovino, que incluem a ocorrência de mastite, temperatura ambiente dos criatórios, estágio de lactação, número de parições e raça dos animais, além da alimentação e teor energético da dieta (Cullor, 1993; Fonseca e Santos 2000; Brito, 2008).

Várias enzimas são encontradas no leite, que incluem lípases, proteinases, óxido-redutases, fosfatases, catalase e peroxidase (Rubum, 2000; Santos, 2005). A multiplicação de micro-organismos no leite altera o complexo enzimático e a constituição do produto final (Santos et al., 2005). A atividade dessas enzimas é influenciada pelas condições do meio (temperatura, pH, acesso ao substrato) e pelo processamento tecnológico do leite nas indústrias (Cullor, 1993; Santos e Fonseca, 2000; Langoni, 2000; Brito, 2008).

A lactose é o glicídio característico do leite, formado por glicose e galactose, representando o constituinte sólido predominante do produto (Padilha et al., 1999; Santos e Fonseca, 2000; Mendonça, 2001). Os tratamentos térmicos do leite reduzem os teores de lactose, de forma

diretamente proporcional a intensidade e o tempo de aquecimento (Polegato et al., 2003; Santos, 2003, 2005). Este glicídio também é metabolizado por microorganismos para a formação de ácido láctico (Brito, 2008). Os níveis deste ácido podem ser úteis no controle de processamento industrial ou da qualidade da matéria-prima (Chapaval e Piekarski, 2000; Magalhães et al., 2004; Brasil 2011)

O leite contém também teores consideráveis de cloro, fósforo, potássio, sódio, cálcio e magnésio (Sordilo et al., 1997). Em contraste, apresenta baixos teores de ferro, alumínio, bromo, zinco, manganês, sais orgânicos e inorgânicos (Van Horn et al., 1992; Sordilo et al., 1997; Santos, 2006). A associação entre os sais minerais e as proteínas do leite é fator determinante para a estabilidade das caseínas a diferentes agentes desnaturantes (Rodrigues, 1995; Santos e Fonseca, 2000; Santos, 2006). O fosfato de cálcio compõe parte da estrutura das micelas de caseína (Sordilo et al., 1997; Brito e Brito, 1998; Almeida et al., 1999).

Tanto no leite da mulher quanto no leite de vacas são encontradas as principais vitaminas (Costa, 1998; Brito, 2008; Ferreira et al., 2010; FAO, 2011). As vitaminas A, D, E e K estão associadas aos glóbulos de gordura e as demais dispersas na fase aquosa do leite (Fonseca e Santos, 2000; Campos, 2004). A concentração das vitaminas lipossolúveis é dependente da alimentação das vacas, exceto a vitamina K (Gomes, 2001; Brito, 2008). A vitamina K e as hidrossolúveis são sintetizadas no trato digestório dos ruminantes (Del Prato 1998; Radostits et al., 2007).

2.4 Propriedades físico-químicas do leite bovino

Diferentes propriedades e constituintes do leite são de interesse para avaliação da qualidade físico-química do produto (Oliveira et al., 1999; BRASIL, 2011).

A acidez do leite fresco deve-se à presença de caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos (Oliveira et al., 1999; Dias, 2007). Poucas horas após a ordenha, o leite apresenta reação ácida na presença de fenolftaleína (teste do Alizarol), ainda que nenhuma acidez pela conversão de

lactose em ácido láctico tenha ocorrido mediante a fermentação bacteriana (Amaral et al., 1988; Sordillo et al., 1997; Santos, 2006).

A acidez natural do leite varia entre 0,13 e 0,17%, determinada pelo teor de ácido láctico (Sordillo, 1997). A acidificação do leite bovino ocorre pela hidrólise da lactose por enzimas microbianas, com formação de ácido láctico (Amaral, et al., 1988; Sordilo et al, 1997; Amante et al., 2005). Tanto a acidez natural quanto a acidez provocada pela multiplicação microbiana são quantificadas pela titulação por soluções alcalinas, denominada Prova de Dornic (Oliveira et al., 1999; Domingues et al., 2001; Ferreira et al., 2010).

A acidificação do leite de vacas é observada em situações nas quais a dieta dos animais não está adequada, particularmente, na relação entre o concentrado e o volumoso (Fonseca e Santos 2000). Outra forma de acidificação do leite de vacas esta relacionada a ingestão excessiva de sucedâneos cítricos (polpa cítrica), como sub-produtos da produção de suco de laranja, utilizados na composição da ração dos ruminantes, com a finalidade de reduzir os custos de produção (Rubhun, 2000; Beserra et al., 2009).

A presença de ácidos no leite pode ser avaliada diretamente pela determinação do pH (Oliveira et al., 1999; Santos, 2006). Em leite de conjunto ou tanques, o pH normal varia entre 6,6 e 6,8, com média de 6,7 a 20°C ou 6,6 a 25°C (Fonseca e Santos, 2000). No colostro, o pH varia de 6,25 no primeiro dia até 6,46 no terceiro dia (Fonseca e Santos, 2000; Freitas et al., 2009). Em contraste, o leite proveniente de animais com mastite apresenta teor levemente alcalino, atingindo pH ao redor de 7,5 (Fonseca e Santos, 2000; Oliveira et al., 2009), devido ao aumento da permeabilidade vascular da glândula mamária nos processos infecciosos e mistura do leite com o sangue (Ribeiro, 2008). Certas características dos derivados do leite são definidas pelos valores de pH, atribuindo-se a esta propriedade grande relevância na indústria dos subprodutos lácteos (Domingues, et al., 2001, Arashiro, 2008).

A densidade do leite varia entre 1,023 e 1,040 g/mL a 15C^o com valor médio de 1,032 g/mL (Fonseca e Santos, 2000). O leite com alto teor de gordura apresenta maior densidade. Tal fato é atribuído ao aumento do extrato seco que acompanha o incremento no teor de gordura (Santos, 2000, 2005).

O teor de extrato seco é influenciado por diversos fatores relacionados com o animal, ambiente, processamento industrial e técnicas crioscópicas (Bansal et al., 2005). O leite bovino contém em média 12,5% de extrato seco (3,30% proteína, 4,50% gordura 4,75 % de lactose e 0,1 % de cloretos). O ponto de congelamento do leite ocorre a $-0,531^{\circ}\text{C}$ ($-0,550^{\circ}\text{H}$), em razão da diminuição do ponto de congelamento causada pela lactose ($0,296^{\circ}\text{C}$), sais minerais ($0,119^{\circ}\text{C}$) e outros constituintes como uréia e dióxido de carbono (Gomes, 2001; Gonzalez et al., 2004; Fagan et al., 2008).

O leite apresenta viscosidade mais alta que a da água, em virtude da presença de proteínas e lipídeos, podendo sofrer alterações com o processamento industrial (Amaral et al.; 1988, Sordilo et al., 1997; Guerreiro et al., 2005). O leite integral e o leite desnatado possuem viscosidades médias (a 20°C) de, respectivamente, 1,631 mg/dL e 1,404 mg/dL (BRASIL, 1981).

As características sensoriais definem a afinidade dos consumidores e a associação de atributos do leite e derivados como frescor e valor nutritivo (Ponchio et al., 2008). O leite fresco, produzido sob condições ideais, apresenta sabor pouco pronunciado, primariamente devido a relação entre lactose e cloretos (Brito e Brito, 1998). Apresenta sabor levemente adocicado, não ácido ou amargo (BRASIL, 1981). No entanto, estas propriedades são alteradas em animais com mastite (Santos, 2003 a). Sabores e odores alterados em leite fresco comumente são reflexos da alimentação dos animais (ração, silagem) das condições do ambiente dos criatórios ambiente de e manejo de ordenha (Santos, 2005; Brito, 2008).

A cor branca do leite resulta da dispersão da luz refletida pelos glóbulos de gordura e pelas partículas coloidais de caseína e de fosfato de cálcio (Souza et al. 1995; Summer, 1996). A homogeneização torna o leite mais branco, pela maior dispersão da luz (Ponchio, 2008). A cor amarelada é devida ao pigmento caroteno, que é lipossolúvel (BRASIL, 1981). Cores anormais podem ser decorrentes da multiplicação microbiana (Brito, 2008).

O nitrogênio uréico (NU) representa a porção de nitrogênio no leite na forma de uréia (Gonzalez et al., 2004). O nível de NU no leite é proporcional aos níveis de nitrogênio do sangue (Lucci et al., 2006; Beserra et al., 2009). Os níveis de NU correspondem, geralmente, aos níveis de nitrogênio sérico das

últimas 12 horas nas quais o leite foi sintetizado, ou oito horas para os animais submetidos a três ordenhas diárias (Gonzalez et al., 2004).

Com base no monitoramento da concentração de NU pode-se determinar se a proteína e a energia da dieta das vacas de leite estão adequadamente balanceadas (Gonzalez et al., 2004; Comeron, 2005). A análise da concentração de uréia pode ser realizada a partir de amostras de sangue (Gonzalez et al., 2004; Lucci et al., 2006; Pina et al., 2006). Outra possibilidade é o uso das amostras de leite utilizadas no controle leiteiro das vacas registradas ou nas amostras quinzenais ou mensais dos tanques de expansão utilizadas para controle da matéria prima pelos laticínios (Cassoli et al., 2008; Machado, 2008; Beserra et al., 2009; Botaro et al., 2011). A determinação da uréia no leite usualmente é realizada pelo método de espectrofotometria enzimática (Cassoli et al., 2008; Machado, 2008).

Para que ocorra a biossíntese protéica de origem microbiológica no rúmen é necessário que haja equilíbrio entre a energia, na forma de carboidrato solúvel, e de nitrogênio, na forma de proteína verdadeira ou uréia como fonte nitrogenada não protéica (Gonzalez et al., 2004; Lucci et al., 2006; Beserra et al., 2009).

O excesso de proteína na dieta nas formas degradáveis e solúveis, quando não completamente utilizada pelos micro-organismos ruminais na biossíntese de proteína microbiana (Pina et al., 2006; Machado et al., 2008; Botaro et al., 2011), será absorvida pela parede ruminal, atingindo a corrente sanguínea na forma de amônia (Gonzalez et al., 2004). No fígado dos animais a molécula de amônia é convertida em uréia (Lucci et al., 2006; Beserra et al., 2009).

A proteína é o nutriente mais caro dos alimentos fornecido aos ruminantes (Gonzalez et al., 2004; Pina et al., 2006; Beserra et al., 2009). Os bovinos metabolizam as proteínas em frações menores como peptídeos, aminoácidos e amônia no rúmen (Pina et al., 2006). Os animais utilizam as fontes de proteína para o metabolismo basal, crescimento, produção de leite e reprodução (Gonzalez et al., 2004). Paralelamente, os micro-organismos do rúmen podem usar a amônia para a multiplicação da microbiana local,

favorecendo a síntese de proteínas ruminais de origem microbiana (Lucci et al., 2006; Beserra et al., 2009; Botaro et al., 2011).

Os níveis médios de uréia no leite de vacas para rebanhos com < 12 mg\dl (valores individuais inferiores a 8 mg\dl), refletem deficiência de proteína na dieta ou excesso de carboidratos (Lucci et al., 2006; Casolli et al., 2008; Beserra et al., 2009). A consequência dos desequilíbrios nutricionais é a redução na fermentação ruminal e na síntese de proteína microbiana, resultando em prejuízos significantes no desempenho produtivo dos animais (Comeron, 2005; Lucci et al., 2006; Santos e Fonseca, 2006). Rebanhos com média de uréia > 18 mg\dl (valores individuais acima de 25 mg\dl), resultam em prejuízos nos índices produtivos e reprodutivos do rebanho (Lucci et al., 2006; Cassoli, 2008; Botaro et al., 2011). Estes prejuízos são representados pela perda de energia metabolizável pelos animais, desviada para a eliminação da uréia excedente (Beserra et al., 2009), além de baixos índices reprodutivos pela diminuição da taxa de concepção do rebanho (Gonzalez et al., 2004) e deficiências imunológicas (Santos e Fonseca, 2006).

Estudos em fazendas de alta produção de leite no Brasil revelaram que tanto o excesso quanto a baixa concentração de uréia no leite são prejudiciais para o desempenho produtivo e reprodutivo dos rebanhos (Lucci et al., 2006; Pina et al., 2006; Beserra et al., 2009).

2.5 Indicadores de qualidade do leite bovino

A quantidade de leite produzida e sua composição apresentam variações de importância econômica e tecnológica, influenciadas por fatores como espécie, raça, fisiologia do animal, alimentação, estações do ano, infecções mamárias, período de lactação, ordenhas e adulterações (Nascimento et al., 2001; Santos, 2003abc; Nader Filho et al., 2007). A avaliação dos principais constituintes e propriedades físico-químicas são imprescindíveis no monitoramento da qualidade do leite e seus derivados (Fonseca e Santos, 2000). Com a deflagração da IN-51 no Brasil e a adoção do pagamento pela qualidade do leite, a quantificação da CCS, e CBT, e a detecção da presença de resíduos de antimicrobianos, tem sido indicadores

fundamentais na avaliação da qualidade do leite produzido no país (Santos, 2003c).

As alterações no metabolismo celular da glândula mamária prejudicam a síntese dos componentes do leite (Frazier e Westhof, 2000; Ferguson et al., 2007; Ribeiro., 2008). As infecções mamárias em vacas alteram a permeabilidade dos vasos sanguíneos e da rota paracelular de secreção de constituintes do leite (Costa, 1993; Muller, 2002; Sears e McCarthy, 2003), resultando em alterações significativas na composição, que incluem aumento da contagem de células leucocitárias e epiteliais ou células somáticas (CCS) e da contagem bacteriana total (CBT), além da diminuição dos teores de gordura, proteína e lactose, aumento das imunoglobulinas e frações do soro sanguíneo no leite, desequilíbrio salino e aumento de pH (Costa, 1991; Lucci et al., 2006; Radostis et al., 2007; Arashiro et al., 2008; Beserra et al., 2009).

2.5.1 Contagem de Células Somáticas

A CCS é considerado método indireto de diagnóstico utilizado no monitoramento da saúde da glândula mamária de animais domésticos em lactação, por identificar o aumento dos leucócitos e células epiteliais no leite (Sumner, 1996; Barbosa et al., 2002; Bansal et al., 2005). Os leucócitos ou polimorfonucleados migram do sangue para o interior da glândula mamária, em decorrência de processos inflamatórios locais (Sá et al., 2004; Santos e Fonseca 2006; Bordolla, 2007; Cunha et al., 2008; Machado, 2008). Prejuízos no volume de produção e na qualidade do leite estão diretamente relacionados com a alta CCS em animais de exploração leiteira (Schaefflibaum, 2000; Brito et al. 2001; Brito, 2008).

A resposta inflamatória da glândula mamária repercute diretamente no aumento do número de leucócitos de origem sanguínea para o interior do lúmen alveolar (Sumner, 1996; Fonseca e Santos, 2000; Almeida et al., 2003; Teixeira et al., 2003; Machado, 2008). O termo célula somática é utilizado para designar todas as células presentes no leite, as quais incluem os leucócitos e as células de descamação do epitélio glandular mamário (Wilson et al., 1997; Bueno et al, 2005; Santos e Fonseca, 2006; Nader Filho et al., 2007ab;

Machado, 2008). A elevação da CCS é indicativa de presença de mastite e resulta em prejuízos significativos aos produtores e as indústrias de laticínios e derivados (Machado, 1998; Harmon, 1998; Gomes, 2001, Freitas, 2009).

É possível que toda e qualquer vaca com CCS >300.000 CCS/mL, independente do número de partos ou do estágio de lactação, apresente mastite subclínica em pelo menos um quarto mamário (Harmon et al., 1998; Fonseca e Santos, 2000; Langoni, 2000; Lavor et al; 2006; Ribeiro, 2008).

A principal causa do aumento da CCS em vacas está relacionada à presença de infecção da glândula mamária, causada predominantemente por micro-organismos de origem bacteriana, ainda que outros fatores como idade do animal, estágio da lactação e estações do ano, possam ter efeito na elevação da contagem de células somáticas (Fonseca e Santos, 2000; Harmon et al., 1998; Bordolla, 2007; Koneman et al., 2008).

Diferentes estudos determinaram que existe relação estreita entre a CCS do tanque de expansão e a ocorrência de quartos mamários infectados em vacas no rebanho (Cullor, 1993; Harmon, 1994; Cunha et al., 2008; Freitas et al., 2009). A redução na produção leiteira em animais com elevada CCS é resultante de lesão física nas células epiteliais secretoras da glândula, assim como pela alteração da permeabilidade vascular no alvéolo secretor (Harmon, 1998; Langoni 2000; Freitas et al., 2005; Cunha et al., 2008).

Dentre os diferentes padrões utilizados para a avaliação da qualidade do leite em âmbito mundial, a CCS tem sido adotada pela grande maioria dos países tradicionalmente envolvidos na exploração leiteira (Hillerton e Berry, 2005; Cunha et al., 2008). A União Européia, a Nova Zelândia e a Austrália preconizam, atualmente, como limite máximo legal 400.000 cél./mL de CCS para o leite destinado ao consumo humano, enquanto o Canadá utiliza 500.000 cél./mL, e os EUA 750.000 cel./mL (Harmon, 1994; Sumner, 1996; Leclerc et al., 2002). No Brasil a IN 51 (BRASIL, 2002) iniciou a padronização da celularidade do leite em no máximo 1.000.000 cél./mL entre os anos de 2005 a 2008, reduzindo para 750.000 cél./mL em julho de 2011, e com expectativa de limitar em 400.000 cél./mL no segundo semestre de 2011 (BRASIL, 2008). Como não seria possível atingir esta padronização por grande parte dos produtores no país, houve a prorrogação da IN-51 e o valor máximo

de CCS atribuído para o segundo semestre do ano de 2011 permaneceu em inalterado em 750.000 células/mL (Santos, 2011).

A presença de altas contagens de células somáticas afeta a composição do leite e o tempo de vida de prateleira dos derivados, gerando enormes prejuízos para a indústria (Santos, 2003ac, Magalhães et al., 2004). A ocorrência de mastite causa redução na síntese de proteínas (caseínas) fundamentais para a fabricação de queijos e aumento das proteínas do soro, consideradas indesejáveis (Bueno et al., 2005, Santos, 2005). O leite com altas CCS geralmente apresenta baixo rendimento industrial na produção de queijos, aumento no conteúdo de água, do tempo de coagulação, do conteúdo de sólidos no soro, resultando em produto final de qualidade inferior (Vilela, 1998; Santos, 2003c; Bueno et al., 2005; Cunha et al., 2008). Para a manteiga, o leite em pó e outros derivados, a alta CCS esta associada á diminuição da vida de prateleira desses produtos, pois as células somáticas possuem enzimas resistentes à pasteurização que causam a deterioração da gordura, produzindo sabor rançoso e alterando o valor nutricional da proteína do leite e derivados (Vilela, 1998, Bansal et al., 2005; Bueno, 2005; Cunha et al., 2008).

O leite de vacas com altas CCS apresentam também redução do nível de lactose e cálcio, que são constituintes nobres do leite. Em contraste, ocorre aumento da concentração de sódio e cloro, repercutindo no sabor salgado do leite dos animais com mastite (Fonseca e Santos, 2000; Santos, 2003ac; Cunha et al., 2008).

2.5.2 Contagem Bacteriana Total

A contagem bacteriana total é um parâmetro utilizado para mensurar a contagem de unidades formadoras de colônias de micro-organismos aeróbios mesófilos no leite (BRASIL, 2002; Santos, 2005; IN 2009). Estudos conduzidos no Brasil têm mostrado que as principais fontes de contaminação para o leite por mesófilos aeróbios são a superfície dos equipamentos e utensílios de ordenha, a água residual dos latões e tanques de expansão, além dos tetos mal higienizados (Almeida et al., 1999; Langoni, 2000; Machado, 2000ab; Santos e Fonseca, 2006).

A carga microbiana do leite é uma variável dependente da carga bacteriana inicial e da taxa de multiplicação dos micro-organismos (Gonzalez et al., 2004; Quinn et al., 2005; Santos, 2005; Reis et al., 2007). A carga bacteriana inicial pode ser definida como a concentração de micro-organismos existentes no leite armazenado no tanque resfriador, imediatamente após o término da ordenha (Santos, 2003ac; Reis et al., 2007; Quist, 2008). Como a carga microbiana do leite geralmente é reflexo de deficiências na higiene da ordenha, limpeza e desinfecção da superfície dos tetos (Machado et al., 2000; Mendonça, 2001). As condições de limpeza dos utensílios e equipamentos de ordenha também são fundamentais e, caso negligenciadas podem gerar altas contagens microbianas (Fonseca e Santos, 2000; BRASIL, 2008; Santos, 2011). A qualidade da água utilizada tanto na lavagem dos tetos durante a ordenha, quanto na lavagem e desinfecção do sistema de ordenha também podem influenciar na contagem bacteriana do leite (Fonseca e Santos, 2000; Philphot e Nickerson, 2002; Polegato e Rudge, 2003; Freitas et al., 2009; Santos, 2011)

Raramente altas contagens bacterianas totais estão diretamente relacionadas à mastite (Fonseca e Santos, 2000; Tetzner et al., 2005; Santos e Fonseca, 2006), salvo nos casos de infecções mamárias por *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* ou *Escherichia coli* (Amaral et al., 2004; Quist, 2008; Faccioli, 2010) O leite de vaca sadia, coletado de forma asséptica, contém menos de 1.000 UFC/mL (Fonseca e Santos, 2000). Já o leite de animal com infecção na glândula mamária, pode apresentar contagens até 10.000.000 UFC/mL, podendo elevar a CBT do tanque para 100.000 UFC/mL num rebanho constituído por 100 vacas em lactação (Santos, 2003ac; Reis et al., 2007; BRASIL, 2008; Faccioli, 2010).

A ordenha de animais com tetos sujos e/ou úmidos pode elevar a CBT, enquanto a presença de fezes ou barro nos tetos pode aumentar a contagem de coliformes ou mesmo de bactérias psicrófilas (Fonseca e Santos, 2000; BRASIL, 2008). O manejo adequado da ordenha, com ênfase na preparação antecipada dos tetos (limpeza, pré-dipping e secagem completa), associado a programa de controle de mastite, são fundamentais para a

obtenção de leite com baixa CBT (Santos e Fonseca, 2006; BRASIL., 2008; Freitas et al., 2009).

A carga microbiana inicial está associada à limpeza dos utensílios utilizados para retirada e transporte do leite (Machado et al., 2000; Santos, 2005). A higienização adequada dos baldes, latões e sistema de ordenha são os principais fatores responsáveis pela produção de leite com alta qualidade, visando baixa carga microbiana inicial (Mendonça, 2001; Guerreiro, 2005; Freitas et al., 2009).

A taxa de multiplicação bacteriana está intimamente relacionada com a temperatura de armazenamento do leite e o tempo que o produto permanece na propriedade até ser coletado pelos laticínios (Santos e Fonseca, 2006; BRASIL. 2008).

Recomenda-se que a temperatura de armazenamento do leite seja de, no máximo 4°C, dentro de duas horas após o término da ordenha, e menor que 10°C durante a adição de leite da ordenha consecutiva (BRASIL, 2008). No entanto, cabe ressaltar que os tanques resfriadores somente reduzem a taxa de multiplicação bacteriana do leite (Machado et al., 2000; Gonzalez et al., 2004). O resfriamento do leite deve estar associado com às boas práticas de manejo e higiene na ordenha, limpeza e sanitização dos utensílios de ordenha (Santos e Fonseca, 2006). Esta preocupação deve ser ainda maior quando se adota programas de captação de leite nas fazendas a cada 48 horas, pois o risco de proliferação de micro-organismos psicotróficos é maior nestas situações (Machado, 2000). Programas de captação desta natureza são adequados em propriedades com baixa carga microbiana inicial, particularmente para bactérias psicrotróficas, e com sistema de frio corretamente dimensionado e em perfeito funcionamento (Philpot e Nickerson, 2002; Santos e Fonseca 2006; BRASIL., 2008).

O leite após ordenha deve chegar ao local de armazenamento (latão ou tanque) com carga microbiana variando entre 500 e 10.000 UFC/mL (Philpot e Nickerson., 2002; Santos, 2003a) e deve ser resfriado a 4°C dentro de duas horas após a ordenha (Fonseca e Santos, 2000). Na segunda ordenha, em propriedades que realizam duas ordenhas diárias, com tanque de expansão, a

temperatura do leite de mistura não deve ultrapassar 10 °C e deve reduzir para 4 °C dentro de uma hora após o término da ordenha (BRASIL, 2008).

Estima-se que mais de 95% dos problemas com alta CBT são originários de deficiências na lavagem e sanitização de utensílios e sistema de ordenha, deficiências na higiene da ordenha, e no de resfriamento do leite. Nestes criatórios, raramente a vaca é a fonte de elevação da CBT (Machado et al., 2000; Santos e Fonseca, 2006; Reis et al., 2007; Quist, 2008)

A IN-51 padronizou para o leite cru refrigerado nacional 1.000.000 UFC/mL até o segundo semestre do ano de 2008. No segundo semestre de 2008 até o mês de julho de 2011, reduziu os valores para 750.000 UFC/mL (BRASIL, 2002). No entanto, no mês de julho de 2011 esta contagem seria limitada em 100.000 UFC/mL para tanques individuais e 350.000 UFC/mL em tanques de expansão coletivos (BRASIL, 2002). Grande parte dos produtores de leite no Brasil não conseguiu atingir os valores previamente sugeridos pela IN-51 para CBT em julho de 2011. Assim à semelhança da CCS, houve a prorrogação da contagem para 750.000 UFC/mL até dezembro de 2011 (Tabela 1). Estudos realizados no Brasil têm demonstrado que, nos tanques coletivos ou comunitários, a contagem bacteriana total é o principal aspecto em desacordo com a IN-51, reforçando a importância da avaliação periódica da CBT como parâmetro de qualidade do leite nas diferentes bacias leiteiras do país (Santos e Fonseca, 2006; Villa, 2007; Freitas Filho et al., 2009).

Tabela 1. Padrões microbiológicos e de celularidade para o leite cru refrigerado de vaca, segundo Instrução Normativa 51 do Brasil

Prazos limites	Contagem Bacteriana Total (CBT)	Contagem Células Somáticas (CCS)
01/07/2005 até 01/07/2008	1.000.00 UFC/mL	1.000.00 Células/mL
01/07/2008 até 01/07/2011	750.000 UFC/mL	750.000 Células/mL
a partir 01/07/2011	100.000 UFC/mL (Individuais)	400.000 Células/mL
	350.000 UFC/mL (Coletivos)	

Fonte: BRASIL, 2002

2.5.3 Resíduos de antimicrobianos

O controle da mastite é fundamental no sistema produção leiteira (Santos e Fonseca, 2006). Os produtores buscam de forma continuada tecnologias que tornem as indústrias mais eficientes, gerando produtos de alta qualidade, com baixo custo e maior rendimento industrial (Lucci et al., 2006). Paradoxalmente, incluem no dia-a-dia o uso de produtos que garantam saúde e maior produção animal, como os antimicrobianos (Ribeiro, 2008). O uso indiscriminado destes fármacos aumenta a pressão seletiva para linhagens de micro-organismos resistentes, além do risco de resíduos no leite e derivados lácteos (Arashiro et al., 2008). A presença de resíduos de antimicrobianos causa prejuízos para a indústria, pela diminuição ou inibição da quantidade de bactérias responsáveis pela fermentação, processo rotineiramente utilizado na produção de queijos e iogurtes (Tetzner & Benedetti, 2005), bem como a possibilidade de reações orgânicas indesejáveis no homem (Almeida et al., 2003).

No Brasil, diversos estudos têm-se preocupado em monitorar a presença de resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema convencional. Nascimento et al. (2001) ao avaliarem a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em 96 amostras de leite comercializado em Piracicaba, SP, encontraram 50% de positividade, das quais 34,8% das amostras foram positivas para antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos. Barros et al. (2001) encontraram 38,5% das amostras de leite pasteurizado tipo C em Salvador, BA, contendo resíduos de antimicrobianos. Em contrapartida, Almeida et al. (2003) ao investigarem o leite de 158 propriedades rurais de Uberlândia, MG, detectaram resíduos de beta-lactâmicos em somente 1,89% das amostras.

São escassas as informações sobre a presença de antimicrobianos no “leite informal” (Freitas Filho et al., 2009), ainda que este leite comercializado sem qualquer fiscalização sanitária contemple aproximadamente 35% da produção nacional, vendido em padarias, bares e mercados, embalados em garrafas plásticas tipo “pets”, sob as mínimas condições higiênico-sanitárias (Villa, 2007).

O consumo de leite e derivados contendo resíduos de antimicrobianos pode desencadear fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis, efeitos tóxicos e carcinogênicos, alterações no equilíbrio da microbiota intestinal, assim como favorecem a pressão seletiva para linhagens de bactérias resistentes no trato gastrintestinal dos humanos (Almeida et al., 2003). A maioria da população humana é exposta a baixas doses de produtos químicos nocivos, de forma frequente e com efeitos em longo prazo (Kukurova e Hozova, 2003).

Atualmente, existem vários métodos de detecção de resíduos de antimicrobianos no leite, incluindo testes inibidores de multiplicação bacteriana, métodos imunológicos, testes receptores e enzimáticos (Almeida et al., 2003).

Para a avaliação da presença de antimicrobianos tem sido amplamente utilizado o método de inibição da multiplicação bacteriana em meio de cultivo específico (Delvotest™), em virtude da praticidade e capacidade de identificar grande quantidade de princípios ativos (Kukurova e Hozova, 2003). Este tipo de teste consiste na observação da capacidade de multiplicação “in vitro” do *Bacillus stearothermophilus* na presença de resíduos de antimicrobianos no leite (Fonseca e Santos, 2000).

A Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002) exige o monitoramento mensal da presença de resíduos de antimicrobianos no leite bovino, cuja responsabilidade é das indústrias. As análises devem ser realizadas somente por laboratórios oficiais ou credenciados do MAPA (BRASIL, 2002). O conhecimento da exposição da população a esses compostos é de fundamental importância para nortear as ações de controle visando à proteção do consumidor.

2.6 Mastite Bovina

2.6.1 Aspectos Gerais

A mastite é definida classicamente como inflamação da glândula mamária, causada principalmente por bactérias e, secundariamente, por fungos, vírus e algas (Ribeiro, 2008). Figura dentre as doenças infecciosas que mais oneram a criação de animais domésticos destinados à produção leiteira (Radostits et al., 2007).

Os maiores prejuízos aos produtores estão relacionados à redução na produção de leite diária pelos animais infectados, perda de tetos, descarte prematuro de fêmeas, aumento no volume de leite descartado, despesas com tratamento de mastite, honorários profissionais e morte ocasional de animais (Harmon, 1998; Langoni, 2000; Hillerton e Berry, 2005; Cunha, et al., 2008).

Os entraves na indústria de laticínios com a mastite são causados pelas alterações químicas, microbiológicas e da celularidade do leite, que acarretam redução do rendimento industrial de derivados e na qualidade do produto final, além de menor prazo de validade na prateleira (Harmon, 1994, Langoni, 2000; Hillerton e Berry, 2005; Martins, 2006).

Nos EUA, estima-se prejuízo de 1,8 bilhões de dólares ao ano em decorrência da mastite (National Mastitis Council, 1996). No Brasil, as estimativas de perda de produção variam entre 12% e 15%, correspondendo a 2,8 bilhões de litros anuais (Fonseca e Santos, 2000, Cunha et al., 2008).

As infecções mamárias geram impacto negativo na produção, no bem-estar animal e na qualidade do leite produzido (Hillerton e Berry, 2005; Holanda Júnior et al., 2005; Martins, 2006; Nader Filho et al., 2007), devido às lesões nas células secretoras, na maioria das vezes irreversíveis, que culminam com a acentuada diminuição na síntese do leite (Costa et al., 1995; Holanda Junior et al., 2005; Cassoli, 2008; Machado, 2008). As alterações no metabolismo celular da glândula mamária prejudicam a formação dos componentes do leite (Langoni, 2000; Motta et al, 2004; Machado, 2008). Ocorre aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e da rota paracelular de secreção de constituintes do leite, acarretando diferentes alterações na composição, a saber: aumento da contagem de células leucocitárias e epiteliais (células somáticas) e da contagem bacteriana total, diminuição dos teores de gorduras, proteína e lactose, aumento das frações do soro sanguíneo no leite, desequilíbrio salino, aumento de pH e diminuição das proteínas do leite (Fonseca e Santos, 2000; Santos e Fonseca, 2006; Arashiro et al., 2008).

2.6.2 Complexidade etiológica

As causas de inflamação da glândula mamária em animais são caracterizadas pela complexidade etiológica. Possuem origem traumática,

fisiológica, alérgica e, principalmente, infecciosa (Radostits et al., 2007; Ribeiro, 2008). Os processos infecciosos da glândula mamária são determinados predominantemente por micro-organismos de origem bacteriana e, secundariamente, por fungos, algas e vírus, muitos dos quais com potencial zoonótico (Ribeiro, 2008).

Convencionalmente, os micro-organismos envolvidos na casuística de mastite estão agrupados em contagiosos e ambientais, com base nas fontes de infecção e vias de transmissão (Langoni, 2000; Ribeiro, 2008). Os contagiosos são encontrados na microbiota da pele e mucosas dos animais, transmitidos fundamentalmente no momento da ordenha, pelas mãos do ordenhador, do úbere, do próprio equipamento de ordenha ou pelo ato de mamar do bezerro (Quinn et al., 2005; Ribeiro, 2008).

Os ambientais estão amplamente distribuídos no próprio ambiente dos animais, veiculados para a glândula mamária a partir do solo, fezes, ar, água, vetores, utensílios, fomites e a cama dos animais (Arashiro et al., 2008; Ribeiro, 2008). No Brasil e em outros países, a maior ocorrência de mastite em animais domésticos esta relacionada aos micro-organismos contagiosos, representados principalmente pelos estafilococos, estreptococos e *Corynebacterium bovis*. Paralelamente, entre os ambientais destacam-se na gênese da mastite: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus uberis*, determinadas espécies do gênero *Nocardia*, *Clostridium*, *Serratia*, *Proteus*, *Enterobacter*, algas (*Prototheca zopfii*), fungos e leveduras (Eberhart, 1984; Quinn et al., 2005; Radostits et al., 2007; Ribeiro, 2008).

2.6.2.1 Micro-organismos contagiosos

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) destaca-se como o micro-organismo mais frequentemente isolado das mastites contagiosas em rebanhos leiteiros em todo o mundo, também considerado de difícil tratamento devido à elevada resistência aos antimicrobianos (Aarestrup et al., 2001; Sears e McCarthy, 2003; Fagundes e Oliveira, 2004; Sá et al., 2004; Freitas et al., 2005; Nader Filho et al., 2007ab). Sá et al. (2004) isolou *S. aureus* de 64% das mãos de um grupo de ordenhadores e de 23% do interior das teteiras das

ordenhadeiras. Em humanos, este micro-organismo possui como habitat a pele e mucosas, e pode ser isolado em cerca de 50% das narinas de indivíduos sadios (Harmon et al., 1990; Bordolla, 2007).

Os estafilococos, particularmente o *Staphylococcus aureus*, colonizam a pele, o canal galactóforo e o parênquima mamário (Costa, 1991; Bordolla, 2007; Hata et al., 2006; Arashiro, 2008). Brito e Brito (1998) descreveram que microlesões na pele dos tetos favorecem a infecção pelo gênero *Staphylococcus*.

Os estafilococos coagulase-negativos (ECN) são importante grupo de bactérias contagiosas na mastite bovina (Radostits et al., 2007). Estudos em diferentes países demonstraram o envolvimento destes agentes em aproximadamente 50% dos casos da mastite bovina (Costa, 1991; Bordolla, 2007, Arashiro, 2008). Estes patógenos possuem alta capacidade de invadir os tecidos mamários, de formar microabscessos, resistem à fagocitose e mantêm-se viáveis no interior de fagócitos (Langenegger et al., 1981; Brabes et al., 1999).

Shultz et al. (2004) relataram a presença de 78,0% de ECN entre 202 bactérias isoladas de leite de vacas com mastite. Turutoglu et al. (2006) isolaram 239 linhagens de *Staphylococcus* de mastite bovina. Destas, 103 foram caracterizados como *S. aureus* e 136 como ECN.

As infecções causadas pelo gênero *Staphylococcus* geralmente são subclínicas, acarretando aumento significativo na CCS (Fonseca e Santos, 2000; Philpot e Nickerson, 2002; Nader Filho et al., 2007 b). Este gênero de bactérias causa danos ao parênquima mamário (Bueris et al., 2005; Lamaita et al., 2005), repercutindo na redução da produção de leite (Cardoso et al., 1999) formação de microabscessos e, em casos extremos, poderam evoluir para mastite gangrenosa, na qual os tetos ou áreas adjacentes do úbere adquirem a coloração negra ou azulada, com temperatura local reduzida, em função da perda do suprimento sanguíneo local (Fonseca e Santos, 2000; Brito e Brito, 2001, Radostits et al., 2007). Ademais, há formação de tecido fibroso, impedindo o acesso dos antimicrobianos no sítio da infecção, resultando em infecções persistentes com baixas da taxas de cura (Nader Filho et al., 2007ab; Radostits et al., 2007).

Streptococcus agalactiae é a espécie mais importante dos estreptococos envolvidos na gênese da mastite bovina (Quinn et al., 2005; Hillerton e Berry, 2005). Colonizam a pele, úbere e mucosa do trato respiratório e geniturinário dos animais (Quinn et al., 1994; Muller, 2002; Radostits et al., 2007).

Podem ser isolados do equipamento de ordenha, das mãos dos ordenhadores e da cama dos animais (Boddie et al., 1987; Philpot e Nickerson, 2002; Quinn et al., 2005). De maneira similar aos estafilococos, a disseminação deste grupo de bactérias ocorre principalmente durante a ordenha (Bansal et al., 2005; Ribeiro, 2008). *Streptococcus agalactiae* também induz a elevação da CCS e redução significativa na produção de leite no quarto afetado. (Bansal et al., 2005; Bordolla, 2007).

Corynebacterium bovis são bactérias encontradas principalmente no interior da glândula mamária e canal do teto. A elevada ocorrência de infecções por *C. bovis* nos rebanhos deve-se à deficiência nas práticas de ordenha e no pós-dipping (Philpot e Nickerson, 2002; Arashiro, 2008). As infecções são na grande maioria subclínicas, com elevação moderada na contagem de células somáticas (Smith, 1994; Santos, 2000; Philpot e Nickerson, 2002).

2.6.2.2 Micro-organismos ambientais

As mastites ambientais são causadas por enterobactérias, certos estreptococos, actinomicetos, fungos, leveduras e algas (Fonseca e Santos, 2000; Ribeiro, 2008).

As enterobactérias são representadas principalmente por *Escherichia coli* e os gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* (Veronessi, 2005; Martinez e Trabulsi, 2008). Segundo Fonseca e Santos (2000), as infecções por enterobactérias são geralmente de curta duração e mais de 50% dos casos duram menos de 10 dias. No entanto, cerca de 10% das infecções por este grupo de micro-organismos apresentam quadro tóxico hiperagudo, devido à liberação de substâncias pró-inflamatórias, em decorrência do lipopolissacarídeo (LPS) presentes na parede celular bacteriana (Brito e Brito, 2001; Kaipanem et al., 2002; Kaper et al., 2004; Veronessi, 2005).

As mastites por *E. coli* ocorrem principalmente nas primeiras semanas de lactação, sob a forma de graves manifestações clínicas (Langoni et al., 1998; Radostits et al., 2007). Em estudo conduzido por Hendriksen et al. (2008) foram isoladas ao redor de 4.500 (18%) linhagens de *E. coli* a partir do leite de vacas e das fezes de animais com diarreia, provenientes de 13 países da Europa, dentre mais de 25.000 isolados bacterianos.

O gênero *Klebsiella* apresenta baixa ocorrência na mastite bovina é encontrada em matéria vegetal e, particularmente, nos derivados de madeira como, pó-de-serra e serragem utilizados nas camas dos animais (Costa, 1998; Brito e Brito, 2001; Ribeiro et al., 2008). Estes micro-organismos podem produzir mastite hiperaguda septicêmica grave em ruminantes (Ribeiro et al., 2009)

Os estreptococos denominados ambientais também estão relacionados com a ocorrência de mastite, com exceção do *S. agalactiae* que é classificado como agente contagioso (Quinn et al., 2005). São representados principalmente por *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis* (Radostits et al., 2007). Estas bactérias encontradas são na palha, silagem, solo, microbiota da pele e trato respiratório dos animais (Costa, 1998; Brito e Brito, 2001; Quinn et al., 2005). As infecções por estreptococos ambientais são de curta duração, cerca de 60% das infecções duram menos de 30 dias. No entanto, 18% podem tornar-se crônicas, persistindo por mais de 100 dias (Radostits et al., 2007). Enquanto 40% das infecções por este grupo de estreptococos presentes em uma lactação apresentam cura espontânea (Fonseca e Santos, 2000).

Streptococcus dysgalactiae é classificado, convencionalmente, como estreptococo ambiental, embora possa se comportar como patógeno contagioso (Costa, 1998; Brito e Brito, 2001). Encontra-se viável no ambiente por elevado período de tempo (Smith, 1994; Costa, 1998; Quinn et al., 2005). Também pode ser isolado da pele dos tetos, além do ambiente (Brito e Brito, 2001; Radostits et al., 2007). É isolado frequentemente nas tonsilas de bovinos, reforçando que o ato de mamar dos bezerros pode transmitir o agente para a glândula mamária das vacas (Chapaval e Piekarski, 2000; Rubhun, 2000; Quinn et al., 2005).

Streptococcus uberis é o micro-organismo mais prevalente dentre os estreptococos ambientais isolados do leite de vacas (Brito e Brito, 2001). Não é considerado patógeno mamário obrigatório (Costa et al., 2005). É encontrado no solo, cama, úbere, trato respiratório alto e trato geniturinário dos animais (Radostits et al., 2007). A mastite causada por esta bactéria, geralmente inicia de forma súbita, resultando na formação de grumos e fibrose do quarto mamário acometido (Rubhun, 2000).

Outros micro-organismos estão envolvidos em menor frequência na mastite bovina, como os gêneros *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Proteus Serratia*, além de fungos, leveduras, algas e alguns vírus (Quinn et al., 1994; Langoni et al., 1998; Philpot e Nickerson 2002; Ribeiro 2008; Vasconcellos e Ito, 2011).

Nocardia spp. geralmente é encontrada em casos de mastite em propriedades com excesso de barro ou matéria orgânica no ambiente do entorno da sala de ordenha (Ribeiro, 2008). Costa et al. (2005) identificaram *Nocardia* sp. em amostras de água utilizada na limpeza de equipamentos e lavagem dos animais. Radostits et al., (2007) ressaltaram para o risco de mastite por *Nocardia* spp. em procedimentos inadequados no tratamento intramamário.

Os gêneros *Pseudomonas* e *Proteus* estão associados às mastites de veiculação hídrica, contaminando a água usada na lavagem dos tetos e equipamentos de ordenha (Quinn et al., 2005; Koneman et al., 2008; Fernandes et al., 2009). Pode ser encontrada também no solo e nas fezes de animais sadios (Koneman et al., 2008). Os casos geralmente são clínicos e variam desde mastite tóxica aguda a casos crônicos recidivantes (Rubhun, 2000; Fernandes et al., 2009).

Fungos (*Geotrichum* spp. e *Cryptococcus* spp.), leveduras (*Candida* spp.) e algas (*Prototheca* spp.) são micro-organismos de baixa ocorrência na mastite bovina no Brasil (Rebhun, 2000; Ribeiro, 2008). A infecção por esses micro-organismos ocorre em propriedades com deficiências no manejo de ordenha e/ou excesso de umidade e sujidades no local (Ribeiro, 2008). As infecções por estes micro-organismos também ocorrem por infusões intramamárias e por terapias antimicrobianas com cânulas ou sondas

contaminadas (Radostits et al., 2007). Podem ser isolados tanto de mastite clínica quanto subclínica (Ribeiro, 2008)

Em virtude da complexidade etiológica da mastite bovina, das exigências de avaliação dos indicadores de qualidade do leite pela IN-51 - particularmente nos períodos de transição da normativa – e da escassez de dados referentes á qualidade microbiológica e dos constituintes do leite informal; o presente estudo investigou os Indicadores de qualidade microbiológica, físico-química e detecção de resíduos de antimicrobianos, bem como os principais constituintes do leite de vacas colhido de tanque de expansão individual, coletivo e informal na região sudoeste do estado de São Paulo.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os principais indicadores de qualidade, composição e presença de micro-organismos, em amostras de leite de vacas obtidas de tanque de expansão individual, coletivo e leite informal, provenientes de rebanhos da região sudeste do estado de São Paulo.

3.2 Específicos

- Identificar os principais micro-organismos presentes no leite colhido de tanques de expansão individual; tanques coletivos e leite informal;
- Determinar a composição do leite (gordura, proteína, lactose, extrato seco total, extrato seco desengordurado e nitrogênio uréico) no leite obtido de tanques de expansão individual, tanques coletivos e leite informal;
- Avaliar a celularidade (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite colhido dos tanques de expansão individual, tanques coletivos e leite informal, em relação aos limites máximos permitidos pela Instrução Normativa 51 do MAPA;
- Detectar a presença de resíduos de antimicrobianos no leite colhido dos tanques de expansão individual, tanques coletivos e leite informal;
- Analisar os principais dados da cadeia produtiva do leite na região estudada, segundo variáveis de produção como média diária por propriedade, produção animal diária, número de animais em lactação e assistência veterinária nas propriedades.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de leite

Foram utilizadas para o estudo 100 amostras de leite de tanques de expansão individuais (leite contido no tanque era exclusivo de um produtor). 100 amostras foram colhidas de tanques de expansão coletivos (comunitários), que armazenavam o leite de 2 a 35 produtores diferentes. O material colhido dos tanques de expansão coletivos e individuais foi representativo de cerca 28 mil vacas em lactação e produção regional diária 297.600 mil litros de leite (Serviço de Defesa Agropecuário Regional, 2011). Também foram adquiridas 100 amostras de leite informal, comercializado em bares, mercearias ou diretamente na rua de municípios da região sudeste do estado de São Paulo, totalizando 300 amostras de leite que foram colhidas entre março de 2010 a março de 2011.

As amostras de leite de tanques de expansão individuais, coletivos e leite informal foram obtidas na bacia leiteira da região sudeste do estado de São Paulo, contemplando os seguintes municípios: Angatuba, Arandu, Avaré, Bernardino de Campos, Buri, Capão Bonito, Cerqueira Cesar, Coronel Macedo, Fartura, Itaberá, Itatinga, Itaí, Itapeva, Itaporanga, Itapetininga, Itararé, Pardinho, Pirajú, Riversul, Sarutaiá, Taguaí, Taquarituba, Tejupá, Timburi (limite de cinco propriedades por município). Dentre estas cidades, somente o município de Itapeva, SP, possui Lei Orgânica Municipal, que proíbe a venda de leite “informal”.

As propriedades utilizadas no estudo que possuíam tanques de expansão individuais apresentavam: ordenha do tipo mecanizada (balde ao pé, espinha de peixe ou fosso) e produção diária superior a 100 litros de leite, provenientes de propriedades com volume de produção diário entre de 120 a 3.000 litros dia.

As propriedades utilizadas no estudo que possuíam tanques de expansão coletivos apresentavam: ordenha tipo manual, leite proveniente de tanques com número variável entre 2 e 33 produtores e produção diária individual inferior a 150 litros (Tabela 2).

Na obtenção do leite informal, 72 amostras foram adquiridas em bares, mercearias, padarias, supermercados ou nas ruas da região do estudo.

As outras 28 amostras foram adquiridas em propriedades que realizavam a venda de leite direta no local, sem fiscalização. Os dados destes 28 produtores que comercializavam o leite informal foram comparados com os dados das propriedades com tanques de expansão coletivos e individuais, visto que não foi possível obter informações das características de produção dos criatórios das outras 72 amostras de leite informal estudadas.

A colheita de leite informal foi realizada em, no máximo, cinco pontos comerciais ou locais por município, pois, a região do estudo é constituída por pequenos municípios e um único produtor pode fornecer o leite a vários pontos de revenda. No ato da compra do leite informal, também foi avaliada a temperatura de conservação (ambiente, refrigerada ou congelada).

A amostragem utilizada no estudo foi considerada de conveniência, visto que a havia a necessidade do consentimento dos produtores ou das “linhas” de leite da região com tanques de expansão coletivos e tanques individuais, em permitirem a colheita do material, assim como cederem informações sobre as características de produção das propriedades.

4.2 Colheita de material

4.2.1 Tanque de expansão

As amostras de leite dos tanques de expansão coletivos e individuais das propriedades foram colhidas somente uma única vez (Figura 1A), de forma aleatória, em frascos esterilizados, visando o diagnóstico microbiológico. Simultaneamente, foram colhidas amostras em recipientes adequados para a contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), composição química do leite, avaliação do nitrogênio uréico e detecção de resíduos de antimicrobianos, de acordo com as normas da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (CBQL, 2010). Com exceção das amostras visando a CCS, mantidas em temperatura ambiente, as demais foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável (4°C) e encaminhadas aos diferentes laboratórios para os procedimentos diagnósticos específicos.

As amostras destinadas a determinação de resíduos de antimicrobianos ou substâncias inibidoras da multiplicação de micro-

organismos foram congeladas a -20°C até o processamento, enquanto as demais foram imediatamente processadas nas diferentes técnicas diagnósticas.

4.2.2 Leite Informal

As amostras de leite informal foram adquiridas em mercearias, padarias, bares, pequenas propriedades da região, ou diretamente na rua dos municípios alvos do estudo. Geralmente armazenado em garrafas plásticas de refrigerantes (Figura 1B). Após a compra, foram imediatamente alicotados em tubos padronizados de coleta, armazenados em caixas isotérmicas com temperatura entre 4 a 8°C , e enviados a Clínica do Leite - USP, em Piracicaba, SP, com vistas à caracterização dos mesmos indicadores de qualidade supracitados para o leite obtido de tanques de expansão individuais e coletivos.



Figura 1. Tipos de leite produzidos na região sudeste do estado de São Paulo. A= Tanques de expansão comunitários da Associação dos Produtores de Leite da Região de Itararé, SP (APRI); B= Garrafas plásticas de refrigerante utilizadas para a comercialização de leite informal em município da região sudeste do estado de São Paulo.

4.3 Análise da composição do leite

As 300 amostras de leite colhidas dos tanques de expansão individuais, tanques coletivos, assim como o leite informal foram acondicionadas em frascos apropriados, contendo conservante celular de leite (bronopol), refrigeradas a 4°C e encaminhadas imediatamente para o

diagnóstico físico-químico na Clínica do Leite – ESALQ – USP, Piracicaba, SP, visando à avaliação dos teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco total, extrato seco desengordurado e nitrogênio uréico (CBQL, 2010).

4.4 Contagem eletrônica de Células Somáticas (CCS)

As 300 amostras de leite obtidas dos tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal, foram colhidas e acondicionadas em tubos apropriados de plástico e homogeneizadas com conservante celular de leite (bronopol). O material foi disposto em caixas apropriadas e enviado para a Clínica do Leite – ESALQ – USP, Piracicaba, SP, com a finalidade de quantificar o número de células somáticas, de acordo com as recomendações técnicas do equipamento (Somacount 500¹). Foram consideradas em desacordo com a IN 51 as amostras de leite que apresentaram contagem celular > 750.000 células somáticas/mL (Langoni, 2000, Muller, 2002).

4.5 Contagem Bacteriana Total (CBT)

As 300 amostras de leite obtidas dos tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal visando à contagem bacteriana total foram colhidas em recipientes apropriados com conservante azidiol, no momento da colheita. Em seguida, foram encaminhadas para o diagnóstico na Clínica do Leite – ESALQ – USP, Piracicaba, SP, e processadas em, no máximo, cinco dias após a coleta (CBQL, 2010).

As amostras que apresentaram valores igual ou superiores 750.000 de UFC/mL foram consideradas em desacordo com os padrões exigidos pela Instrução Normativa 51 do MAPA (BRASIL, 2002).

4.6 Avaliação de resíduos de antimicrobianos no leite

A presença de resíduos de antimicrobianos foi investigada nas 300 amostras de leite utilizando o *kit* comercial Delvotest™², conforme as recomendações do fabricante, realizado no Laboratório de Diagnóstico

¹ Somacount 500. Bentley, USA

² Delvotest™: DSM Food Specialties Dairy Ingredients – The Netherlands.

Microbiológico, da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. As 300 amostras foram mantidas congeladas (-20°C) até o processamento.

O Delvotest™ tem como princípio de ação a inibição da multiplicação do micro-organismo *Bacillus stearothermophilus* variedade *calidolactis* C953, sensível aos principais grupamentos de antimicrobianos de uso veterinário e humano. O micro-organismo está disposto em ágar, no qual 0,1mL da amostra de leite é inoculada. Em seguida, o *kit* é incubado a 64°C por três horas. Após esse período, a presença de resíduos de antimicrobianos impedirá ou reduzirá a multiplicação do micro-organismo e o meio com indicador de pH permanecerá com coloração inalterada (azul), caracterizado como positivo. Na ausência de antimicrobianos detectáveis pelo teste, o micro-organismo se multiplicará acidificando o meio, alterando sua cor para amarelo, resultado considerado negativo.

4.7 Isolamento e caracterização dos microrganismos

Visando o cultivo microbiano e a identificação qualitativa dos micro-organismos, as 300 amostras de leite, foram enviadas para o Laboratório de Diagnóstico Microbiológico da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. O leite foi semeado nos meios de ágar acrescido de sangue bovino desfibrinado (5%) e ágar MacConkey, mantidos a 37°C, em condições de aerobiose, com leituras diárias mantidos por 72 horas. Os micro-organismos foram identificados segundo as características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo (Quinn et al., 2005; Trabulsi et al., 2005a,b; Murray et al., 2007).

Simultaneamente, todas as amostras de leite foram cultivadas no meio de Sabouraud dextrose, mantidas a 37°C, por 14 dias, visando o isolamento e identificação de fungos e leveduras (Lacaz et al., 1998; Quinn et al., 2005).

4.7.1 Identificação de *Staphylococcus* spp.

As colônias bacterianas sugestivas do gênero *Staphylococcus* foram coradas pelo método de Gram com o objetivo de visualizar morfologia e características tintoriais. Cocos agrupados em forma de “cacho-de-uva”, Gram-positivos, foram submetidos às provas de catalase e coagulase (Teixeira et al.,

2008). Para diferenciação de estafilococos coagulase positiva (ECP) e estafilococos coagulase negativa (ECN) foi realizada a prova da coagulase em tubos (Winn Jr. et al., 2008).

4.7.2 Identificação de enterobactérias

As linhagens bacterianas isoladas em ágar MacConkey, fermentadoras de lactose (coloração rósea das colônias), foram submetidas às provas bioquímicas para enterobactérias utilizando meios de cultura sólidos e semi-sólidos (Mili, EPM e Citrato) distribuídos em tubos de ensaio, visando determinar os seguintes parâmetros: produção de gás (glicose), H₂S, urease, L-TD (L-triptofano-desaminase), motilidade, indol, lisina e citrato de Simmons. Posteriormente à confirmação da espécie, as linhagens foram conservadas em caldo nutriente com glicerol 5%, a - 20°C.

4.7.3 Identificação de fungos e leveduras

As linhagens com aspecto de fungos ou leveduras isoladas em ágar Sabouraud foram submetidas às provas bioquímicas e tintoriais específicas (Lacaz et al., 1998). A identificação destes micro-organismos foi realizada no Serviço de Diagnóstico Microbiológico da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Presidente Prudente, SP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Rogério Giuffrida.

4.8 Principais indicadores de produção das propriedades

No momento da colheita do leite nas propriedades com tanques de expansão individuais, tanques coletivos e alguns produtores que comercializam o leite informal diretamente na propriedade, foram investigadas informações sobre as principais características de produção, a saber: município, número de produtores por tanque coletivo, laticínio responsável pela coleta do leite, volume de produção diária, média de produção vaca/dia, número de animais em lactação, raça dos animais, tipo de ordenha (manual ou mecânica) e nível de conhecimento dos produtores sobre a IN 51.

4.9 Assistência veterinária

Dentre as informações obtidas dos produtores na região do estudo, foi investigado também o tipo e a frequência de assistência veterinária nos criatórios. A orientação técnica profissional foi subdividida em assistência privada, comunitária ou privada e comunitária em associação. A assistência técnica comunitária se caracteriza na região por profissionais contratados pelo município ou estado que prestam serviços em uma determinada região e, geralmente são contemplados com grande número de produtores.

4.10 Consentimento (Ética)

Todas as amostras de leite de tanques de expansão individuais e tanques coletivos foram colhidas após esclarecimento sobre o projeto, com assinatura de termo autorizando o procedimento. As amostras de leite informal foram adquiridas direto dos vendedores nos municípios.

Os procedimentos do presente estudo foram aprovados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ/Unesp, Botucatu-SP (protocolo número 37-2011).

4.10 Orientação aos produtores

Após a análise final dos resultados os proprietários, dos criatórios de leite com tanques de expansão individuais, tanques coletivos e os 28 com leite informal, foram participados individualmente dos resultados mediante a elaboração de relatório sigiloso e detalhado dos parâmetros avaliados em cada propriedade. Aqueles que estiveram em desacordo com a IN 51 – em especial quanto ao perfil de qualidade microbiológica, CCS, CBT e/ou resíduos de antimicrobianos –, foram orientados a adotar medidas (dependendo da situação específica de cada produtor/propriedade) de controle e profilaxia de mastite, e instruídos quanto aos procedimentos para ordenha higiênica, no intuito de adequar o processo e atender as exigências de produção e comercialização de leite, com vistas as normas preconizadas pela IN 51 do MAPA (BRASIL, 2002).

4.11 Análise estatística

A comparação das CCS e o exame microbiológico foi realizada pelo teste de Friedman ou de Kruskal-Wallis. A comparação dos valores de constituintes do leite e o exame microbiológico foi realizada pelo teste de Student. A influência do tipo do tanque de expansão (individual, coletivo) e leite informal, sobre a CCS e CBT foi analisada pelo teste de Friedman e para os constituintes do leite por análise de variância. Em todas as análises foram consideradas diferenças significantes para valores de $p < 0,05$ (Mead e Curnow, 1993; Triola, 1999).

5. RESULTADOS

5.1 Informações sobre as características de produção das propriedades

Os dados referentes a produção diária em litros, número de animais em lactação e produção média de leite\animal\dia correspondentes aos produtores com tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal na região estudada, estão agrupados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Medidas descritivas das variáveis quantitativas, da produção diária em litros das propriedades, número de animais em lactação e produção média (litros\vaca\dia), obtidas de criatórios com tanques de expansão individuais, coletivos e leite informal na região sudeste do estado de São Paulo, 2010-2011.

Medida descritiva	Produção diária propriedade (litros)			Animais em lactação			Produção média diária (litros\vaca\dia)		
	Ind	Col	Inf	Ind	Col	Inf	Ind	Col	Inf
Mínimo	120	12	15	11	2	4	3	2,3	2
Mediana	280	43	66	33	6	10	9,5	6,5	5
Máximo	3000	125	500	200	14	32	20	13,2	20
Média	369,3	47,8	100,6	44	6	13	9,9	6,6	6,1
Desvio Padrão	443,5	23,9	109,8	31,6	2,3	8,1	4,0	2,3	3,7

Ind: Tanques individuais, Col: Tanques coletivos, Inf: Leite informal

Foi observada variação estatística significativa ($P < 0,05$) quanto às medianas de produção leiteira diária para os três tipos de leite, nos quais os tanques de expansão individuais apresentaram 280 litros\leite\propriedade\dia (120 a 3000 litros\leite\dia), tanques coletivos 43 leite\propriedade\dia (12 a 125

litros\leite\dia), e leite informal 66 litros\leite\propriedade\dia (15 a 500 litros\leite\dia).

Para os tanques individuais, 38% das propriedades apresentaram produção média diária entre 120 e 220 litros de leite, 32% entre 230 e 330 litros de leite, 25% entre 340 e 680 litros de leite, 6% entre 700 e 1000 litros e 4% entre 1750 a 3000 litros. A média de vacas em lactação foi de 44 animais (variando de 11 a 200), e a média de produção por animal foi de 9,9 litros de leite\vaca\dia, oscilando entre 3 a 20.

Nos tanques coletivos foi observado que 61% dos produtores produzem entre 12 e 50 litros de leite por dia, 35% entre 51 e 100 litros e 3% entre 116 e 125 litros dia. A média de vacas em lactação foi de quatro animais (mínimo 2 e máximo 14). A média de produção foi 6,6 litros de leite\vaca\ dia (variando de 2,3 a 13,2).

Nas 28 propriedades onde foram adquiridas o leite informal, observou-se que 50% (14 propriedades) produziam entre 15 e 50 litros de leite por dia, 32% (9 propriedades) entre 51 e 100 litros dia, 11% (3 propriedades) entre 101 e 200 litros de leite e 8% (2 propriedades) entre 201 e 500 litros de leite por dia. A média de vacas em lactação foi de 13 animais (variando de 4 a 32). Enquanto a média de produção foi de 6,1 litros de leite\vaca\dia (variando de 2 a 20).

A Tabela 3 sumaria as principais raças e cruzamentos das vacas nas quais foram colhidas as amostras de leite de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal na região do estudo.

Tabela 3. Distribuição das raças e cruzamentos das vacas destinadas à exploração leiteira, em propriedades com tanques de expansão individuais, tanques coletivos e que comercializavam leite informal na região sudeste estado de São Paulo, 2010-2011.

	Tanque Individual	Tanques Coletivos	Leite Informal
Raças / Cruzamentos	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)
Cruzadas	38\100 (38%)	64\100 (64%)	16\28 (57,14%)
Girolanda	24\100 (24%)	17\100 (17%)	6\28 (21,42%)
Holandês Preto e Branco	22\100 (22%)	10\100 (10%)	3\28 (10,71%)
Jersey	10\100 (10%)	4\100 (4%)	2\28 (7,14%)
Jersolanda	2\100 (2%)	3\100 (3%)	---
Gir	4\100 (4%)	2\100 (2%)	1\28 (3,59%)

Foi encontrado maior número de animais mestiços no plantel leiteiro na região estudada nos três tipos de leite amostrados (tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal seguido pela raça Girolanda e Holandês Preto e Branco (Tabela 3).

A Tabela 4 apresenta as formas de refrigeração do leite informal comercializado na região amostrada.

Tabela 4. Refrigeração de leite informal de vaca comercializado na região sudeste de estado de São Paulo, 2010-2011.

Leite Informal	Frequência Absoluta (nº amostras\ nº total de amostras)	Frequência Relativa (%)
Refrigerado	48\100	48,0%
Temperatura ambiente	45\100	45,0%
Congelado	7\100	7,0%
Total	100	100,0%

Foi observado que 45% do leite informal adquirido na região do estudo estava mantido em temperatura ambiente no momento da comercialização (Tabela 4, Figura 2).



Figura 2. Leite informal acondicionado em garrafas de plástico de refrigerante, mantidos em temperatura ambiente comercializado nas ruas de município da região sudeste do estado de São Paulo, 2011.

As tabelas 5 e 6 resumiam a frequência e o tipo de assistência técnica veterinária nas propriedades leiteiras da região estudada. Somente 30% dos tanques de expansão individuais amostrados são originados de criatórios com assistência veterinária privada, enquanto 25% das propriedades possuem assistência comunitária e 42% não possuem qualquer tipo de assistência técnica veterinária.

Nos criatórios com tanques de expansão coletivos, 25% possuem assistência veterinária comunitária, 11% privada e 62% não dispõem de qualquer tipo de assistência veterinária.

Nas 28 amostras de informal comercializadas na região nas quais foi possível obter dados das características de produção das propriedades de origem, somente 10,7% e 7,1% possuem, respectivamente, assistência técnica privada e comunitária. Em contraste, nestas amostras obtidas de leite informal, 82,2% não dispõem de nenhum tipo de assistência veterinária.

Tabela 5. Tipo de assistência técnica veterinária recebida em propriedades produtoras de leite de vacas, com tanque individual, tanques coletivos e leite informal. Região Sudeste do Estado de São Paulo, 2010 -2011.

Assistência Técnica	Tanques Individuais	Tanques Coletivos	Leite Informal
	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)
	Total de amostras	Total de amostras	Total de amostras
Nenhuma	42,0% (100)	62,0% (100)	82,2% (28)
Comunitária	25,0% (100)	25,0% (100)	7,1% (28)
Privada	30,0% (100)	11,0% (100)	10,7% (28)
Comunitária e Privada	3,0% (100)	2,0% (100)	-- (28)
Total	100,00% (100)	100,00% (100)	100,00% (28)

Tabela 6. Medidas descritivas das variáveis de amostras de leite de vacas obtidas em tanques de expansão individuais, tanques coletivos, e leite informal, segundo o tipo de assistência técnica veterinária em criatórios da região sudeste do Estado de São Paulo, 2010 – 2011.

Variável	Medida descritiva	Tanque Individual			Tanques Coletivos			Leite Informal			Valor p
		Tipo			Assistência			Técnica			
		N	C	P	N	C	P	N	C	P	
	Valor mínimo	3	5	8	2,3	4	5	2	3	4	
	1° Quartil	4,7	5,2	6,9	3,4	4,3	5,1	2,9	3,6	7,1	
Produção média (L/vaca/dia)	Mediana	5,1 ^a	5,8 ^a	8,5 ^b	5,6 ^a	5,9 ^a	7,3 ^b	4,2 ^a	4,7 ^a	6,1 ^b	p<0,01
	3° Quartil	7,2	8,8	13,9	6,2	7,1	8,3	5,9	7,3	12,3	
	Valor máximo	12	15	20	7	9	13,2	7	10	20	
	Média	5,4	5,9	9,1	5,8	6,2	7,4	4,6	5,1	7,6	
	Desvio padrão	3,3	3,6	5,4	3,5	4,1	4,8	2,9	3,2	4,3	

N = Nenhuma assistência técnica fixa mensal, C = Assistência técnica comunitária ou casa da lavoura, P = Assistência técnica fixa mensal privada.

L/vaca/dia = litros de leite produzidos/vaca/dia

As medidas de controle e profilaxia da mastite e de higiene de ordenha adotadas nos criatórios estudados com tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Frequência de medidas de controle e profilaxia da mastite bovina e de higiene de ordenha em amostras de leite obtidas de criatórios com tanques de expansão individual, coletivos e que comercializam leite informal na região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

Procedimento adotado	Tanques individuais	Tanques coletivos	Leite informal
	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)
	(Total de Amostras)	(Total de Amostras)	(Total de Amostras)*
Nenhum procedimento	59,0% (100)	68,0% (100)	85,7% (28)
Limpeza dos tetos com água e secagem antes da ordenha	6,0% (100)	21,0% (100)	7,3% (28)
Pré-dipping e secagem dos tetos antes da ordenha	8,0% (100)	8,0% (100)	3,5% (28)
Pré-dipping, secagem dos tetos e pós-dipping	12,0% (100)	3,0% (100)	-- (28)
Pré-dipping, secagem dos tetos, pós-dipping e terapia da vaca seca	15,0% (100)	-- (100)	3,5% (28)
Total	100,00% (100)	100,00% (100)	100,00% (28)

* Dados das características de produção das propriedades de origem obtidos de somente 28 criatórios que comercializam leite informal.

Foi observado que a maioria dos criatórios da região estudada, para os três tipos de leite amostrados, não adotam com frequência procedimentos de rotina visando a profilaxia, controle da mastite e de higiene de ordenha. Foi constatado também que, somente 15% e 3,5% das propriedades, respectivamente, com tanques de expansão individuais e que comercializam leite informal realizavam simultaneamente pré-dipping, secagem dos tetos, pós-dipping e terapia da vaca seca. Em contraste nos criatórios com tanques coletivos nenhum produtor adotava as medidas supra citadas para a obtenção de leite com qualidade.

5.2 Contagem de Células Somáticas (CCS)

Os resultados da CCS do leite obtido dos criatórios com tanques de expansão individuais, tanques coletivos e de leite informal estão sumariados nas Tabelas 8 \ 9 e Figuras 3 e 4.

Tabela 8. Contagem de células somáticas do leite obtido de 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e de 100 amostras de leite informal em propriedades da região sudeste do estado de São Paulo, 2010-2011.

CCS (cél/s/ml)	Tanque Individual	Tanque Coletivo	Leite Informal
	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta
	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)
< 400.000	27 (27,0%)	36 (36,0%)	14 (14,0%)
≥ 400.000 a ≤ 750.000	32 (32,0%)	33 (33,0%)	19 (19,0%)
>750.000 a ≤ 1.000.000	14 (14,0%)	10 (10,0%)	12 (12,0%)
>1.000.000 a <2.000.000	10 (10,0%)	9 (9,0%)	21 (21,0%)
≥2.000.000	17 (17,0%)	5 (5,0%)	34 (34,0%)
Média (cél/s/mL)	1.169.020	642.760	2.053.680
Mediana (cél/s/mL)	641.500	467.500	1.199.000
Total	100 (100,0%)	100 (100,0%)	100 (100,0%)

Valores de referência segundo IN 51 máximo 750.000 cél/ml até 31/12/2011 (BRASIL, 2002).

CCS = Contagem de Células Somáticas

Cél/s/mL = células/mililitro

Foi verificado que 41% dos tanques de expansão individuais, 24% dos tanques coletivos e 67% das amostras comercializadas sob a forma de leite informal na região estudada estão acima dos valores máximos de CCS vigentes pela IN 51, no momento da coleta, com celularidade superior a 750.000 céls/mL até 31\12\2011. Foi constatado também que somente 27% e 43%, respectivamente, dos produtores com tanques de expansão individuais e tanques coletivos estariam produzindo leite com $CCS \leq 400.000$ céls/mL, valor que seria adotado pela IN 51 do MAPA (BRASIL, 2002), a partir de 01 de julho de 2011.

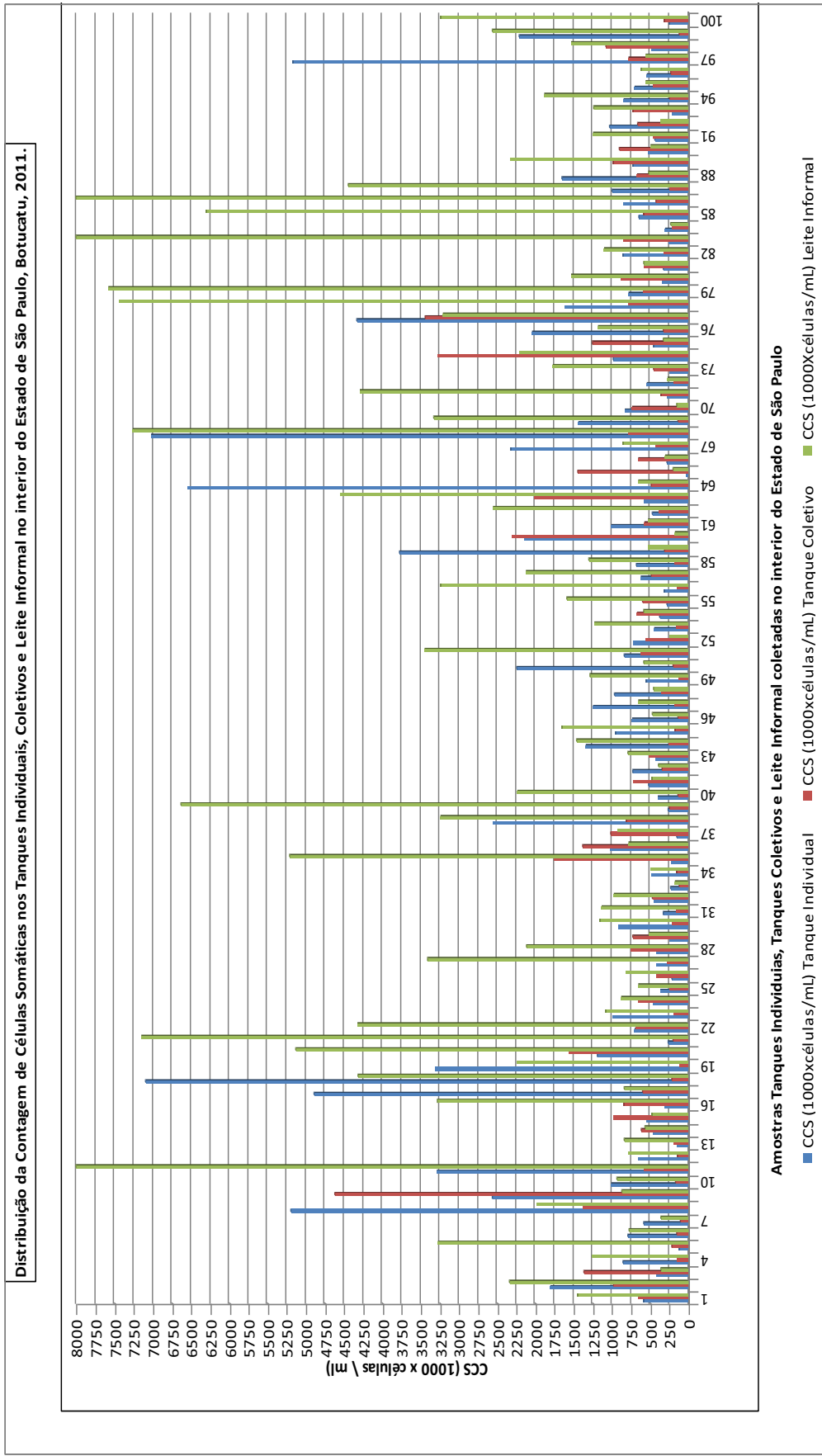


FIGURA 3. Distribuição da contagem de células somáticas em 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal obtidas na região sudeste do estado de São Paulo, 2010 -2011.

Motta, R.G., 2012.

Tabela 9. Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da contagem de células somáticas em amostras de leite de vacas oriundas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal. Região sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011.

Variáveis/Grupo	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
Contagem de células somáticas (x1000/mL)					
Tanques coletivos	91,0	196,5	476,5 ^a	756,0	4612,0
Tanques individuais	70,0	378,0	641,5 ^b	1016,0	7090,0
Leite informal	145,0	550,5	1199,0 ^c	2874,0	9315,0

Estatística: para cada uma das variáveis, valores de medianas seguidas de letras diferentes indicam que ocorreram diferenças significativas entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis.

P25 = percentil 25

P75 = percentil 75

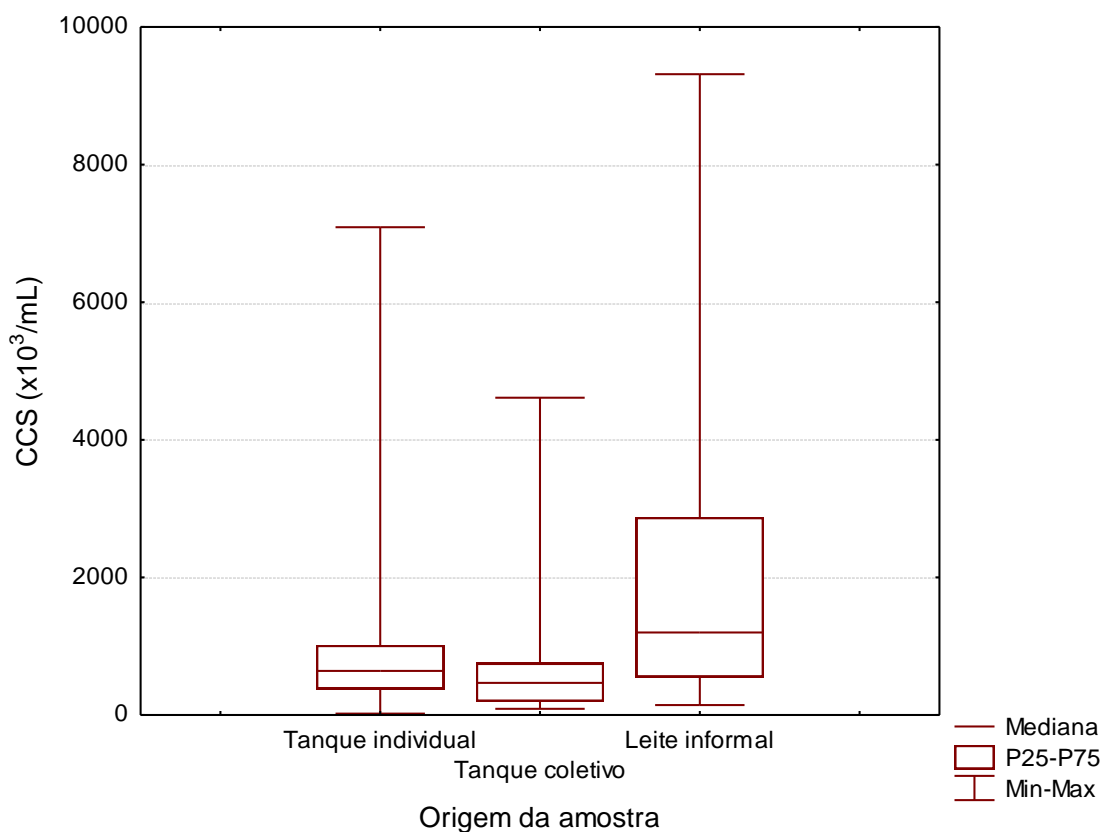


Figura 4. Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da contagem de células somáticas em amostras de leite de vacas obtidas em tanques de expansão individuais, tanques coletivos, e leite informal. Região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

5.3 Contagem Bacteriana Total (CBT)

Os resultados da CBT das amostras de leite obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal na região estudada estão agrupados nas Tabelas 10 e 11 e Figuras 5 e 6.

Foi observado que 10% das propriedades com tanques de expansão individuais, 71% dos coletivos e 86% de leite informal estão em desacordo com a IN 51, visto que acusaram CBT >750.000 UFC/mL. Constatou-se, também, que somente 5% dos produtores com tanques de expansão coletivos e 16% com tanques individuais estariam produzindo leite com CBT de 100.000 UFC/ml e 300.000 UFC/mL, respectivamente, para tanques individuais e coletivos, conforme os valores iniciais propostos pela IN 51, que seriam adotados a partir de 1 de julho de 2011.

Tabela 10. Contagem bacteriana total (UFC/mL) do leite em 100 tanques individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal de vacas obtidos em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

CBT * (UFC/mL)	Tanque Individual	Tanque Coletivo	Leite Informal
	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta
	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)
0 – <100.000	16 (16,0%)	1 (1,0%)	1 (1,0%)
≥100.000 - < 300.000	29 (29,0%)	5 (5,0%)	4 (4,0%)
≥300.000 - <650.000	22 (22,0%)	5 (5,0%)	4 (4,0%)
≥650.000 - < 750.000	23 (23,0%)	18 (18,0%)	5 (5,0%)
≥ 750.000 - <2.000.000	7 (7,0%)	16 (16,0%)	13 (13,0%)
> 2.000.000	3 (3,0%)	55 (55,0%)	73 (73,0%)
Média	482,12	2.803,34	3.729,43
Mediana	317,50	2.132,50	3.515,00
Total	100 (100,0%)	100 (100,0%)	100 (100,0%)

*Valores de referência segundo a IN 51 são 750.000 UFC/ml para tanques individuais e tanques coletivos até 31/12/2011 (BRASIL, 2002).

CBT = Contagem bacteriana total

UFC = unidades formadoras de colônias

Tabela 11. Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da contagem bacteriana total (CBT) em amostras de leite obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal de vacas, em criatórios da região sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011.

Variáveis/Grupo	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
Contagem bacteriana total					
Tanques coletivos	86,0	968,0	2132,5 ^b	3671,5	9999,0
Tanques individuais	19,0	125,5	317,5 ^a	598,5	4499,0
Leite informal	61,0	1883,0	3515,0 ^c	5335,5	9524,0

Estatística: para cada uma das variáveis, valores de medianas seguidas de letras diferentes indicam que ocorreram diferenças significativas entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis.

P25 = percentil 25

P75 = percentil 75

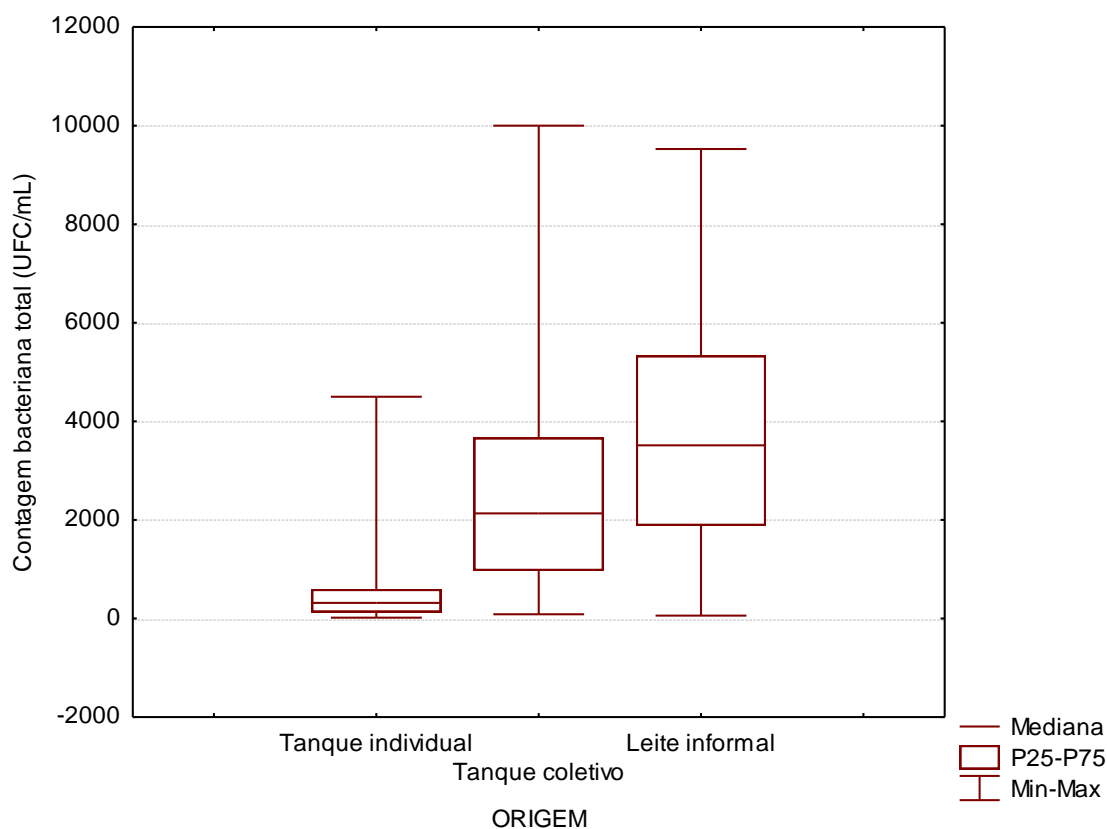
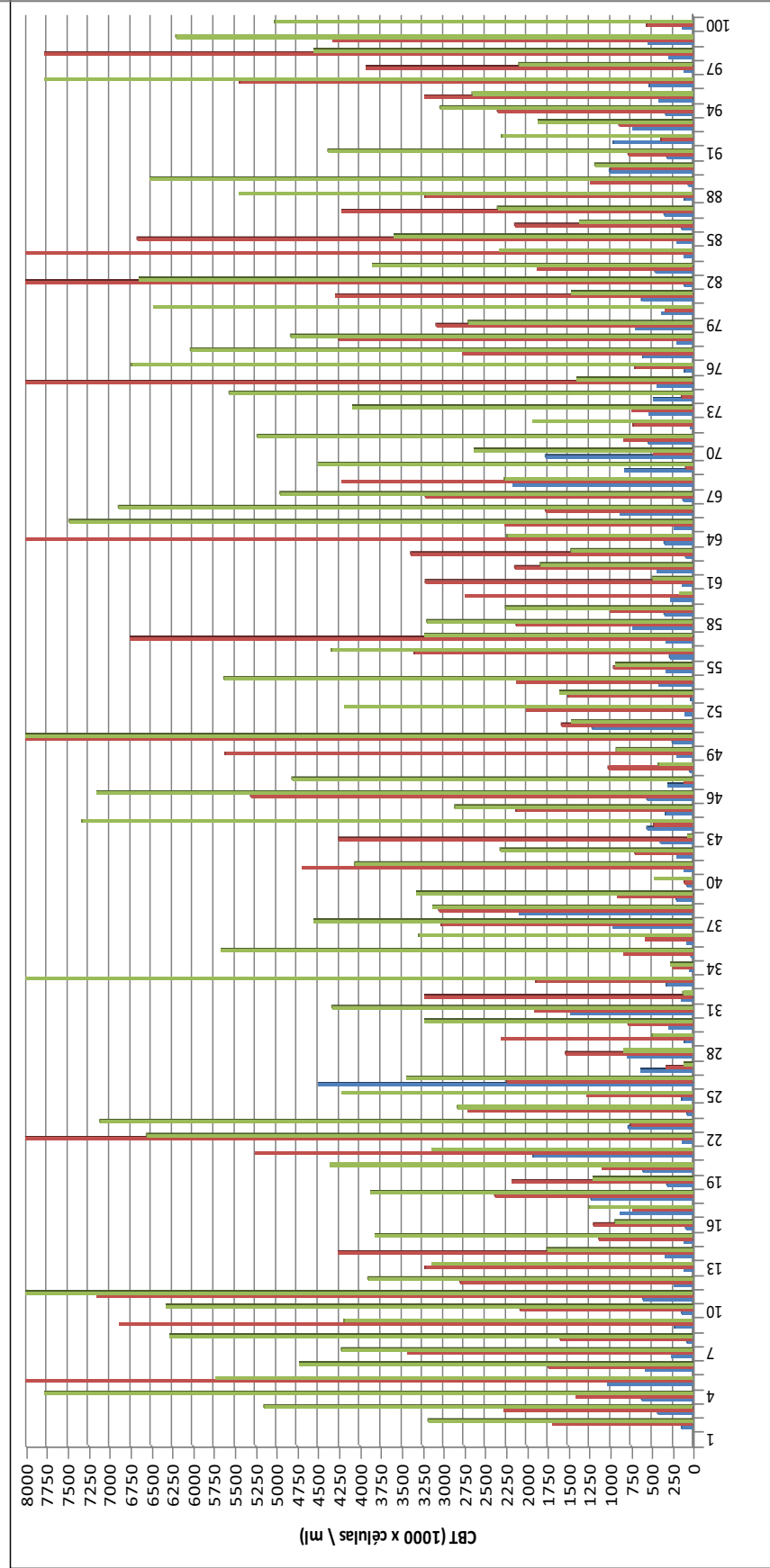


Figura 5. Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da contagem de bacteriana total (UFC/mL) em amostras de leite obtidas de tanques de expansão individuais, coletivos e leite informal de vacas, em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

Distribuição da Contagem Bacteriana Total nos Tanques Individuais, Coletivos e Leite Informal no interior do Estado de São Paulo, Botucatu, 2011.



Amostras Tanques Individuais, Tanques Coletivos e Leite Informal coletadas no interior do Estado de São Paulo

■ CBT (1000 x células / mL) Tanque Individual ■ CBT (1000 x células / mL) Tanque Coletivo ■ CBT (1000 X células / mL) Leite Informal

FIGURA 6. Contagem bacteriana total (1000 x células \ mL) em 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal de vacas obtidos em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 – 2011.

Motta, R.G., 2012.

5.4 Composição do leite de vacas

Os resultados da composição do leite de vacas utilizados como indicadores de qualidade do produto obtidos nas amostras dos tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal estão apresentados nas Tabelas 12 a 16 e Figuras 7 a 11.

5.4.1 Sólidos totais

A tabela 12 apresenta o resultado dos teores de sólidos totais, obtidos no leite de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal de vacas na região estudada.

Foi observado que 31,0% do leite dos tanques de expansão individuais, 60,0%, dos tanques coletivos e 49,0% do leite informal de vacas acusaram teores de sólidos totais considerados normais (Tabela 12), entre 11,0 e 13,0 %\mm (Tronco, 2003).

Tabela 12. Teores de sólidos totais (%/mm) em 100 amostras de leite obtidas de tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal de vacas em criatórios da região sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011.

Sólidos Totais* (%/mm)	Tanque Individual	Tanque Coletivo	Leite Informal
	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta
	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)
8,0 – 9,0	8 (8,0%)	-	5 (5,0%)
9,1 – 10,0	19 (19,0%)	2 (2,0%)	11 (11,0%)
10,1 – 11,0	25 (25,0%)	12 (12,0%)	20 (20,0%)
11,1 – 12,0	15 (15,0%)	18 (18,0%)	28 (28,0%)
12,1 – 13,0	16 (16,0%)	42 (42,0%)	21 (21,0%)
13,1 – 14,0	8 (8,0%)	17 (17,0%)	9 (9,0%)
14,1 – 15,0	6 (6,0%)	5 (5,0%)	5 (5,0%)
15,1 – 16,0	2 (2,0%)	2 (2,0%)	-
16,1 – 20,0	1 (1,0%)	2 (2,0%)	1 (1,0%)
Média	11,39	12,57	11,62
Mediana	11,00	12,60	11,60
Total	100 (100,0%)	100 (100,0%)	100 (100,0%)

Valores normais 11,0 a 13,0 %\mm (Tronco, 2003)

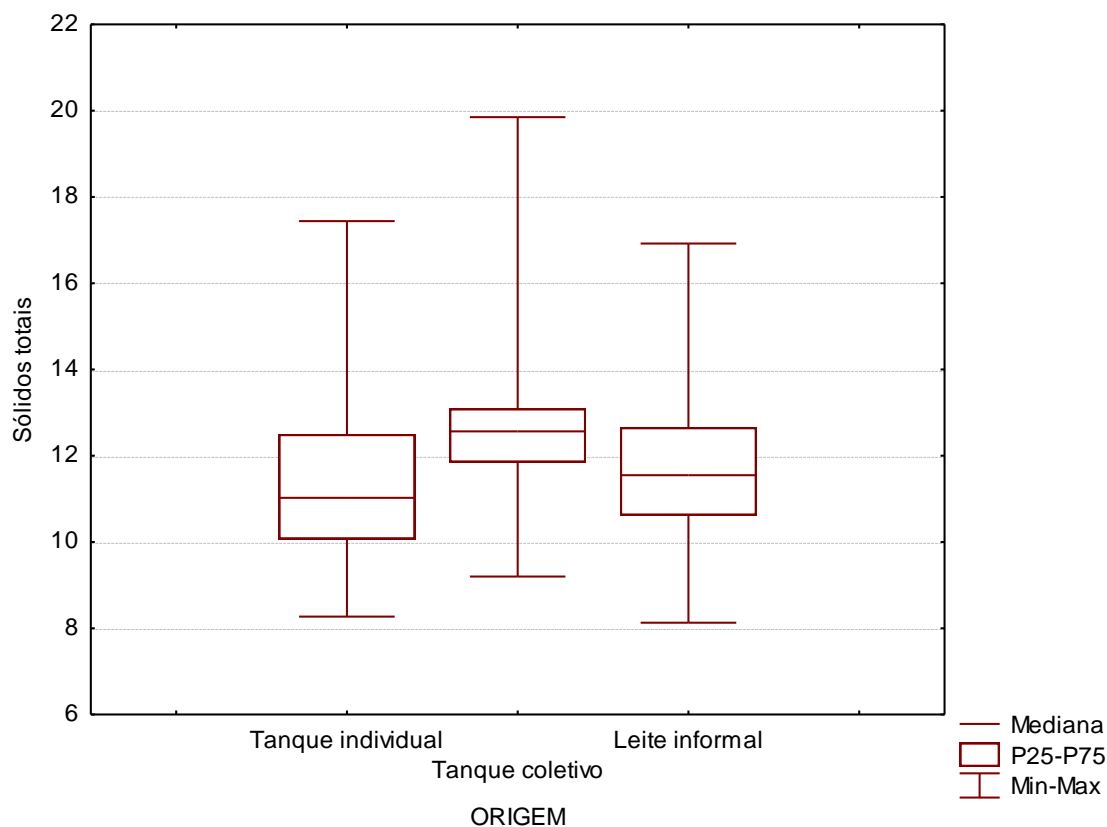


Figura 7. Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 dos sólidos totais (%mm) em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

5.4.2 Proteína

A Tabela 13 apresenta o resultado dos teores de proteína obtidos no leite de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal de vacas na região estudada.

Foi constatado que 32% do leite proveniente dos tanques de expansão individuais, 5% dos tanques coletivos e 3% do leite informal encontravam-se com teores de proteína em desacordo com a IN 51 (BRASIL, 2002), considerado de, no mínimo, 2,9 g\100g ou %mm.

Tabela 13. Teores de proteína (g/100g) em leite obtido de 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal de vacas, em criatórios da região sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011.

Proteína* (%/mm)	Tanque Individual	Tanque Coletivo	Leite Informal
	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta
	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)
1,00 – 1,59	2 (2,0%)	-	-
1,60 – 2,00	2 (2,0%)	2 (2,0%)	-
2,01 – 2,89	28 (28,0%)	3 (3,0%)	3 (3,0%)
2,90 – 3,00	23 (23,0%)	8 (8,0%)	27 (27,0%)
3,01 – 3,59	41 (41,0%)	66 (17,0%)	67 (67,0%)
3,60 – 4,00	3 (3,0%)	17 (17,0%)	1 (1,0%)
4,01 - 4,59	1 (1,0%)	2 (2,0%)	-
4,60 – 5,60	-	2 (2,0%)	-
Média	2,84	3,35	3,15
Mediana	3,00	3,40	3,20
Total	100 (100,00%)	100 (100,00%)	100 (100,00%)

*Valores de referência segundo IN 51 2,9 em g/100g ou %/mm (BRASIL, 2002)

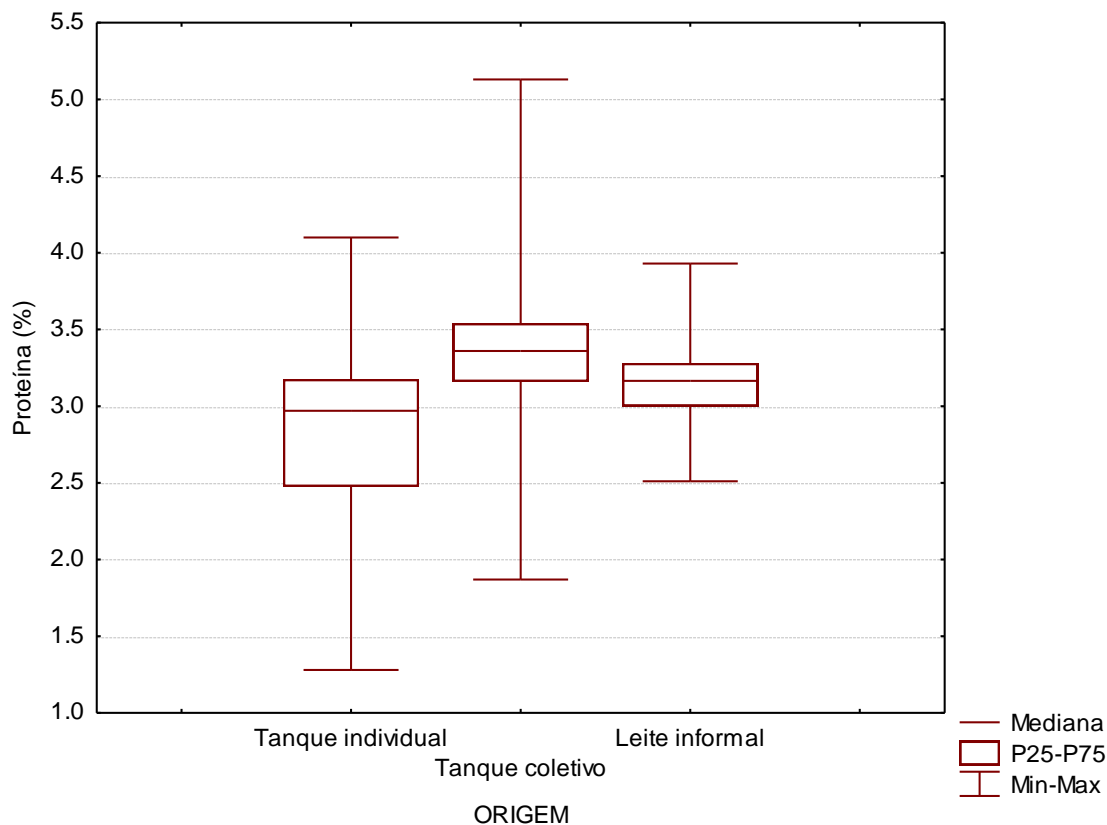


Figura 8. Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da proteína (%\mm) em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

5.4.3 Lactose

A Tabela 14 apresenta o resultado dos teores de lactose, obtidos no leite de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal de vacas na região estudada.

Foi constatado que somente 33% do leite proveniente dos tanques de expansão individuais, 51% dos tanques coletivos e 36% do leite informal encontravam-se com teores de lactose considerados normais pela IN 51 entre 4,7 a 4,9 %\mm (BRASIL, 2002).

Tabela 14. Teores de lactose (%/mm) em leite obtido de 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal de vacas, em criatórios da região sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011.

Lactose* (%/mm)	Tanque Individual	Tanque Coletivo	Leite Informal
	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta
	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)
1,7 – 2,00	1 (1,0%)	-	-
2,01 – 2,59	7 (7,0%)	-	-
2,60 – 3,00	3 (3,0%)	3 (3,0%)	-
3,01 – 3,59	13 (13,0%)	7 (7,0%)	2 (2,0%)
3,60 – 4,00	9 (9,0%)	5 (5,0%)	6 (6,0%)
4,01 - 4,69	25 (25,0%)	25 (25,0%)	52 (52,0%)
4,70 – 5,00	33 (33,0%)	51 (51,0%)	36 (36,0%)
5,01 – 5,60	10 (10,0%)	9 (9,0%)	4 (4,0%)
Média	4,18	4,23	4,40
Mediana	4,40	4,50	4,50
Total	100 (100,00%)	100 (100,00%)	100 (100,00%)

*Valor normal = 4,7 a 4,9%/mm (BRASIL, 2002)

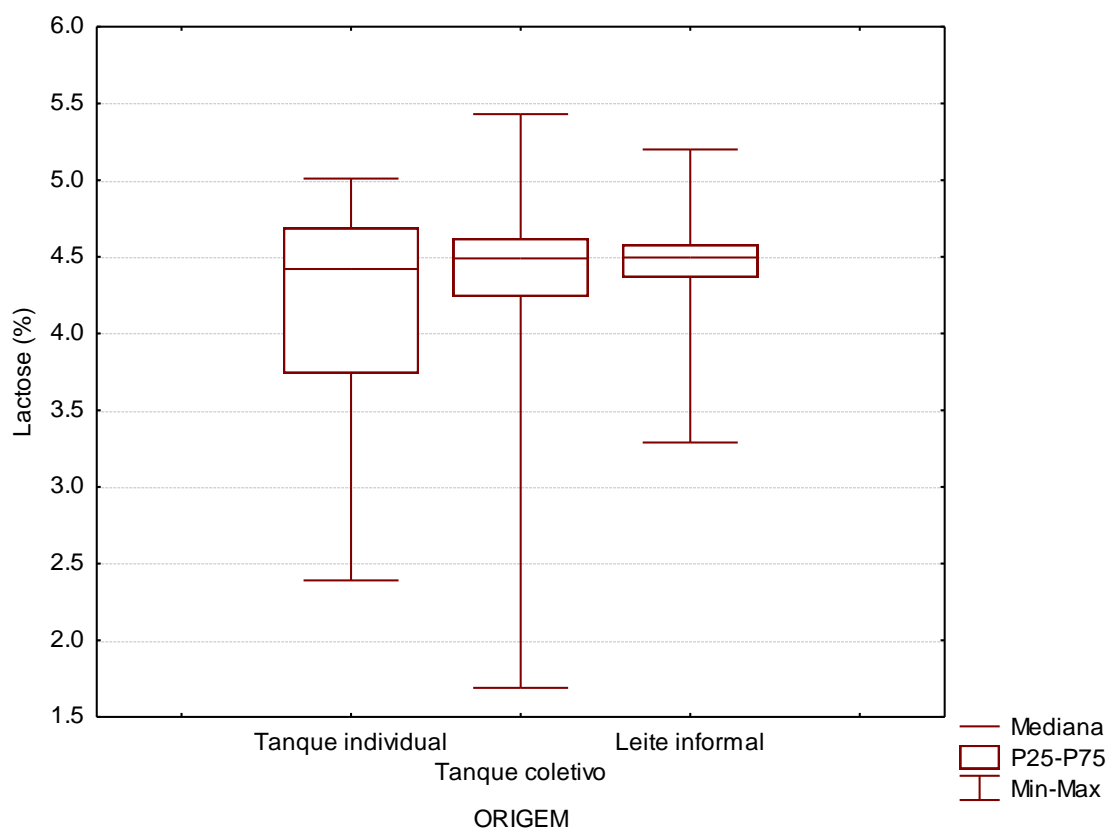


Figura 9. Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da lactose (%\mm) em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

5.4.4 Gordura

A Tabela 15 apresenta o resultado dos teores de gordura, obtidos no leite de tanques de expansão individuais, coletivos e leite informal de vacas na região estudada.

Foi constatado que 46% do leite proveniente dos tanques de expansão individuais, 81% dos tanques coletivos e 61% do leite informal encontravam-se com teores de gordura exigidos pela IN 51 de, no mínimo, 3 g\100g ou %\mm. Em contraste, 54% do leite obtido de tanques de expansão individuais, 21% dos tanques coletivos e 38% do leite informal foram encontrados em desacordo para o teor mínimo de gordura no leite.

Tabela 15. Teores de gordura (g/100g) em leite obtido de 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal em criatórios da região sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011.

Gordura* (%/mm)	Tanque Individual	Tanque Coletivo	Leite Informal
	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta
	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)
1,0 – 1,4	7(7,0%)	-	3 (3,0%)
1,5 – 1,9	12 (12,0%)	4 (4,0%)	6 (6,0%)
2,0 – 2,4	15 (15,0%)	9 (9,0%)	12 (12,0%)
2,5 – 2,9	20 (20,0%)	5 (8,0%)	17 (17,0%)
3,0 – 3,5	21 (21,0%)	23 (23,0%)	39 (39,0%)
3,6 – 4,0	9 (9,0%)	22 (22,0%)	12 (12,0%)
4,1 - 4,5	11 (11,0%)	19 (19,0%)	9 (9,0%)
4,6 – 5,0	4 (4,0%)	10 (10,0%)	1(1,0%)
5,1 - 5,6	1 (1,0%)	3 (3,0%)	1 (1,0%)
> 5,60	-	2 (2,0%)	-
Média	2,97	3,79	3,13
Mediana	3,00	3,80	4,50
Total	100 (100,0%)	100 (100,0%)	100 (100,0%)

*Valor normal: 3g\100g ou 3%\mm (Brasil, 2002)

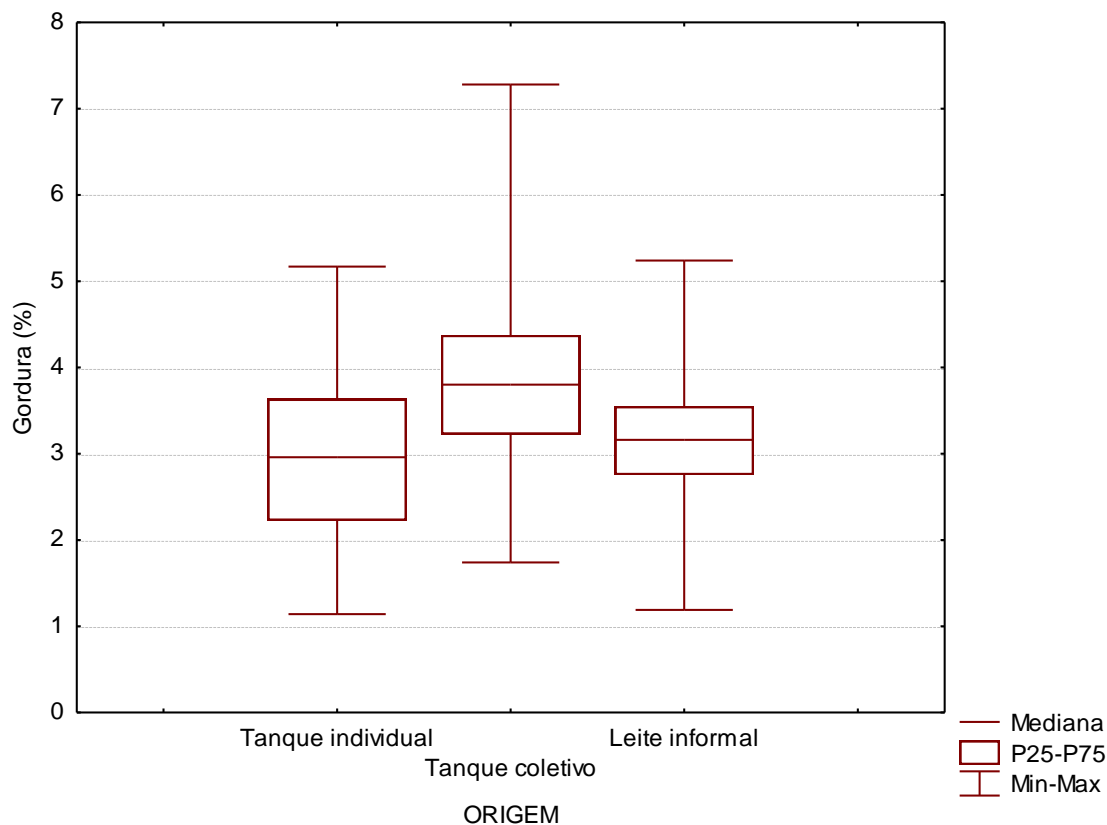


Figura 10. Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 da gordura em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

5.4.5 Extrato seco desengordurado

A Tabela 16 apresenta o resultado dos teores de extrato seco desengordurado, obtidos no leite de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal de vacas na região estudada.

Foi constatado que 49% do leite proveniente dos tanques de expansão individuais, 48% dos tanques coletivos e 51% do leite informal encontravam-se com teores de extrato seco desengordurado exigidos pela IN 51 de, no mínimo 8,4 g/100g ou %\mm (BRASIL, 2002). Em contraste, 51,0% do leite obtido dos tanques de expansão individuais, 52,0% dos tanques coletivos e 49,0% do leite informal encontravam-se com valores em desacordo de extrato seco desengordurado, segundo IN 51.

Tabela 16. Teores de extrato seco desengordurado (g/100g) em leite obtido de 100 tanques de expansão individuais, 100 tanques coletivos e 100 amostras de leite informal de vacas, em criatórios da região sudeste de estado de São Paulo, 2010 - 2011.

ESD* (%/mm)	Tanque Individual	Tanque Coletivo	Leite Informal
	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta
	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)
5,6 – 6,2	3 (3,0%)	1 (1,0%)	1 (1,0%)
6,3 – 6,9	8 (8,0%)	1 (1,0%)	5 (5,0%)
7,0 – 7,6	15 (15,0%)	3 (3,0%)	4 (4,0%)
7,7 – 8,3	25 (25,0%)	18 (18,0%)	33 (17,0%)
8,4 – 9,0	26 (26,0%)	52 (23,0%)	46 (39,0%)
9,1 – 9,7	21 (21,0%)	23 (13,0%)	9 (9,0%)
9,8 – 10,4	2 (2,0%)	2 (2,0%)	2 (2,0%)
Média	8,31	9,01	8,57
Mediana	8,60	8,80	8,70
Total	100 (100,0%)	100 (100,0%)	100 (100,0%)

*Valor mínimo = 8,4 g/100g ou %/mm (BRASIL, 2002)

ESD = Extrato seco desengordurado

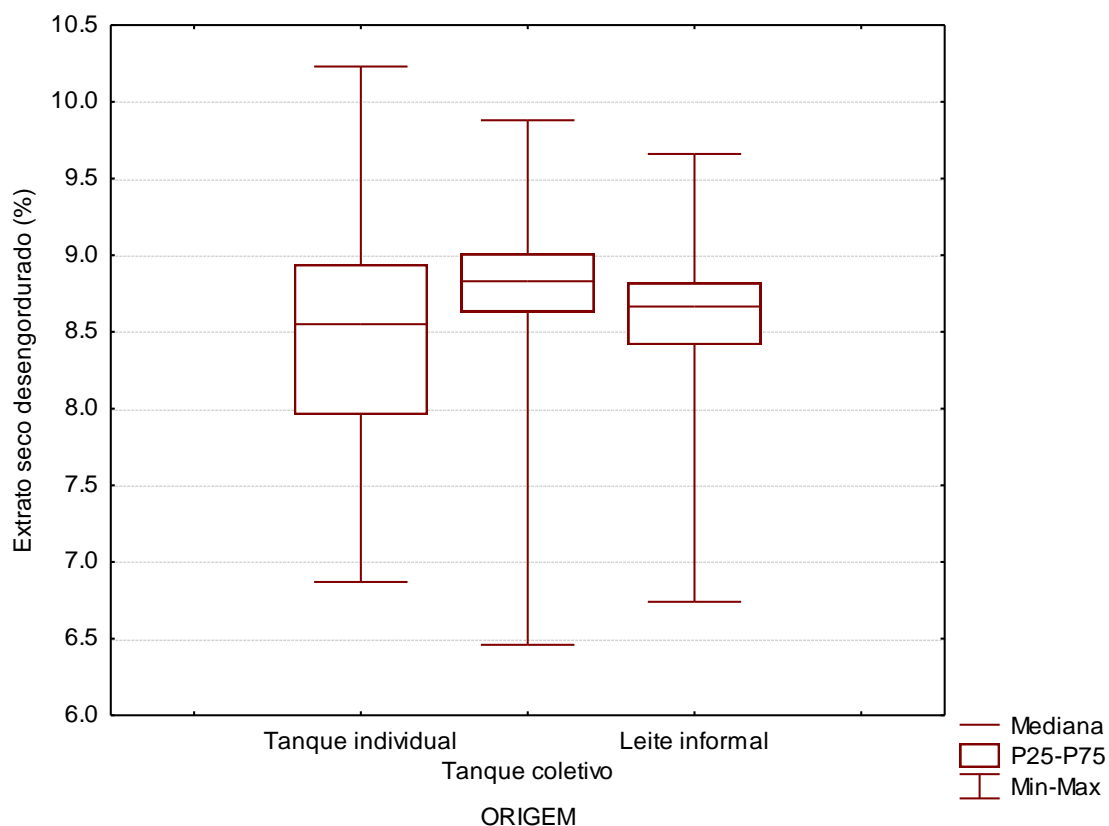


Figura 11. Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 do extrato seco desengordurado (%\mm) em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

A Tabela 17 sumaria os valores dos principais constituintes sólidos do leite de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal amostrados no presente estudo.

Tabela 17. Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 dos constituintes sólidos do leite de vacas, amostras obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal, em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

Variáveis/Grupo	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
Sólidos totais (%\mm)					
Tanques coletivos	9,2	11,8	12,6 ^b	13,1	19,8
Tanques individuais	8,27	10,1	11,0 ^a	12,5	17,4
Leite informal	8,1	10,6	11,6 ^a	12,7	16,9
Proteína (%\mm)					
Tanques coletivos	1,9	3,2	3,4 ^c	3,5	5,1
Tanques individuais	1,3	2,5	3,0 ^a	3,2	4,1
Leite informal	2,5	3,0	3,2 ^b	3,3	3,9
Lactose (%\mm)					
Tanques coletivos	1,7	4,2	4,5 ^a	4,6	5,4
Tanques individuais	2,4	3,7	4,4 ^a	4,7	5,0
Leite informal	3,3	4,4	4,5 ^a	4,6	5,2
Gordura (%\mm)					
Tanques coletivos	1,7	3,2	3,8 ^a	4,4	7,3
Tanques individuais	1,1	2,2	3,0 ^a	3,6	5,2
Leite informal	1,2	4,4	4,5 ^b	4,6	5,2
ESD (%\mm)					
Tanques coletivos	6,5	8,6	8,8 ^b	9,0	10,1
Tanques individuais	6,9	8,0	8,6 ^a	9,0	10,2
Leite informal	6,7	8,4	8,7 ^a	8,8	9,7

Estatística: para cada uma das variáveis, valores de medianas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis.

P25 = percentil 25

P75 = percentil 75

ESD = extrato seco desengordurado

5.4.6 Avaliação do Nitrogênio Uréico

Os teores correspondentes a avaliação do nitrogênio uréico para as amostras de leite de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal estão apresentados nas Tabelas 18 e 19 e Figura 12.

Foi constatado que 34,0% do leite obtido de tanques de expansão individuais, 50,0% dos tanques coletivos e 27,0% do leite informal na região estudada apresentaram teores considerados normais de nitrogênio Uréico para leite de vacas, entre 10 a 16mg\dl (Botaro et al., 2011).

Tabela 18. Teores de nitrogênio uréico (mg/dl) em leite de tanques de expansão individuais, coletivos e leite informal de vacas, em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

Nitrogênio uréico* (mg/dl)	Tanque Individual	Tanque Coletivo	Leite Informal
	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta	Frequência Absoluta
	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)	Frequência Relativa (%)
0 – 5,0	-	5 (5,0%)	12 (12,0%)
5,1– 9,9	9 (9,0%)	30 (30,0%)	57 (57,0%)
10,0– 16,0	34 (34,0%)	50 (50,0%)	27 (27,0%)
16,1 – 20,0	40 (40,0%)	13 (13,0%)	4 (4,0%)
> 20,0	17 (17,0%)	2 (2,0%)	-
Média	14,0	12,5	7,95
Mediana	16,1	11,3	7,4
Total	100 (100,0%)	100 (100,0%)	100 (100,0%)

*Valores considerados normais para leite de vacas 10 a 16 mg/dl (Botaro et al., 2011)

Tabela 19. Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 do nitrogênio uréico (mg/dl) em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 -2011.

Variáveis/Grupo	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
Nitrogênio (%)					
Tanques coletivos	1,8	8,6	11,3 ^b	13,8	21,3
Tanques individuais	5,4	12,6	16,1 ^c	19,2	35,1
Leite informal	0,3	5,8	7,4 ^a	10,4	18,6

Estatística: para cada uma das variáveis, valores de medianas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis.

P25 = percentil 25

P75 = percentil 75

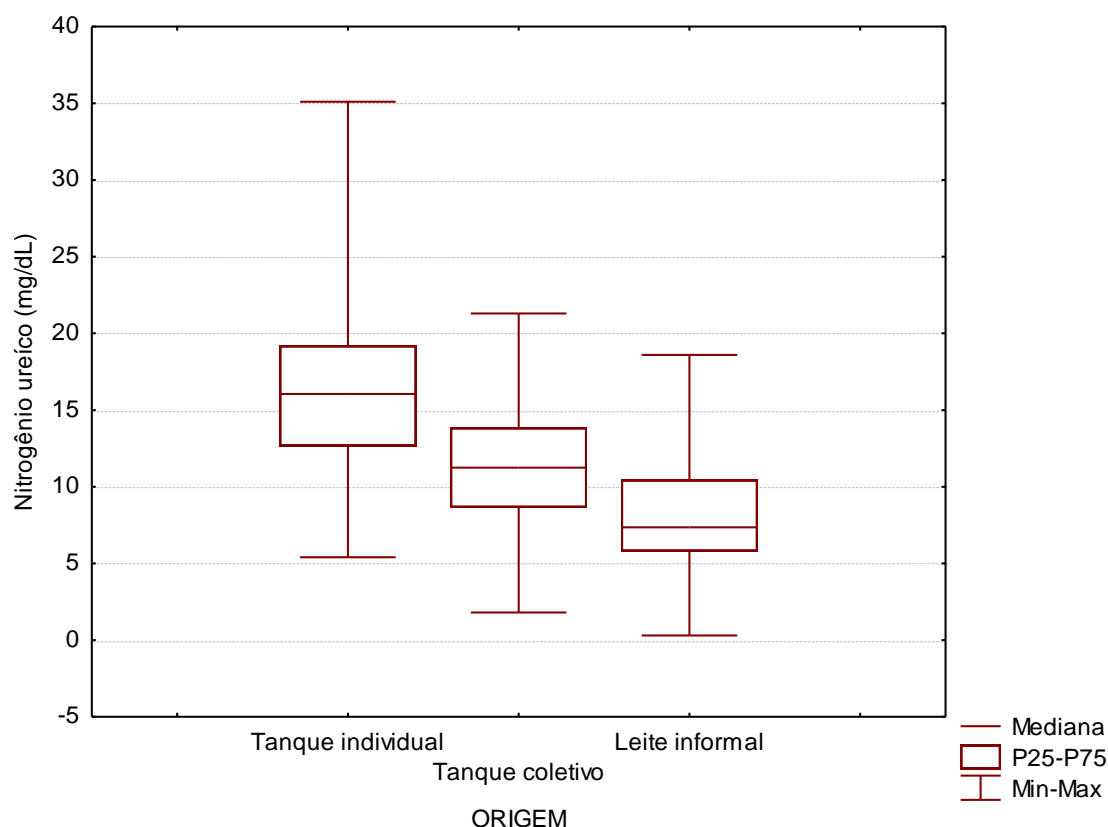


Figura 12. Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 dos teores de nitrogênio uréico em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

5.5 Pesquisa de resíduos de antimicrobianos ou substâncias inibidoras da multiplicação de micro-organismos

Os resultados da presença de resíduos de antimicrobianos ou substâncias inibidoras da multiplicação de micro-organismos nas amostras de leite de tanques de expansão individual, tanques coletivos e leite informal estão sumariados na Tabela 20 e Figura 13.

Foi constatado que 42,0% das amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, 35,0% coletivos e 59,0% do leite informal na região estudada estão em desacordo com a IN 51 do MAPA (BRASIL, 2002), que prevê a ausência qualquer de resíduo de antimicrobiano no leite de vacas no Brasil.

Tabela 20. Frequências absolutas (N), relativas (%), e intervalos de confiança 95% (IC95%) para a presença de resíduos de antimicrobianos ou substâncias inibidoras da multiplicação de micro-organismos, em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal. Região sudeste do estado de São Paulo 2010 - 2011.

Grupo	Presença de resíduos \ substâncias inibidoras						TOTAL	
	Negativo			Positivo			N	%
	N	%	IC95%	N	%	IC95%		
Leite informal	41	41,0	31,8-50,8	59	59,0 ^b	49,2-68,1	100	33,3
Tanques coletivos	65	65,0	55,2-73,6	35	35,0 ^a	26,4-44,8	100	33,3
Tanques individuais	58	58,0	48,2-67,2	42	42,0 ^a	32,8-51,8	100	33,3
TOTAL	164	54,7	49,0-60,2	136	45,3	39,8-51,0	300	100,0

Estadística: frequências relativas de positivos seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste de Qui-quadrado.

IC 95% = intervalo de confiança 95%

N = número

% = porcento

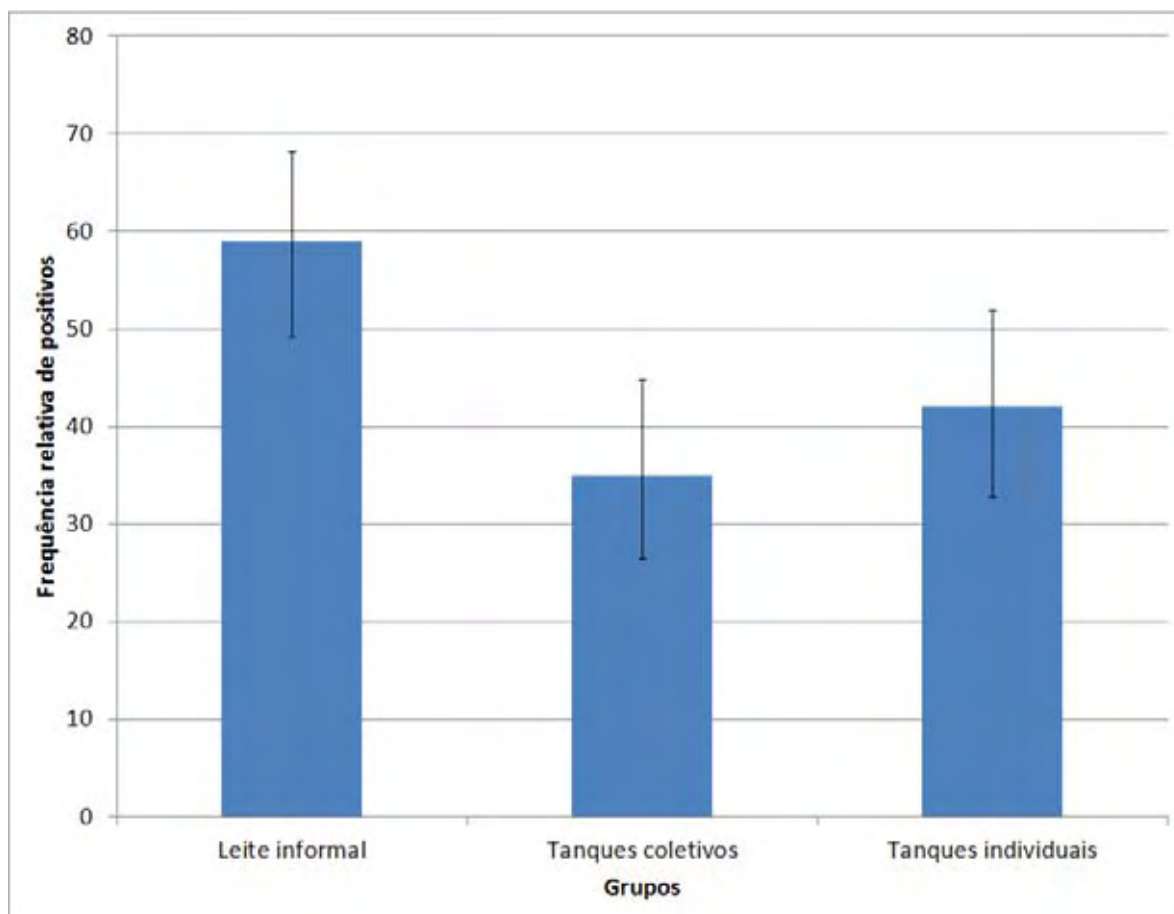


Figura 13. Frequências relativas (%) e intervalos de confiança 95% (IC95%) para a presença de resíduos de antimicrobianos ou substâncias inibidoras da multiplicação de micro-organismos em amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal, em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

5.6 Cultivo microbiológico

Os resultados do cultivo microbiológico do leite dos tanques de expansão individual, tanques coletivos e do leite informal estão apresentados nas Tabelas 21 a 25.

Foram isolados e identificados 605 linhagens de micro-organismos, com predomínio dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e enterobactérias, seguidos em menor frequência por actinomicetos, certos grupos de bactérias Gram-negativas e fungos.

Tabela 21. Micro-organismos de origem bacteriana e fúngica isolados do leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal na região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

Micro-organismos	Tanques individuais	Tanques coletivos	Leite Informal
	nº linhagens / nº total de linhagens (%)	nº linhagens / nº total de linhagens (%)	nº linhagens / nº total de linhagens (%)
<i>Staphylococcus</i> sp	42/161 (26,08%)	29/204 (14,21%)	08/240 (3,33%)
<i>Streptococcus</i> sp	32/161 (19,87%)	45/204 (22,05%)	47/240 (19,58%)
<i>Escherichia coli</i>	20/161 (12,42%)	28/204 (13,72%)	45/240 (18,75%)
<i>Corynebacterium bovis</i>	15/161 (9,31%)	04/204 (1,96%)	-
<i>Enterobacter</i> sp	12/161 (7,45%)	23/204 (11,27%)	31/240 (12,91%)
<i>Klebsiella</i> sp	08/161 (4,96%)	06/204 (2,94%)	26/240 (10,83%)
<i>Alcaligenes</i> sp	06/161 (3,72%)	01/204 (0,49%)	-
<i>Bacillus</i> SP	05/161 (3,10%)	01/204 (0,49%)	-
<i>Micrococcus</i> sp	04/161 (2,28%)	05/204 (2,45%)	-
<i>Citrobacter</i> sp	03/161 (1,86%)	01/204 (0,49%)	-
<i>Nocardia</i> SP	02/161 (1,24%)	03/204 (1,47%)	04/240 (1,66%)
<i>Pasteurella multocida</i>	-	04/204 (1,96%)	02/240 (0,83%)
<i>Hafnia</i> SP	-	02/204 (0,98%)	-
<i>Aeromonas</i> sp	-	02/204 (0,98 %)	-
<i>Arcanobacterium</i> SP	-	01/204 (0,49%)	-
<i>Serratia</i> SP	-	01/204 (0,49%)	02/240 (0,83%)
<i>Proteus</i> SP	-	-	04/240 (1,66%)
<i>Pseudomonas</i> SP	-	-	04/240 (1,66%)
<i>Shigella</i> SP	-	01/204 (0,49%)	-
<i>Aspergillus</i> sp	04/161 (2,48%)	02/204 (0,98%)	16/240 (6,60%)
<i>Cândida</i> SP	04/161 (2,48%)	29/204 (14,21%)	20/240 (8,33%)
<i>Geotrichum</i> sp	02/161 (1,24%)	06/204 (2,94%)	14/240 (5,83%)
<i>Trichophyton</i> sp	02/161 (1,24%)	06/204 (2,94%)	17/240 (7,08%)
<i>Prototheca zopfii</i>	-	01/204 (0,49%)	01/240 (0,41%)

nº = número.

Tabela 22. Valor mínimo, percentil 25, mediana e percentil 75 do número de micro-organismos isolados por amostras de leite de vaca obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

Grupo	Mínimo	P25	Mediana	P75	Máximo
Tanques Coletivos	0	1	2 ^b	3	4
Tanques individuais	0	1	1 ^a	2	4
Leite informal	0	2	2 ^c	3	5

Estatística: valores de medianas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos, pelo teste de Kruskal-Wallis.

P25 = percentil 25

P75 = percentil 75

Tabela 23. Frequências absolutas (N) e relativas (%) de amostras de leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal, segundo o número de isolamentos de micro-organismos por amostras (NIMA), em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

NIMA	Leite informal		Tanques coletivos		Tanques individuais		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%	N	%
0	1	5,0	9	45,0	10	50,0	20	6,6
1	11	15,5	19	26,8	41	57,7	71	23,6
2	44	34,4	41	32,0	43	33,6	128	42,5
3	36	59,0	21	34,4	4	6,6	61	20,3
4	6	31,6	10	52,6	3	15,8	19	6,3
5	2	10,0	0	0,0	0,0	0	2	0,7

Número de linhagens de microrganismos isoladas em tanques individuais, coletivos e informais com relação a percentagem de distribuição.

N = número

% = porcentagem

Tabela 24. Distribuição das espécies do gênero *Streptococcus* identificadas no leite dos tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal, em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 -2011.

Amostras	Tanques Individuais	Tanques Coletivos	Leite Informal
	nº linhagens / total de linhagens (%)	nº linhagens / total de linhagens (%)	nº linhagens / total de linhagens (%)
<i>Streptococcus</i> spp.	24/32 (75,00%)	38/45 (84,44%)	12/47 (25,53%)
<i>Streptococcus agalactie</i>	08/32 (25,00%)	04/45 (8,89%)	18/47 (38,30%)
<i>Streptococcus dysgalactie</i>	-	03/45 (6,67%)	17/47 (36,17%)
Total de linhagens	32/32 (100,00%)	45/45 (100,00%)	47/47 (100,00%)

nº = número

Tabela 25. Distribuição das espécies de enterobactérias e outras bactérias gram negativas identificadas no leite de vacas obtidas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal, em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 - 2011.

Origem do leite	Tanques Individuais	Tanques Coletivos	Leite Informal
	nº linhagens / total de linhagens (%)	nº linhagens / total de linhagens (%)	nº linhagens / total de linhagens (%)
<i>Escherichia coli</i>	19/49 (38,77%)	27/64 (42,18%)	45/108 (41,66%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	09/49 (08,36%)	20/64 (31,25%)	25/108 (23,14%)
<i>Alcalingens faecalis</i>	07/49 (14,28%)	01/64 (1,56%)	-
<i>Klebsiella oxitoca</i>	06/49 (12,24%)	07/64 (10,93)	13/108 (12,03%)
<i>Citobacter freundii</i>	04/49 (08,16%)	01/64 (1,56%)	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	03/49 (06,12%)	03/64 (4,68%)	10/108 (9,25%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	01/49 (2,04%)	02/64 (3,12%)	01/108 (0,92%)
<i>Hafnia alvei</i>	-	02/64 (3,12%)	-
<i>Shigella</i> SP	-	01/64 (1,56%)	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	01/64 (1,56%)	02/108 (1,85%)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	07/108 (6,48%)
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	06/108 (5,55%)
Total de linhagens	49/49 (100,00%)	64/64 (100,00%)	108/108 (100,00%)

ECP = estafilococos coagulase positivo

ECN = estafilococos coagulase negativo

Nº = número

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

S. Intermedius = *Staphylococcus intermedius*

5.6.1 Identificação de ECP e ECN

Foram isoladas 79 (13,06%) linhagens de *Staphylococcus* spp dentre as 605 estirpes de micro-organismos identificados no leite de vacas em tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal (tabela 26).

Dentre as 79 linhagens do gênero *Staphylococcus*, 52 (65,82%) foram classificadas como coagulase positivas e 27 (34,18%) como coagulase negativas. Linhagens coagulase positivas foram identificadas em 26 (61,90%) das amostras de leite dos tanques de expansão individuais, 18 (62,06%) dos tanques coletivos e 8 (100,00%) das linhagens isoladas do leite informal. Estirpes coagulase negativas foram identificadas em 16 (38,10%) amostras de tanques de expansão individual e 11 (37,93%) das amostras dos tanques coletivos. Não houve isolamento de *Staphylococcus* coagulase negativo nas amostras de leite informal (Tabela 26).

Tabela 26. Distribuição das espécies de ECP e ECN identificadas no leite de vacas de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal em criatórios da região sudeste do estado de São Paulo, 2010 – 2011.

Amostras	Tanques Individuais	Tanques Coletivos	Leite Informal
	nº linhagens / total de linhagens (%)	nº linhagens / total de linhagens (%)	nº linhagens / total de linhagens (%)
ECP	26/42 (61,90%)	18/29 (62,06%)	08/08 (100,00%)
<i>S. aureus</i>	21/42 (50,00%)	18/29 (62,06%)	08/08 (100,00%)
<i>S. intermedius</i>	05/42 (11,90%)	-	-
ECN	16/42 (38,10%)	11/29 (37,93%)	-
Total de linhagens	42 /42 (100,00%)	29/29 (100,00%)	08/08 (100,00%)

ECP: Estafilococos Coagulase Positivo; ECN: Estafilococos Coagulase Negativo

nº = número

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

S. intermedius = *Staphylococcus intermedius*

6. DISCUSSÃO

É crescente em todo o mundo a preocupação com a obtenção de produtos de origem animal que atendam às exigências de mercado, cada vez mais competitivo, notadamente quanto às características nutricionais e de inocuidade dos alimentos, saúde e bem estar dos animais e a satisfação dos consumidores (Zafalon et al., 1999; Koneman et al., 2008). No Brasil, novas políticas de incentivo à produção leiteira resultaram na elaboração do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite, em 1997, e na deflagração da IN 51, em 2002 (BRASIL, 2002) que determinou padrões mínimos de qualidade para toda a cadeia produtiva do leite bovino no país (BRASIL, 2002, Santos, 2005). O presente estudo foi desenvolvido em período de transição da IN 51 para novos indicadores da qualidade, especialmente na CCS e CBT. Estes parâmetros seriam modificados em julho de 2011. No entanto, os níveis máximos de CCS e CBT foram prorrogados, até que o assunto possa ser debatido pelos órgãos oficiais competentes, representantes da cadeia produtiva, laboratórios credenciados, entidades de classe, e instituições de ensino e pesquisa, visando à continuidade e a evolução do Programa Nacional de Qualidade do Leite no Brasil (Santos, 2011).

Desta forma, a discussão que segue buscou avaliar os resultados obtidos para os indicadores de qualidade no leite de vacas em tanques de expansão individual, tanques coletivos e leite informal, confrontando os achados com a legislação vigente e com base nos parâmetros permitidos até julho de 2011, visto que o leite foi amostrado entre agosto de 2010 a maio de 2011.

A qualidade do leite deve ser interpretada com cautela, pois, o termo apresenta concepções variadas e significados distintos para muitos gestores. No entanto, a compreensão da qualidade é fator indispensável para a tomada de decisões que nortearão os programas de melhoria da qualidade (Souza et al., 2008; Santos, 2011). A garantia da qualidade no processo produtivo, ainda na produção primária, é fundamental, pois a ausência de conformidade nessa etapa compromete de forma irreversível a qualidade do produto final (Vansconcelos et al., 1997; Santos, 2004, 2011).

6.1 Características de produção das propriedades amostradas

As principais características dos produtores de leite amostrados na região sudeste do estado de São Paulo, com base na forma de armazenamento e comercialização do produto em tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal, permitiram verificar que ocorre grande diversidade entre as propriedades, tanto nas características do rebanho, volume de produção, manejo geral e de ordenha, armazenamento do leite e acesso dos produtores à assistência técnica veterinária.

A produção diária dos 100 criatórios com tanques individuais variou de 120 litros a 3000 litros de leite, enquanto nas propriedades que armazenavam o leite em tanques coletivos, foi observada variação de 12 a 125 litros de leite por dia. Em contraste, no leite informal foi verificada produção diária variando de 15 a 500 litros por dia. Nas propriedades com tanque de expansão individuais o número de vacas em lactação oscilou entre 11 e 200 animais, enquanto nos criatórios que usufruem de tanques coletivos possuem número menor de animais, entre 2 a 14 vacas em lactação. Nas 28 propriedades que comercializavam o leite informal nas quais foram possíveis obter os dados das características de produção, o número de animais variou entre 4 a 32 vacas em lactação. A média de produção\animal\dia nos criatórios com tanques de expansão individuais variou 3 a 20 litros\leite\vaca\dia. Nos tanques coletivos oscilou entre 2,3 a 13,2 litros\leite\vaca\dia e no leite informal variou entre 2 a 20 litros\leite\vaca\dia. Estes resultados envolvendo as características de produção das propriedades assemelham-se aos obtidos por Faccioli (2010), em estudo realizado na bacia leiteira da região de Botucatu com tanques de expansão individuais, onde encontrou média de produção 8,42 litros\leite\vaca\dia, variando entre 1,88 a 35,99 litros, com número de vacas em lactação entre 3 e 111 animais. Carvalho et al. (2007) em Minas Gerais encontraram média de produção de leite\vaca\dia de 4,9 litros em 1995 e 8,10 litros em 2005. Em contraste, estes valores podem ser considerados baixos se comparados a região sul do Brasil, cujos criatórios atingem produção média de 30 litros\leite\vaca\dia (Cunha et al., 2008).

A baixa produção de leite dos animais na maioria dos criatórios da região estudada, tanto com tanques de expansão individuais como em tanques coletivos, poderia ser creditada ao fato que muitos produtores ainda não

encaram a produção leiteira como atividade economicamente rentável. Estes criadores e permanecem no setor devido á tradição familiar, com mínima infraestrutura, número reduzido de animais em lactação, com mínimos investimentos em genética e nutrição dos animais, na maioria das vezes sem assistência técnica veterinária. Nestas propriedades as vacas são destinadas a produção de bezerros para o corte, e o leite é considerado subproduto da exploração agropecuária (Faccioli, 2010). Este cenário dificulta a difusão das técnicas de boas práticas de produção, manejo sanitário dos animais e higiene de ordenha, visando o aumento da produção e da qualidade do leite (Santos, 2004). Zoccal et al. (2004) na região da Zona da Mata em Minas Gerais, Cunha et al. (2008) na região de Jaboticabal, SP, Faccioli, (2010) na região de Botucatu, SP, em estudos recentes, também identificaram como fator limitante para o aumento da produção e melhoria na qualidade do leite, o fato de que a atividade leiteira não é a fonte prioritária de renda em certas na propriedades rurais.

Para reverter este quadro, faz-se necessário a adoção de estímulos à produção leiteira para os pequenos produtores, com enfoque em políticas públicas especializadas para a cadeia látea no Brasil. Brito e Brito (2001) enfatizam que é fundamental melhorar a cadeia de lácteos dos pequenos módulos de produção rural, visando o aumento na produção, rentabilidade e qualidade do leite para atender não só a demanda interna mais também o mercado internacional em futuro próximo.

Apesar da estimativa de que 20 a 35% do leite produzido no país seja comercializado de maneira informal, ainda são incipientes os estudos no país conduzidos com a finalidade de avaliar a qualidade, constituintes nutricionais e características de produção das propriedades que comercializam este “tipo” de leite (Villa, 2007). Estudos com leite informal no Brasil convergem para dados comuns, que indicam, geralmente, à má qualidade microbiológica do produto, alta celularidade e alterações nos constituintes nutricionais. Estes resultados sugerem que sejam originários de propriedades com deficiências de higiene do processo de ordenha, bem como na conservação do leite, desde a sua obtenção até a comercialização direta ao consumidor (Nero et al., 2004; Lavor et al., 2006).

A baixa qualidade do leite cru comercializado informalmente no Brasil também tem sido identificada em estudos pontuais que avaliaram o perfil microbiológico do produto entregue às plataformas dos laticínios em diferentes regiões do país (Serra, 2004; Nero et al., 2004; Lavor et al., 2006, Villa, 2007). O leite informal no Brasil representa também sério problema sócio-cultural, pois em certos criatórios amostrados no presente estudo que comercializam este “tipo” de leite, o produto representa, por vezes, a principal fonte de renda mensal das famílias.

Santos (2011) ressalta que é necessário mudar a cultura e o hábito dos produtores nacionais, muitas vezes reticentes em absorver informações e aplicar técnicas de manejo simples, de baixo custo, que apresentam resultados muito satisfatórios na produção de leite de melhor qualidade. Santos e Fonseca (2006) afirmaram que é importante que ambos os elos da cadeia produtiva estejam cientes do objetivo de se produzir leite e derivados com qualidade, pois além do aspecto financeiro, é também uma questão de responsabilidade e ética, posto que o leite é alimento fundamental para a nutrição e saúde humana.

Estudo realizado por Faccioli (2010) na região centro-oeste do estado de São Paulo e Almeida (2001) em Minas Gerais, verificaram a grande participação de animais mestiços nos criatórios destinados à produção de leite. De maneira similar, foi encontrada elevada porcentagem de animais mestiços como base do plantel leiteiro na região estudada, representando 38% das vacas nas propriedades com tanques de expansão individuais, 64% dos criatórios com tanques coletivos e 57,14% das propriedades que comercializam leite informal. Tal fato pode ser justificado, visto que a maioria destes animais tem alto grau de sangue zebuíno, e são acasaladas com touros comuns visando a produção final de bezerros, tornando a exploração leiteira um produto secundário na atividade dos criatórios na região.

No que tange as medidas adotadas nas propriedades amostradas visando a ordenha higiênica e controle da mastite, somente 15% dos criatórios com tanques de expansão individuais realizavam pré-dipping, secagem dos tetos, pós-dipping e a terapia da vaca seca, enquanto apenas 3,5% dos produtores que comercializavam leite informal realizavam estes procedimentos. Em contraste, nenhum produtor da região estudada com tanques coletivos

realizava estas medidas de controle e profilaxia para infecções mamárias, anteriormente listadas. Estes resultados indicam a existência de falhas importantes de manejo nas propriedades estudadas no controle e profilaxia da mastite e na realização de boas práticas de produção visando à higiene de ordenha e qualidade do leite. A adoção de procedimentos como pré e pós-dipping, terapia da vaca seca, descarte de vacas com mastite crônica, treinamento de retireiros para ordenha higiênica, manutenção dos equipamentos de ordenha e realização sistemática de testes como a prova de Tamis, CMT e cultivo microbiológico de quartos positivos, podem contribuir significativamente no controle e profilaxia da mastite, e na melhoria da qualidade do leite nos criatórios amostrados (Fonseca e Santos, 2006).

Em 42% dos produtores com tanques de expansão individuais, 62% com tanques coletivos e 82,15% dos produtores que comercializam leite informal afirmaram não receber nenhum tipo de assistência veterinária regular. Nestas propriedades, o contato com o médico veterinário restringe-se a atendimentos isolados de casos clínicos emergenciais. Estes dados são preocupantes visto que elevado número de produtores da região não dispõem de orientação técnica e assistência veterinária na elaboração de programas destinados ao manejo sanitário do rebanho, no controle e profilaxia de doenças, particularmente a mastite, impactando negativamente na qualidade e no volume de produção de leite na região.

Nas propriedades com tanques de expansão individuais e presença de assistência veterinária foi observada diferença estatisticamente significativa para a mediana de produção de leite (8,5 litros\leite\animal\dia), comparado com os criatórios sem assistência técnica (5,1 litros\leite\animal\dia). Nos criatórios com tanques de expansão coletivos, foi constatada a produção (mediana) de 5,6 litros de leite\animal\dia em locais sem assistência veterinária e 7,3 litros de leite\animal\dia com assistência. Enquanto nos criatórios que comercializavam leite informal, foi observado (mediana) de produção de 6,1 litros de leite\animal\dia com assistência técnica e 4,2 litros de leite\animal\dia sem assistência. Esses dados reforçam a importância da assistência veterinária no aumento da produção de leite, como reflexo da implantação de medidas de gerenciamento na propriedade, visando à nutrição, manejo geral e de ordenha higiênica (Fonseca e Santos, 2000). Resultados similares foram

obtidos por Faccioli (2010) na região centro oeste do estado de São Paulo, que também encontrou associação significativa entre a assistência veterinária e aumento nas médias de produção e melhoria na qualidade do leite. A assistência técnica veterinária e ações de extensão rural visando o treinamento e a capacitação dos pequenos produtores de leite. Estas ações têm reflexo direto no incremento da produção e melhorias da qualidade do leite, inclusive em assentamento de terra coletivos localizado no estado de São Paulo (Serra., 2004).

6.2. Indicadores de qualidade no leite

6.2.1 Contagem de Células Somáticas

Dentre os critérios utilizados na avaliação da qualidade do leite de vacas, destaca-se a contagem de células somáticas. A alta celularidade no leite decorre, principalmente, de deficiências no manejo higiênico da ordenha que resultam na ocorrência de mastite e, secundariamente, relacionada à fase de lactação, idade e raça do animal (Fonseca e Santos, 2000).

No Brasil, a adoção de limites máximos de CCS do leite foi definida em 2002 pela IN 51, que estabeleceu período inicial de adaptação de três anos e o limite de 1.000.000 células/mL, em 2005, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste. A legislação previa, ainda, que haveria redução deste limite para 750.000 células/mL em 2008 e, finalmente, para 400.000 células/mL, em julho de 2011 (BRASIL, 2002). Este último prazo foi prorrogado para 750.000 células/mL até dezembro de 2011, visto que grande parte dos produtores não atenderia a celularidade, gerando elevado descarte do produto e colapso no setor produtivo do leite em várias regiões do país (Santos, 2011).

De acordo com os resultados dos laboratórios da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL), cerca de 50% dos produtores avaliados em 2010 no país não atenderiam ao critério de celularidade para produção de leite com <400.000 células/mL, 30% estariam produzindo entre 400.000 e 750.000 células/mL, e 20% acima de 750.000 células/mL (Santos, 2011). No presente estudo, foram encontrados resultados similares aos obtidos no país pela RBQL em 2010, visto que, para as propriedades com tanques de expansão individuais, 27% acusaram CCS inferior a 400.000 céls/mL, 32% entre 400.000 e 750.000 céls/mL e 14% entre 750.000 e 1.000.000 céls/mL, enquanto 27%

acusaram contagens $>1.000.000$ céls/mL. Já para, os tanques de expansão coletivos apresentaram 43% <400.000 céls/mL, 33% entre 750.000 e 1.000.000 céls/mL, 10% entre 750.000 e 1.000.000 céls/mL, 14% $> 1.000.000$ céls/mL. As amostras de leite informal mostraram 14% <400.000 céls/mL, 19% entre 450.000 e 750.000 céls/mL, 12% 750.000 e 1.000.000 céls/mL e 43% $>1.000.000$ céls/mL.

Estes resultados denotam que, se os limites máximos de celularidade (CCS) indicados pela IN 51 para julho de 2011 (400.000 céls/ml) estivessem sido adotados, apenas 27% dos criatórios com tanques de expansão individuais e 43% dos tanques coletivos se enquadrariam dentro dos limites exigidos na região estudada. De maneira preocupante, somente 14% do leite comercializado de maneira informal na região estaria dentro dos parâmetros legais. Com a prorrogação do limite de celularidade para 750.000 céls/mL até dezembro de 2011, 59% dos criatórios com tanques individuais, 76% com tanques coletivos e 33% do leite comercializado de maneira informal atenderiam a legislação. Foi observada diferença estatística significativa na mediana da CCS 641.500 céls/mL para tanques individuais, 467.500 céls/mL para tanques coletivos e 1.199.000 céls/mL para o leite informal. No presente estudo, os valores da CCS oscilaram, mesmo dentro do mesmo grupo de amostragem nos tanques individuais o valor mínimo encontrado foi 70.000 céls/mL e máximo 7.090.000 céls/mL. Para tanques coletivos os valores variaram entre 91.000 e 4.612.000 céls/mL e oscilaram no leite informal entre 145.000 e 9.315.000 céls/mL. Na Suíça, Roesch et al. (2007) encontraram baixas médias de CCS em leite de vacas (<400.000 céls/mL) em leite de tanques de expansão individual. Em contraste, na Suécia, Hamilton et al. (2006) registraram altos valores de CCS no leite de vacas variando entre 830.000 céls/mL a 2.800.000 céls/mL também em tanques individuais.

No presente estudo, elevado número de amostras de leite dos tanques de expansão e, principalmente, o leite informal, apresentaram-se fora dos limites máximos de CCS permitidos pelo MAPA. Este resultado indica a ocorrência de falhas na ordenha higiênica e no controle da mastite na região estudada. Nero et al., 2005 relataram problemas semelhantes em diferentes regiões do Brasil, em Viçosa, MG, Pelotas, RS, Londrina, PR, e Botucatu, SP.

A IN 51 pretendia, dentro de seis anos, sair de um quadro de desconsideração de limites de celularidade, para atingir patamares similares ao padrão europeu de CCS do leite (Zafalon et al., 2010; Santos, 2011).

Na União Européia foi adotado em 1985 o limite de 400.000 céls/mL para o leite oferecido ao consumo humano. Em 1992, este mesmo padrão foi estabelecido para todos os derivados lácteos (Machado et al., 2000) Considerando a grande influência dos padrões europeus sobre o mercado lácteo internacional, os principais países exportadores também adotaram padrão semelhante, incluindo Nova Zelândia e Austrália (Machado et al., 2000ab, Santos, 2006; Zafalon et al., 2010).

Nos EUA, o primeiro limite legal de CCS foi de 1.500.000 céls/mL, adotado em 1970. Esta legislação foi alterada em 1986, reduzindo para 1.000.000 céls/mL, e em 1991, foi estabelecido o limite que ainda vigora atualmente de 750.000 céls/mL (Santos, 2011). No entanto, os estados norte-americanos podem definir limites diferenciados de CCS, como a Califórnia que adota 600.000 céls/ml. Desde 1997, o Conselho Nacional de Mastite dos EUA (NMC) tem proposto a redução deste limite para 400.000 céls/mL (Machado et al., 2000b; Santos, 2011). Mesmo com o limite de 750.000 céls/mL, a média de CCS dos rebanhos norte americanos em 2010 foi de 228.000 céls/mL (97% dos rebanhos sob controle de CCS), com apenas dois estados apresentam média acima de 400.000 céls/mL (Machado et al., 2000a; Santos, 2006).

No Brasil, após a prorrogação da IN 51, representantes do setor produtivo e das indústrias têm questionado a viabilidade da adoção do limite de 400.000 céls/mL para o leite de vacas no país (Durr, 2005; Santos, 2011). Os principais argumentos contrários, referem que este limite é excessivamente rígido e, conseqüentemente, não seria atendido pela grande parcela dos produtores (Durr et al., 2004). Os achados do presente estudo atestam que os tanques individuais amostrados e, particularmente o leite informal, em sua grande maioria estariam em desacordo com o limite proposto de 400.000 céls/mL. Em contrapartida no presente estudo, 43% dos produtores com tanques coletivos já se enquadravam em <400.000 céls/mL. Tal fato poderia ser creditado ao maior número de animais mestiços, ordenha com bezerro ao pé da vaca e baixa produção diária. Estes fatores corroboram para a baixa incidência de mastite nos rebanhos e, conseqüentemente, menores valores

médios de CCS. Faccioli (2010) também observou grande número de produtores com CCS ≤ 400.000 céls/ml em leite de tanques de expansão coletivos na região de Botucatu, SP.

A maior celularidade em propriedades com tanques de expansão individuais na região amostrada poderia ser reflexo de que estes criatórios, ao contrário dos tanques coletivos, possuem vacas de raças puras e ou cruzamentos direcionados para a exploração leiteira, como Jersey, Holandesa, Girolanda, notadamente mais susceptíveis as infecções mamárias, devido a maior produção de leite, repercutindo diretamente no aumento da celularidade do leite dos tanques (Nero, 2007).

Atualmente, os limites máximos de CCS definem se o leite está ou não adequado para o consumo humano (Durr et al., 2004). A definição do limite legal máximo de CCS do leite tem como pressuposto a proteção da saúde do consumidor (Santos, 2006). No entanto, diferentes pesquisadores referem que o limite de CCS não pode ser utilizado isoladamente como indicador de risco a saúde pública, visto que as células somáticas estão naturalmente presentes no leite (Machado, 2000; Muller, 2002; Durr, 2004). Deste modo, adotando somente a CCS como critério de qualidade, não se pode considerar que haja diferença de segurança quanto ao consumo de leite com 400.000 ou 750.000 céls/ml (Santos, 2011). Em contraste, fazendas leiteiras com alta CCS apresentam maior risco de ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite (Almeida et al., 2003). Assim, estes aspectos devem ser considerados na adoção de limites mais rígidos de CCS no Brasil (Santos, 2006).

A CCS do tanque é um indicativo da ocorrência de mastite, particularmente na forma subclínica, nos rebanhos (Machado et al., 2000). Além disso, está relacionada às condições higiênicas de produção do leite, a qualidade e o rendimento industrial do produto na fabricação dos derivados lácteos (Santos, 2006). Com efeito, a CCS está intimamente associada com a qualidade do leite, com prejuízos aos produtores e a indústria processadora, além de impor restrições a comercialização do produto e derivados no mercado internacional (Santos, 2011). A redução da CCS do leite nos criatórios, traz como vantagens o aumento da confiança dos consumidores no fornecimento de leite de qualidade para o consumo, a adoção de padrões internacionais de qualidade para o comércio de leite, o aumento da procura dos produtos lácteos

no mercado internacional, a redução do risco de resíduos de antimicrobianos no leite, a redução de custos de produção do leite e a agregação de valor ao produto nas políticas de pagamento por qualidade (Machado et al., 2000; Durr et al., 2004; Santos, 2006; Reis, 2007; Ribeiro, 2008).

Dentre todos os potenciais benefícios da redução da CCS, um dos mais significativos para a cadeia produtiva é a padronização do limite legal da celularidade, conforme já adotada pelos países exportadores, aumentando a participação do leite brasileiro (Santos, 2011).

Para os produtores, os programas vigentes no Brasil de pagamento por qualidade bonificam os criadores que entregam leite com ≤ 400.000 céls/mL (Durr et al., 2004). Em certos laticínios e cooperativas os maiores valores de bonificação somente são atingidos quando o leite apresenta CCS 200.000 céls/mL, com penalização do preço quando ultrapassa 400.000 céls/mL (Santos, 2003ac; Durr et al., 2004). A política nacional de pagamento por qualidade com base na CCS indica que o mercado está se antecipando e definindo padrões de excelência de qualidade mais rígidos, inclusive, valores de CCS menores do que os exigidos pela legislação vigente, com vistas ao aumento da produção e, conseqüentemente, da qualidade do produto final oferecido ao consumidor (Santos, 2011).

6.2.2 Contagem bacteriana total

A CBT é outro indicador adotado recentemente no Brasil para o pagamento de qualidade do leite bovino (BRASIL, 2002). Diferentes estudos no país (Campos, 2004; Nero, 2007; Villa, 2007) encontraram valores de CBT acima do permitido pela IN 51, tanto nas amostras de leite cru obtida de tanques individuais, tanques coletivos e leite informal, em diferentes regiões do Brasil. Na região centro-oeste do estado de São Paulo foi observado que em tanques coletivos a CBT é o principal aspecto em desacordo com a IN 51 (Faciolli, 2010). No presente estudo também foi identificado que a CBT é um dos principais critérios em desacordo com a IN 51, principalmente para tanques de expansão coletivos e leite informal. Nos tanques de expansão individuais foram encontradas 45% das amostras até 300.000 UFC/mL, 22% entre 300.000 a 500.000 UFC/mL, 23% entre 500.000 a 1.000.000 UFC/mL, 13% >1.000.000 UFC/mL. Já para os tanques de expansão coletivos o resultado foi

6% das amostras < 300.000 UFC/mL, 5% entre 300.000 a 500.000 UFC/mL, 18% entre 500.000 a 1.000.000 UFC/mL e 71% > 1.000.000 UFC/mL. Para o leite informal, foram encontrados valores preocupantes da CBT, visto que, apenas 8% das amostras até 300.000 UFC/mL, 5% entre 300.000 a 500.000 UFC/mL, 4% entre 500.000 a 1.000.000 UFC/mL e 86% >1.000.000 UFC/mL. O resultado do presente estudo mostra que a adoção de ações nos plantéis estudados para a redução de CBT, particularmente nos tanques coletivos e leite informal, são emergenciais, visto que a partir de julho de 2011, seriam aceitos na plataforma somente leite o com CBT <300.000 UFC/mL para tanques coletivos e <100.000 UFC/mL para tanques individuais (BRASIL, 2002). Assim, a revogação da IN 51 em julho de 2011, e a manutenção da CBT em 750.000 UFC/mL até dezembro de 2011 (Santos, 2011), foi estratégica pois pequeno número de produtores na região do estudo atenderiam ao novo limite legal.

Estes resultados reforçam a importância da avaliação periódica da CBT como parâmetro de qualidade do leite e a necessidade das propriedades amostradas melhorarem às condições de higiene de ordenha, visando reduzir a contagem bacteriana. Ao se confrontar os valores da IN 51 que seriam adotados em julho de 2011, (<100.000 UFC/mL para tanques de expansão individuais e 300.000 UFC/mL para tanques coletivos), apenas 16% dos tanques individuais estariam adequados à legislação, 6% dos tanques coletivos e 5% do leite informal. Porém, se adotado o valor de 750.000 UFC/mL da nova proposta 67% dos tanques individuais estariam adequados, 11% dos tanques coletivos e 9% do leite informal, estariam em acordo com a legislação. Ocorreu diferença para as medianas da CBT, onde os valores encontrados foram 317.500, 2.132.500 e 3.515.000 UFC/mL, respectivamente para tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal.

Nero et al. (2005) estudaram a qualidade do leite cru em 210 propriedades rurais localizadas nos estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo. No estado de São Paulo foram amostradas 50 propriedades no município de Botucatu, SP, nas quais 68% apresentaram CBT >1.000.000 UFC/mL. Na mesma região, Faccioli, (2010) em estudo conduzido com leite obtido de tanques de expansão ou imersão, também revelaram 57,1% das amostras com CBT > 1.000.000 UFC/mL. Em contraste, Souza et

al. (2008) investigando a CBT em tanques de expansão coletivos, que recebiam leite de nove propriedades, no estado de São Paulo, encontrou valores entre 210.000 e 330.000 UFC/mL, que estariam em conformidade com a nova legislação, que adotaria 300.000 UFC/mL para tanques coletivos. A qualidade microbiológica do leite destes criatórios poderia ser justificada em função do uso do tanque ser familiar, favorecendo a ação integrada dos usuários e de medidas voltadas à redução da CBT, bem como a proximidade entre o tanque coletivo e as propriedades, agilizando a entrega e o refrigeração do produto.

As indústrias em geral têm focado os esforços, após a implantação da IN51, nos aspectos relativos ao resfriamento do leite e no transporte sob baixas temperaturas, que interferem diretamente nas taxas de multiplicação bacteriana, favorecendo menor contagem microbiológica do produto (Faccioli, 2010). Outros fatores que podem determinar a elevação da CBT, advém da contaminação inicial do leite, provenientes da glândula mamária, exterior do úbere, equipamentos e utensílios de ordenha, além da má qualidade da água utilizada em todo processo de produção do leite (Pinto e Izidoro, 2007).

Cerqueira et al. (1994), em Belo Horizonte, avaliaram 96 amostras de leite cru e obtiveram 4.500.000 UFC/mL, enquanto, Ponsano et al. (2004) analisando amostras individuais de leite cru, coletadas diretamente dos latões de 12 propriedades que abasteciam tanque de expansão comunitário na região de Araçatuba, SP, obtiveram média de 950.000 UFC/mL.

No presente estudo foi observado que 10% dos tanques de expansão individuais, 71% dos tanques coletivos e 86% dos leites informais apresentavam CBT > 1.000.000 UFC/mL.

Altas contagens bacterianas foram um dos problemas mais sérios encontrados no leite amostrado no presente estudo. A elevada CBT é reflexo de sérias deficiências nas condições de higiene das instalações, dos animais e, principalmente, dos equipamentos e utensílios utilizados na ordenha, assim como, da inadequada refrigeração do leite desde a coleta pelas indústrias até o beneficiamento (Santos, 2007). A adoção da higiene pré ordenha ou pré dipping é considerado procedimento importante para a obtenção do leite com baixa carga microbiana inicial, pois esta prática contribui significativamente para a redução dos micro-organismos contaminantes que contribuem com a

elevação da CBT no tanque (Faciolli, 2010). Grande parte dos criatórios amostrados com tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal não adotam o pré dipping como procedimento de rotina de ordenha, fato que certamente contribui com a elevada CBT encontrada no presente estudo.

Os resultados da contagem bacteriana total no leite comercializado de maneira informal na região objeto do presente estudo, deixa evidente a má qualidade microbiológica do produto, visto que 86% das amostras encontrava-se com o CBT >750.000 UFC/mL, em desacordo com a legislação vigente (Santos, 2011). Resultados similares foram obtidos por Villa (2007), em investigação sobre a qualidade do leite informal comercializado em Brotas, SP, no qual 77,2% das amostras acusaram valores >750.000 UFC/mL. Esses achados são extremamente preocupantes, e certamente refletem sérias deficiências na higiene do processo de ordenha, bem como na conservação do produto, desde a sua obtenção até a comercialização direta ao consumidor, visto que, 47% das amostras de leite informal obtidas no presente estudo eram comercializadas a temperatura ambiente.

A má qualidade do leite comercializado informalmente no Brasil tem sido motivo de investigações quanto ao perfil microbiológico do produto em várias regiões do país (Serra, 2004; Nero et al., 2004; Lavor et al., 2006 e Villa et al., 2007). Ademais, Durr et al. (2004) referiram que os resultados divulgados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite, após a implantação da IN 51, revelaram que a CBT foi o principal fator limitante na qualidade do leite nacional, pois elevada porcentagem de amostras encontrava-se acima do limite máximo exigido (Mesquita, 2006).

Os resultados da CBT no presente estudo merecem reflexão no contexto de saúde pública, já que o leite informal não é submetido a nenhum tipo de tratamento térmico que garanta a sua segurança microbiológica. Ressalta-se que em inquéritos realizados com consumidores do leite informal no Brasil, revelaram que, na maioria das vezes, os consumidores não têm conhecimento dos riscos inerentes à ingestão deste produto que é comercializado sem fiscalização sanitária, inadequadamente conservado, sem tratamento térmico e vendido sob o apelo de representar um alimento “mais natural” ou “mais nutritivo” (Bersot et al., 2005).

No entanto, vários pequenos produtores amostrados na região do estudo, tinham como principal e, por vezes, única fonte de renda mensal, o comércio do leite informal. No período de amostragem deste estudo, o preço do leite repassado aos produtores era de aproximadamente R\$ 0,72/litro. Curiosamente, no mesmo período, o leite informal era comercializado, na média, por R\$1,25/litro. Este fato denota que o comércio informal de leite além de se constituir em problema de saúde pública é também reflexo da situação cultural e socioeconômica do país, sendo utilizado por muitas famílias como fonte de renda mensal.

Santos (2011) enfatizou, recentemente que a venda direta de leite cru para o consumidor ou qualquer derivado lácteo produzido com leite cru, é terminantemente proibido no Brasil desde a década de 70. De maneira similar, nos EUA é considerada violação da lei federal comercializar o leite cru na maioria dos estados, enquanto no Canadá é ilegal a venda de leite cru em todo país (Bersot, 2005; Villa, 2007; Santos, 2011). Desta forma, faz-se necessário orientar os consumidores sobre os riscos associados a ingestão do produto e derivados lácteos sem tratamento térmico prévio.

As dificuldades em coibir a venda do leite informal repousam na venda do produto diretamente ao consumidor em carros, charretes, a cavalo, ou mesmo a pé, em bares, mercearias, padarias ou casa a casa em diferentes pontos dos municípios (Bersot, 2005; Villa, 2007; Santos, 2011). Ademais, os consumidores em potencial do leite cru são sensíveis ao apelo do consumo de alimentos “mais naturais”, “mais nutritivos”, “mais saborosos”, sem nenhum tipo de processamento industrial, adquiridos direto da fazenda (Villa, 2007).

A demanda pelo consumo de leite cru no Brasil é um mercado em expansão, dentro de um cenário de produção local de alimentos não transformados (Villa, 2007). O leite cru ou informal é reconhecido como o produto oriundo da ordenha de vacas, ovelhas, cabras e outros animais, que não tenha sido previamente pasteurizado, fervido ou tratado termicamente, tampouco, submetido aos sistemas de inspeção seja municipal, estadual ou federal (Bersot, 2005; Villa, 2007).

A pasteurização do leite foi introduzida há várias décadas para evitar a propagação micro-organismos com potencial zoonótico transmitidos pelo leite, particularmente, a tuberculose e brucelose (Vasconcellos e Ito, 2011). As

qualidades nutricionais, organolépticas e os benefícios para a saúde têm sido defendidos como razões para o aumento da ingestão desses produtos (Villa, 2007). No entanto, existe uma falta de dados com base científica para substanciar essas afirmações (Bersot, 2005; Villa, 2007; Santos, 2011). Por outro lado, diversos riscos à saúde são sabidamente conhecidos pelo consumo de leite e derivados lácteos crus (Carmo et al., 2002; Vasconcellos e Ito, 2011).

Com efeito, os achados de CBT no leite informal obtidos no presente estudo reforçam a preocupação com o comércio deste leite na região, em virtude da elevada contagem bacteriana, que reflete baixas ou precárias condições de higiene de ordenha e no acondicionamento térmico do produto, gerando riscos aos potenciais consumidores.

6.3 Avaliação dos constituintes Sólidos do leite

6.3.1 Gordura

O leite de vaca contém cerca de 0,9% de minerais e vitaminas, 3,2% de proteínas, 3,9% de gorduras, 4,6% de lactose e 87% de água (BRASIL, 2002). O tipo de ordenha (manual ou mecânica), a raça dos animais, período da lactação, volume de leite diário produzido, dieta balanceada e a metodologia da colheita podem influenciar nos teores dos componentes do leite, particularmente quanto aos valores de gordura e proteína (Reis et al., 2007). No Brasil é exigido o mínimo de 3% de gordura para o leite integral no país (BRASIL, 2002).

Com o intuito de avaliar os efeitos do tipo de ordenha e do método de colheita de leite na composição e na celularidade em criatórios na região de Pedro Leopoldo, MG, Reis et al. (2007) realizaram a colheita manual de leite antes da ordenha e dos coletores individuais da ordenhadeira mecânica, após a ordenha completa. Observaram que os percentuais de gordura foram menores no método manual, justificando que, como a gordura possui menor densidade do que a proteína e a lactose, resultando em teores de gordura mais elevados ao final da ordenha. No mesmo estudo, relataram que o leite ordenhado pela tarde apresentou maiores teores de gordura comparativamente ao do período da manhã. Tal fato pode ser creditado a maior quantidade de leite na primeira ordenha, diluindo os teores de gordura na ordenha da manhã. No Canadá, Quist et al. (2008) realizaram estudo semelhante em 16

propriedades leiteiras e também constataram maiores teores de gordura e proteína na última ordenha do dia.

As colheitas do presente estudo foram realizadas de forma a respeitar o manejo peculiar das propriedades com tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal. Foi observado que os valores da mediana encontrados para a gordura nos tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leites informais foram, respectivamente, 3,0%, 3,8% e 4,5%. O leite informal foi adquirido na maioria das vezes em garrafas plásticas, reutilizadas, foram evidenciados valores de gordura superior a 7,0% em algumas amostras. Este elevado teor de gordura no leite informal pode encontrar justificativa em problemas de homogeneização das alíquotas, resultando no aumento dos valores (médios e da mediana) de certos constituintes sólidos do leite, principalmente a gordura.

No Brasil, Pereira et al. (1999) observaram aumento nos teores de gordura no leite de animais com mastite, quando comparados com os animais sem mastite criados em sistema convencional. Machado et al. (2000ab) também encontraram aumento na concentração de gordura em amostras colhidas de tanques de expansão de propriedades convencionais, que continham leite de animais com mastite. No entanto, no presente estudo 34% dos tanques de expansão individuais, 13% dos tanques coletivos e 21% do leite informal apresentaram teor de gordura abaixo dos 3,0%, exigidos pela IN 51 (BRASIL, 2002).

Os baixos teores de gordura no leite obtidos de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal, inclusive em desacordo com a IN 51, poderiam ser reflexos das deficiências nutricionais das vacas amostradas na região, ou determinadas pelo período de colheita do material, geralmente no período da manhã, cujos teores de gordura são menores (Quist, et al., 2008)

Bueno et al. (2005) relataram que o aumento do teor de gordura do leite pode ser apenas relativo, em virtude da redução dos demais componentes devido a ocorrência de processos inflamatórios da glândula mamária. Porém, Harmon (1994) descreveu que quando há diminuição da produção de leite proporcionalmente maior do que a diminuição da síntese de gordura, os teores de gordura aumentam em virtude do efeito da concentração. Contrariamente,

Pereira et al., (1999) observaram redução dos teores de lipídeos no leite de animais com mastite do estado de Goiás.

Santos (2003a) sugeriu que a redução da concentração total de gordura no leite se deve a diminuição da capacidade de síntese de lipídeos pela glândula mamária com mastite. Assim, a redução nos teores de gordura no leite dos tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal amostrados na região, poderia ser justificada pelos altos índices de infecções mamárias nas vacas no presente estudo, visto que a contagem de células somáticas, particularmente nos tanques individuais e leite informal, também foram elevadas e são indicativos de elevada ocorrência de infecção mamária.

Estes achados sinalizam para a necessidade de ações como a adequação da dieta e adoção de medidas de controle e profilaxia da mastite, visando assegurar os níveis mínimos de gordura do leite nas vacas da região estudada.

6.3.2 Proteína

A IN 51 (BRASIL, 2002) estabelece que o leite com padrão de qualidade para o consumidor deve conter no mínimo 2,9% de proteína. Diferentes autores têm relatado aumento dos teores de proteína no leite de animais mastíticos (Harmon, 1994; Pereira et al., 1999). O aumento dos teores de proteína no leite é creditado ao aumento das proteínas plasmáticas em decorrência da resposta inflamatória às infecções mamárias (Harmon, 1994), e também ao maior influxo de substâncias do sangue para o leite (Santos, 2003). Pereira et al. (1999) observaram maiores teores de proteína em amostras de leite colhidas de vacas com mastite, criadas em sistema convencional. Em contraste, Bueno et al. (2005) observaram redução dos teores de proteína do leite de vacas com mastite criadas em sistema convencional, no estado de Goiás.

No presente estudo a mediana dos teores de proteínas do leite obtidos dos tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal foram, respectivamente, 3,0%, 3,4% e 3,2%. Desta forma, considerados dentro dos padrões mínimos exigidos pela IN 051 do MAPA (BRASIL, 2002). No entanto, foi observado que 32% dos tanques de expansão individuais, 5% dos tanques coletivos e 3% das amostras de leite informal apresentaram níveis de

proteína menores que a exigência mínima estabelecida. As amostras de leite dos tanques coletivos e leite informal apresentaram maior contaminação microbiológica comparada às amostras dos tanques individuais. Porém, os teores de constituintes sólidos no leite dos tanques coletivos são maiores, particularmente no que tange a proteína. O aumento dos níveis de proteína no leite nas amostras obtidas de tanques coletivos na região podem ser decorrentes da criação de raças com elevados constituintes sólidos, principalmente, gordura e proteína, como animais da raça Jersey, ou como reflexo de altas de infecções mamárias nos criatórios amostrados (Gonzalez et al., 2004).

Em contraste, os valores protéicos abaixo dos exigidos pela IN 51 nestes criatórios, principalmente nos tanques de expansão individuais, poderiam ser justificados por deficiências nutricionais, de manejo, e variabilidade de raças que podem influenciar negativamente os teores de gordura no leite, como pode ser observado em criatórios com animais, exclusivamente da raça holandesa (Machado, 2000).

6.3.3 Lactose

Gonzalez et al. (2004) afirmaram que a lactose é o componente nutricional que menos varia no leite bovino. Machado et al. (2000) observaram pequena redução dos teores de lactose no leite colhido de tanques de expansão em pequenas e médias propriedades rurais. Investigando a qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS, Gonzalez et al. (2004) observaram que os teores de lactose foram menores nos meses de março, abril e maio. Bueno et al. (2005) observaram que os valores de lactose foram inversamente proporcionais a CCS em vacas com mastite no estado de Goiás.

No presente estudo, dentre todos os constituintes sólidos do leite, somente a lactose não apresentou diferença estatística significativa entre o leite obtido dos tanques de expansão individuais (4,4%), tanques coletivos (4,5%) e leite informal (4,5%). No entanto, 24% dos tanques de expansão individuais, 10% dos tanques coletivos e 2% do leite informal apresentaram teores de lactose menores que 3,9%. Os baixos teores de lactose no leite dos tanques individuais amostrados, provavelmente podem ser justificados pela alta ocorrência de animais com infecção mamária, por micro-organismos,

particularmente do gênero *Staphylococcus*, que diminuem a síntese deste açúcar no parênquima mamário lesionado (Santos, 2003b). À semelhança da proteína e gordura, a presença de leite na região com baixos níveis de lactose denota a necessidade de orientação aos produtores para o balanceamento da dieta dos animais, bem como, da adoção de ações de controle e profilaxia da mastite nos rebanhos estudados.

6.3.4 Extrato seco desengordurado

No presente estudo foram encontrados, em geral, valores de extrato seco desengordurado (ESD) do leite dentro dos limites estabelecidos pela IN 51, para os tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal. A IN 51 estabelece que o ESD no leite de vacas deve ser padronizado em 8,4%. Foi observada diferença estatisticamente significativa para as medianas das amostras de leite obtidas dos tanques de expansão individuais (8,6%), tanques coletivos (8,8%) e leite informal (8,7%). No entanto, na média, 26% dos tanques individuais, 5% dos tanques coletivos e 10% do leite informal apresentaram valores de ESD <8,0%. À semelhança dos demais constituintes sólidos, baixos teores de ESD, provavelmente são causados por deficiências na dieta dos animais. Em contraste, níveis elevados de ESD no leite das vacas da região estudada podem ser reflexo, de alta ocorrência de infecções mamárias nos animais da região estudada (Gonzalez et al., 2001), fato observado na correlação com o isolamento microbiano, alta CBT e CCS do leite amostrado.

6.3.5 Nitrogênio Uréico

O nitrogênio uréico representa a porção de nitrogênio no leite na forma de uréia (Gonzalez et al., 2001; Lucci et al., 2006). O nível de nitrogênio uréico no leite está diretamente relacionado aos teores de uréia no sangue (Rajala, 2001; Lucci et al., 2006; Santos e Fonseca, 2006),

No presente estudo, os resultados referentes aos valores medianos do nitrogênio uréico foram estatisticamente significantes quando comparados os três tipos de leite amostrados, nos quais foram observados níveis de 16,1mg\dl para tanques de expansão individuais, 11,3mg\dl para tanques coletivos e 7,4mg\dl no leite informal. Este parâmetro é diretamente

influenciado pela dieta, particularmente no balanceamento de energia e proteína fornecida aos animais em lactação. No presente estudo, somente 9% do leite amostrado nos tanques individuais apresentavam valores $<10\text{mg}\text{dL}$. Em contraste, 35% dos tanques coletivos e 69% do leite informal acusaram níveis de nitrogênio uréico $<10\text{mg}\text{dL}$. Enquanto 57% dos tanques de expansão individuais acusaram teores $<10\text{mg}\text{dL}$. Em contrapartida, 57% do leite de tanques individuais, 15% dos tanques coletivos e 4% do leite informal apresentaram valores $\geq 16\text{mg}\text{dL}$.

Diferentes estudos têm indicado que valores médios de uréia no leite de vacas abaixo de $12\text{mg}\text{dL}$ (valores individuais inferiores a $8\text{mg}\text{dL}$), são causados por deficiências de proteína na dieta, ou excesso de carboidratos (Lucci et al., 2006; Casoli et al., 2008; Beserra et al., 2009). Os desequilíbrios destes nutrientes determinam redução na fermentação ruminal e na síntese de proteína microbiana, repercutindo em prejuízos importantes no desempenho produtivo e reprodutivo dos animais (Comeron, 2005; Lucci et al., 2006; Santos e Fonseca, 2006).

Por outro lado, médias de uréia no rebanho $\geq 18\text{mg}\text{dL}$ (valores individuais acima de $25\text{mg}\text{dL}$), geram distúrbios nos índices produtivos e reprodutivos do rebanho (Lucci et al., 2006; Cassoli, 2008; Botaro et al., 2011), notadamente pela diminuição das taxas de concepção do rebanho (Gonzalez et al., 2004), além de deficiências imunológicas (Santos e Fonseca, 2006), e desperdício de proteína e energia metabolizáveis (Gonzalez et al., 2004, Botaro, et al., 2011).

Os valores individuais de nitrogênio uréico no leite podem apresentar grande variação entre as vacas, mesmo dentro de uma mesma propriedade rural, (oscilando de $1\text{mg}\text{dL}$ a $30\text{mg}\text{dL}$). Para minimizar esta variação recomenda-se quantificar a média geral, de pelo menos 10 animais, ou o leite procedente dos tanques de expansão e/ou latões (Cassoli et al., 2008; Machado, 2008). Nestas condições de rebanho, a concentração de uréia no leite das vacas estaria situado, em geral, entre intervalo ideal de 10 a $16\text{mg}\text{dL}$ (Cassoli et al., 2008, Botaro et al., 2011).

Sugere-se que a avaliação do nitrogênio uréico no leite seja monitorada trimestralmente, para que se estabeleçam valores, que permitam balizar o equilíbrio nutricional dos animais nos rebanhos (Beserra et al., 2009).

Recomenda-se, também, a avaliação do nitrogênio uréico, sempre que ocorrerem grandes mudanças na dieta dos animais, ou ainda quando houver a suspeita de problemas reprodutivos, especialmente relacionados à morte embrionária precoce e retorno constante deaios em intervalos superiores há 21 dias (Gonzalez et al.; 2004; Cassoli, 2008). Estudos em fazendas de alta produção de leite têm constatado que, tanto o excesso como a deficiência dos níveis de nitrogênio uréico são prejudiciais para o desempenho reprodutivo dos rebanhos (Lucci et al., 2006; Pina et al., 2006; Beserra et al., 2009).

No presente estudo, 34% dos tanques de expansão individuais, 50% dos tanques coletivos e 27% do leite informal estariam dentro dos limites considerados ideais para o nitrogênio uréico. No entanto, a dificuldade de encontrar estudos avaliando o nitrogênio uréico em tanques de expansão coletivos e leite informal, limitaram discutir este parâmetro para as amostras de leite deste estudo.

6.4 Detecção de resíduos de antimicrobianos

A preocupação com a presença de resíduos de antimicrobianos ou inibidores da multiplicação de micro-organismos no leite de vacas criadas no Brasil tem sido foco de vários estudos nas últimas décadas (Fagundes, 1978; Barros e Perches, 1981; Gelli et al., 1984; Silva et al., 1984; Martins e Martins, 1985; Pelayo et al., 1990; Albuquerque et al., 1996; Borges et al., 2000; Brandão, 2000; Souza e Benedet, 2000; Nascimento et al., 2001; Serra, 2004, Villa, 2007).

Barros et al. (2001) encontraram 38,5% das amostras de leite C pasteurizado de vacas, comercializadas na cidade de Salvador, que acusaram a presença de resíduos de antimicrobianos. Nascimento et al. (2001) encontraram 50% de amostras positivas para resíduos em leite de vacas comercializado em Piracicaba, SP. Na região de Uberlândia, Almeida et al. (2003) ao amostrarem leite de vacas de 158 propriedades, encontraram 1,89% de positividade para antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos. Biacchi et al. (2004) encontraram resíduos de antimicrobianos em 80% das amostras analisadas de leite do tipo B e 100% de leite C provenientes do Vale do Paraíba, SP. Tetzner et al. (2005), no Triângulo Mineiro, detectaram resíduos em 33,3% das amostras de leite de vacas. Nero et al. (2007) constataram

resíduos em 11,4% das amostras de leite de vacas colhidas em quatro regiões leiteiras do Brasil. Fonseca et al. (2009) verificaram a presença de resíduos de antimicrobianos em 4% das amostras de leite UHT provenientes de Minas Gerais. Em contrapartida, Mendes et al. (2008) não detectaram a presença de resíduos de antimicrobianos em 32 amostras de leite cru comercializado clandestinamente no município de Mossoró, RN.

No entanto, são escassos os estudos direcionados à detecção de resíduos de antimicrobianos em tanques de expansão individuais, coletivos e leite informal comercializado no Brasil. Dentre as 300 amostras de leite analisadas no presente estudo, 164 (54,7%) foram negativas e 136 (45,3%) acusaram positivas para a presença de resíduos de antimicrobianos. Destas, 42 (42%) foi identificada em tanques de expansão individuais, 35 (35%) tanques coletivos e 59 (59%) das amostras de leite informal.

Os resultados da presença de resíduos de antimicrobianos nos três tipos de leite amostrados na região são preocupantes no contexto de saúde pública. A presença de resíduos de antimicrobianos no leite pode causar efeitos indesejáveis aos humanos (BRASIL, 1984; Acar e Rostel, 2001). Ademais, a presença de resíduos no leite de vacas causa problemas à indústria láctea, visto que pode prejudicar a produção de derivados, principalmente os obtidos pela fermentação do leite (Andrew, 1997; Lucci et al., 2006).

É importante salientar que, apesar do “kit” diagnóstico utilizado no presente estudo ser recomendado pelo MAPA (BRASIL, 1984) para a detecção de resíduos de antimicrobianos em leite no país, este teste não permite determinar o tipo de antimicrobiano presente no leite, pois o Delvotest® é um método de triagem, sensível a diferentes grupamentos de antimicrobianos tanto de uso em humanos quanto em animais (ABNT, 2002; CLSI, 2006; Villa, 2007).

A detecção de resíduos de antimicrobianos no leite de vacas na região estudada indica que as vacas estão sob tratamento intramamário ou parenteral contra mastite ou qualquer outra afecção. Desta forma, o leite não foi descartado em virtude do desconhecimento da legislação ou mesmo foi encaminhado inadvertidamente pelo produtor ao laticínio (Villa, 2007). A detecção de qualquer resíduo de antimicrobiano no leite de vacas produzido no

Brasil está em desacordo com as normas instituídas pelas IN 51 do MAPA (BRASIL, 1999, 2002, 2008).

A elevada frequência de detecção de resíduos no leite amostrados, no presente estudo, obtido dos tanques de expansão individuais, tanques coletivos reforça a necessidade de maior rigor dos laticínios na identificação de antimicrobianos no leite produzido na região. Faz-se necessário também que medidas preventivas sejam introduzidas durante a produção primária, em especial no respeito ao período de carência dos fármacos, bem como, na conscientização dos produtores quanto aos prejuízos da presença de antimicrobianos no leite e a orientação dos consumidores para os potenciais riscos à saúde relacionados com a ingestão de leite com resíduos de antimicrobianos (Ribeiro, 2008; Santos, 2011).

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite informal, também se constitui em desafio atual para os profissionais de saúde do Brasil, pelo potencial nocivo dos resíduos de antimicrobianos, além da presença de micro-organismos patogênicos no leite informal comercializado sem fiscalização e/ou tratamento térmico (Almeida et al., 2003). No presente estudo, 59% do leite informal continha resíduos de antimicrobianos. Este achado sinaliza para a necessidade de ações fiscalizatórias nos municípios, no sentido de coibir a venda do produto, de conscientizar a população dos riscos de consumo, assim como aperfeiçoar ações regionais que possibilitem estes produtores investirem nas instalações, equipamentos, genética e manejo geral dos animais, com o intuito de regularizar a produção de leite nos criatórios com base na IN 51 (BRASIL, 2002).

Vários fatores podem influenciar à qualidade do leite para consumo humano, no que tange à sua inocuidade, como a contaminação por patógenos e toxinas, presença de resíduos de antimicrobianos e os resultantes de ações fraudulentas, com o intuito de lesar o consumidor, aumentando o lucro com a venda do produto (Badini et al., 1997; Villa, 2007). Assim, as ações punitivas frente comercialização do leite informal devem ser embasadas na legislação vigente, embora devam ser implementadas de forma gradual e cuidadosa, dado o grande volume desse tipo de leite oferecido no país (Beloti et al., 1999, Villa, 2007).

Como forma de evitar o consumo do leite informal, deve-se orientar de forma continuada à população sobre os benefícios do emprego de tratamentos térmicos no leite, tais como a pasteurização e a UHT (ultra high temperature), que tornam o leite seguro para o consumidor do ponto de vista microbiológico (Beloti, 1999; Polegato et al., 2003; Villa, 2007).

No tocante à utilização de antimicrobianos de uso veterinário, também há a necessidade de informar os produtores dos problemas de uso irregular destes fármacos, restringindo a aquisição aos médicos veterinários, à semelhança da medicina humana, otimizando o uso racional dos antimicrobianos na medicina veterinária (Miniussi et al., 1992; Villa, 2007; Ribeiro, 2008; Santos, 2011).

6.5 Cultivo microbiológico

Foram identificadas no presente estudo 605 linhagens de micro-organismos, isoladas ou em associação. Destas 161 linhagens foram identificadas em 90 (90%) dos tanques de expansão individuais, 204 linhagens em 92 (92%) dos tanques coletivos e 240 linhagens em 99 (99%) do leite informal. Em contraste, 10 (10%) dos tanques individuais, 8 (8%) dos tanques coletivos e em 1% do leite informal não foram identificados micro-organismos.

A caracterização de micro-organismos nos tanques de expansão é considerado procedimento importante nos programas direcionados a melhoria da qualidade do leite, visto que, permite nortear a provável origem de contaminação do leite. A diferenciação dos agentes em contagiosos e ambientais possibilita inferir, estrategicamente, quais medidas de controle e profilaxia poderão ser adotadas para cada criatório. A contaminação do leite geralmente é causada por deficiências nos processos de higienização do ambiente, dos equipamentos e utensílios de ordenha, ou problemas relacionados ao armazenamento inadequado do produto final, por falhas no resfriamento do leite até a coleta a granel pelo laticínio (Ansay e Kaspar; Langoni, 1998; Santos, 2004; Brito, 2008; Ribeiro 2008; Faccioli, 2010).

Nos tanques de expansão individuais os micro-organismos mais frequentemente isolados foram enterobactérias (30,43%), seguido dos gêneros *Staphylococcus* (26,08%), *Streptococcus* (19,87%), e *Corynebacterium bovis* (9,31%). De maneira similar, nos tanques coletivos foi observado o predomínio

de enterobactérias (31,37%), seguido dos gêneros *Streptococcus* (22,05%), *Staphylococcus* (14,21%) e *Candida* (14,21%). Em contrapartida, nas amostras de leite informal os micror-organismos mais frequentemente isolados foram enterobactérias (45,00%), seguido dos gêneros *Streptococcus* (19,58%), *Candida* spp 8,33% e *Trichophyton* (7,08%).

6.5.1 Enterobactérias

As enterobactérias foram o grupo de micro-organismos isolados com maior frequência em todos os tipos de leite amostrados, denotando, inclusive, diferença estatisticamente significativa entre o número de linhagens de enterobactérias isoladas no leite informal quando comparadas aos tanques de expansão individuais e tanques coletivos. A alta prevalência de enterobactérias em tanques de expansão e no leite informal são indicativos de falta de higiene no momento da ordenha, particularmente, nos procedimentos de limpeza e desinfecção dos tetos dos animais, deficiência na higienização das ordenhadeiras, da mão dos ordenhadores, tanques e utensílios de armazenamento e transporte do leite. Sinalizam, também, deficiências na profilaxia de agentes ambientais de mastite (Ribeiro, 2001), que incluem a adoção de pré-dipping, evitar acúmulo de matéria orgânica e sujidades no ambiente entre as ordenhas, e o não oferecimento de alimentação após o término da retirada do leite (Chapman et al., 1993; Langoni, 1998, Ribeiro, 2008, Santos, 2011).

A elevada ocorrência de enterobactérias no leite amostrado, infere a reflexão sobre o risco a saúde pública a partir da ingestão do leite cru comercializado informalmente na região, em consonância com revisões realizadas por Langoni et al., (1998); Villa (2007); Brito (2008); Ribeiro (2008) e Santos (2011).

Em contrapartida, Philpot e Nickerson (2002) nos EUA afirmaram que há uma tendência mundial na diminuição das mastites causadas por micro-organismos ambientais, particularmente *E. coli*, em virtude da crescente adoção de boas práticas de manejo na ordenha, nas propriedades localizadas nos principais países produtores de leite.

Escherichia coli, *Enterobacter* spp. e *Klebsiella pneumoniae* foram identificados em alta frequência no leite amostrado. O habitat destes micro-

organismos são as fezes e\ou o próprio ambiente dos animais. A identificação destes microrganismos nos tanques de expansão indica contaminação do leite, fundamentalmente falhas de manejo na ordenha higiênica, raras são as situações onde a contaminação do leite do tanque de expansão foi correlacionada com infecção mamária por este grupo de micro-organismos (Langoni, 1999; Dias, 2007; Ribeiro et al., 2006).

Klebsiella pneumoniae pode estar presente na cama dos animais, geralmente constituída por areia, palha ou maravalha. A retirada diária das fezes e sujidades dos animais mantidos em estábulos com camas orgânicas, e a troca periódica da cama, são procedimentos recomendados no controle de enterobactérias no ambiente de ordenha (Langoni, 1999, Radostits et al., 2007).

Outras bactérias Gram-negativas, não pertencentes à Família *Enterobacteriaceae*, como os gêneros *Pseudomonas* e *Aeromonas* têm sido identificadas em baixa frequência no leite de vacas (Quinn, et al., 2005). Estes micro-organismos possuem como habitat o solo, água, superfície de plantas ou raízes e, também, são recuperados na cama dos animais (Radostits, et al., 2007). A respeito da baixa frequência na mastite bovina, a profilaxia e controle deste grupo de bactérias é baseado nas mesmas ações aplicadas aos micro-organismos ambientais (Ribeiro, 2008)

A elevada ocorrência de enterobactérias no leite obtido de tanques de expansão individuais, tanques coletivos e, principalmente, no leite informal, encontrado no presente estudo é altamente preocupante no contexto de saúde pública. Este grupo de micro-organismos está intimamente associado a processos de infecção e toxi-infecções alimentares, veiculadas pelo leite e derivados lácteos, principalmente nos produtos não submetidos ao tratamento térmico (Besser e Griffin, 1999; Acha e Szyfres, 2001). Estes resultados enfatizam a necessidade de orientação dos produtores da região com tanques de expansão para as boas práticas de ordenha higiênica. Indicam também, a necessidade de orientação da população quanto aos riscos do consumo do leite informal, assim como a importância de investimentos e políticas públicas, visando possibilitar ao pequeno produtor de leite informal condições de sair da marginalidade do comércio de leite, com vistas a garantir a inspeção e o tratamento térmico deste leite oferecido ao consumidor no Brasil.

6.5.2 *Streptococcus*

O gênero *Streptococcus* foi o segundo grande grupo de micro-organismos encontrados no leite na região do estudo. Este grupo de patógenos considerado contagioso na etiologia da mastite bovina possui como habitat a pele, mucosas e conjuntivas de humanos e animais. Notabiliza-se por infectar as vacas no momento da ordenha (Ribeiro, 2008). No presente estudo, 19,87% das linhagens de micro-organismos isolados dos tanques de expansão individuais, acusaram o isolamento de *Streptococcus* spp, 22,05% nos tanques coletivos e 19,58% do leite informal.

Dentre os estreptococos, o *Streptococcus agalactiae* é a espécie mais patogênica na etiologia da mastite bovina (Quinn et al., 2005). Foi identificada respectivamente, neste estudo, em 25,00%, 8,89% e 38,30% dos tanques de expansão individuais, tanques coletivos e no leite informal. Este micro-organismo habita de maneira comensal a mucosa do trato respiratório, geniturinário, pele das mamas e tetos (Quinn et al., 1994; Muller, 2002; Radostits et al., 2007). Tem sido identificado também no equipamento de ordenha e nas mãos dos ordenhadores (Philpot e Nickerson, 2002; Quinn et al., 2005). O comportamento contagioso e oportunista deste micro-organismo contribui para a alta frequência de mastite subclínica em vacas por esta espécie de estreptococos (Bansal et al., 2005; Ribeiro, 2008).

A elevada ocorrência de estreptococos no leite amostrado na região dos tanques de expansão e leite informal, indica a necessidade de adição de práticas de manejo e de ordenha higiênica nos criatórios na profilaxia e controle de patógenos contagiosos (Ribeiro, 2008). Dentre estas ações merecem destaque o treinamento do ordenhador, manutenção dos equipamentos e utensílios de ordenha, adoção do pós-dipping, terapia da vaca seca e descarte de vacas com mastite crônica (Radostits et al, 2007; Ribeiro, 2008)

Streptococcus dysgalactiae e *Streptococcus uberis*, também denominados estreptococos ambientais, são bactérias encontradas na palha, silagem, solo, microbiota da pele e trato respiratório dos animais (Costa, 1998; Brito e Brito, 2001; Quinn et al., 2005). No entanto, *Streptococcus dysgalactiae*

pode se comportar como patógeno contagioso (Costa, 1998; Brito e Brito, 2001). No presente estudo, foi identificado *Streptococcus dysgalactiae* em 8,89% dos tanques coletivos e 38,30% do leite informal. A elevada frequência de *Streptococcus dysgalactiae* no leite amostrado reforça a necessidade de adoção de práticas de higiene na ordenha nos criatórios da região estudada, com o intuito de minimizar os riscos de contaminação do leite e infecções mamárias por micro-organismos de origem ambiental (Ribeiro, 2008).

Streptococcus dysgalactiae pode ser isolado da mucosa oro-faríngea de bovinos (Quinn et al., 2005). Sugere-se que o ato mamar dos bezerros poderia transmitir o patógeno para a glândula mamária (Radostits, et al., 2007). Este fato poderia justificar a alta ocorrência de *Streptococcus dysgalactiae* no leite informal adquirido na região do estudo, visto que a totalidade destes criatórios onde foi possível a obtenção dos dados de manejo de ordenha, os animais eram ordenhados com bezerro ao pé.

6.5.3 Staphylococcus

O gênero *Staphylococcus* é considerado o principal agente causador da mastite em animais domésticos. À semelhança dos estreptococos, este grupo de patógenos possui como habitat as mucosas, conjuntivas, pele e tetos dos animais, e as infecções mamárias ocorrem predominantemente no momento da ordenha (Baker, 1984; Ribeiro, 2008).

Staphylococcus spp. foi identificado em 26,08% dos tanques de expansão individual e 14,21% dos tanques coletivos. Em contrapartida, foi isolado somente em 3,3% do leite informal. Foi observada diferença estatisticamente significativa para o isolamento de estafilococos quando comparado os tanques de expansão com o leite informal. A elevada frequência de isolamento de *Staphylococcus* spp. nos tanques individuais poderia ser justificada pela criação nestas propriedades de raças especializadas na produção de leite como, girolanda, holandês, jersey e jersolanda, que, conforme vários autores, apresentam maior prevalência de mastite contagiosa pelo gênero *Staphylococcus* (Cardoso et al., 2000, Barbosa, 2002).

Das 79 linhagens de *Staphylococcus* spp. obtidas das 300 amostras de leite, 52 (65,82%) foram classificadas como coagulase positivas (ECP) e 27 (34,18%) coagulase negativas (ECN). Dentre as linhagens de ECP, 26 foram

obtidas de tanques de expansão individuais, 18 de tanques coletivos e 8 de leite informal, enquanto, 16 estirpes de ECN foram identificadas em tanques individuais e 11 isoladas de tanques coletivos.

Estima-se que *S. aureus* seja o agente causal entre 30 e 40% das infecções mamárias em ruminantes destinados a produção de leite (Asperger e Zangerl, 2003). Este micro-organismo representa também o principal agente de infecções nosocomiais em humanos (Aarestrup et al., 2001). *S. aureus* foi detectado em 21,9% das vacas com mastite avaliadas na Turquia (Kirkan et al., 2005) em amostras de leite de vacas em sistema convencional no Paquistão isolou-se 28,33% de *S. aureus* (Kitchen, 1981). Ferguson et al. (2007), na Itália, descreveram *S. aureus* em 20,6% das amostras de leite de vacas com mastite colhidas em ordenha convencional. No Brasil, em propriedades convencionais no Sergipe, Oliveira et al. (2009) isolaram *S. aureus* em 21,95% das amostras de leite de vacas com mastite.

No presente estudo, 21 (50,00%) das estirpes de estafilococos obtidas em tanques de expansão individuais, 18 (62,06%) das isoladas nos tanques coletivos e 8 (100,00 %) das linhagens no leite informal foram classificadas como *Staphylococcus aureus*. Este resultado ratifica a participação deste micro-organismo nas infecções mamárias em vacas, ou mesmo como contaminante do equipamento de ordenha e outros utensílios utilizados no armazenamento do leite. Este dado é preocupante do ponto de vista de saúde pública, em virtude do potencial toxigênico detectado em linhagens de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite (Barberio et al., 2002; Oliveira et al., 2009) e de leite de tanques de expansão individuais ou coletivos (Faccioli, 2010).

Nas últimas décadas, os estafilococos coagulase negativos eram considerados patógenos menores (Belotti et al., 1991; Balaban e Rasooly, 2000; Becker et al., 2001; Radostitis et al., 2007; Bal et al., 2010). No entanto, estudos recentes indicam a emergência de ECN, com potencial toxigênico na gênese das mastites em vacas (Kirkan et al., 2005; Ferguson et al., 2007; Sawant et al., 2009). Schultz et al. (2004) identificaram 78,0% de ECN dentre 202 bactérias isoladas em amostras de leite de vacas criadas no sistema convencional. Na Turquia foram isoladas 28,33% linhagens de *S. aureus* e 20% de ECN em vacas criadas em sistema convencional (Kirkan et al., 2005). Na

Itália, Ferguson et al. (2007) descreveram o predomínio de ECN (22,6%) em amostras de leite de vacas obtidas em criatórios convencionais.

No presente estudo foram identificados ECN em 38,10% dos tanques de expansão individuais e 37,93% dos tanques coletivos. Não houve a identificação de ECN nos leites informais. Gentilini et al. (2002) ressaltaram os prejuízos provocados com o aumento na CCS e alteração nos teores dos constituintes do leite em vacas com isolamento de ECN. No estado de São Paulo, Faccioli, 2010 destacou a presença dos principais genes relacionados a toxi-infecções em humanos, identificados em ECN isolados de leite de vacas em tanques de expansão. Estes achados reforçam a necessidade de incluir os ECN como micro-organismos de risco na ocorrência de toxi-infecções em humanos relacionados ao consumo de leite e derivados (Cunha et al., 2004, 2006; Faccioli, 2010).

Em geral, os resultados do presente estudo indicam a necessidade de adoção de boas práticas de higiene na ordenha e de medidas de controle e profilaxia da mastite, no intuito de adequar os parâmetros de CCS e CBT, segundo a IN 51, bem como, reduzir as taxas de infecções mamárias nos criatórios por micro-organismos ambientais e contagiosos. Recomenda-se também o maior acesso aos produtores a assistência veterinária, visando o treinamento de ordenhadores, adequação do manejo sanitário e nutricional dos animais, e o uso racional de antimicrobianos, que podem influenciar nos teores dos constituintes do leite e na presença de resíduos.

O leite informal comercializado na região apresenta alta celularidade, elevada contagem bacteriana total, presença de resíduos de antimicrobianos e variações dos constituintes sólidos do leite, em desacordo com a IN 51. Este resultado é preocupante no contexto de saúde pública e indica a necessidade iminente de fiscalização nos municípios, conscientização dos riscos deste leite para os consumidores e adoção de políticas públicas visando adequar estes produtores para a legislação vigente, através da IN 51 do MAPA.

7. CONCLUSÕES

- As informações sobre as principais características dos produtores na região sudeste de estado de São Paulo mostraram que as propriedades são constituídas, na grande maioria, por pequenos e médios produtores com baixo nível de tecnificação, carentes de assistência veterinária especializada;

- A análise de composição do leite (gordura, proteína, lactose, extrato seco e extrato seco desengordurado) obtida dos tanques de expansão apresentaram, em geral, valores menores do que os considerados adequados pela IN 51, repercutindo em baixo rendimento de derivados, conseqüentemente, prejuízos econômicos na região estudada;

- O nitrogênio uréico foi o parâmetro que, individualmente, mais oscilou nos três tipos de leite estudados, provavelmente devido á deficiências e desequilíbrios na dieta dos animais, refletindo também o baixo nível de tecnificação e assistência veterinária na região;

- A CCS dos tanques de expansão individuais e leite informal mostrou diferença estatística para os tanques coletivos, provavelmente como reflexo de altas taxas de infecções mamárias nestes criatórios, reforçando a necessidade de adoção de procedimentos de controle e profilaxia da mastite e noções de ordenha higiênica na região;

- A CBT acusa valores em desacordo com a IN 51 para os três tipos de leite amostrados (tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal) refletindo, de modo geral, a baixa qualidade microbiológica do leite e deficiências nos procedimentos de ordenha higiênica, ratificando a necessidade de difusão de informações aos produtores a cerca de condições higiênicas na prática da ordenha mecânica ou manual;

- A elevada presença de resíduos de antimicrobianos nos três tipos de leite na região amostrada, particularmente no leite informal, definitivamente, aponta para os riscos em saúde pública do consumo de leite e derivados destas propriedades e o descumprimento da exigência da IN 51, que proíbe qualquer resíduo de fármaco no leite de vaca no Brasil, além da necessidade de informação aos técnicos e produtores do uso racional de antimicrobianos;

- O elevado isolamento de enterobactérias e de estreptococos ambientais no leite obtido dos tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal, indica baixas condições de higiene no processo de ordenha, e a necessidade da adoção de métodos de controle e profilaxia para a mastite por patógenos de origem ambiental, além de informações e treinamento aos produtores para a prática higiênica da ordenha mecânica ou manual;

- A presença de *Staphylococcus aureus* e ECN no leite dos tanques de expansão individuais, tanques coletivos e leite informal reforça também a necessidade de melhoria e/ou implementação de ações de controle e profilaxia para micro-organismos de origem contagiosa na etiologia da mastite, nos criatórios da região, com ênfase a prática de ordenha, manutenção de equipamentos, adoção de pós-dipping e terapia da vaca seca;

- O leite informal é comercializado sem mínimas condições de higiene, de armazenamento térmico e em recipientes de plástico re-utilizados de refrigerante, constituindo-se em sério problema de saúde pública aos consumidores da região.

8. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M.; SAYFARTH, A.M.; EMBORG, H.D.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R.S.; BAGER, F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal Enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.45, p.2054-2059, 2001.

ABNT, *Sistemas de gestão da análise de perigos e pontos críticos de controle – Segurança de alimentos*; Rio de Janeiro – RJ, 2002. 9 p.

ACAR, J.; ROSTEL, B. Antimicrobial resistance: an overview. *Revue Scientifique et Technique*, v.20, p.797-810, 2001.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3.ed. Organización Panamericana de La Salud: Washington, 2001. 398p.

ADWAN, G.; ABU-SHANAB, B.; ADWAN, K. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk in the North of Palestine. *Turkey Journal of Biology*, v.29, p.229-232, 2005.

ALBUQUERQUE, L. M. B.; MELO, V. M. M.; MARTINS, S. C. S. Investigações sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza, CE. *Hig. Aliment.*, v.10, n.41, p.29-31, 1996.

ALMEIDA, A.C.; SILVA, G.L.; SILVA, D.B.; FONSECA, Y.M.; BUELTA, T.T.; FERNANDES, E.C. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru consumido na cidade de Alfenas, MG. *Rev. Unifenas*, Alfenas, v. 5, p.165-168, 1999.

ALMEIDA, E. F. L. de. Aspectos sociais de produção de leite no Brasil. In: MADALENA, F. E.; MATOS, L. L.; HOLANDA Jr., E. V. (Ed.). *Produção de leite e Sociedade*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. cap. 9, p. 117-124.

ALMEIDA, L.P.; VIEIRA, R.L.; ROSSI, D.A.; CARNEIRO, A.L.; ROCHA, M.L. Resíduos de antibióticos no leite de propriedades rurais da região de Uberlândia – MG. *Bioscience Journal*, v.19, n.3, p.83-87, 2003.

AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; LEW, B. J. Estudo da variação do teor de cloretos no colostro e no leite de vacas sadias. *Ars Veterinaria*, Jaboticabal, v. 4, n. 1, p.105-112,1988.

AMARAL, L.A; ISA, H.; DIAS, L.T.; ROSSI JR., O.D.; NADER FILHO, A. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.24, n.4, p.173-177, 2004.

ANDREW, S.M. Antibiotic residue tests for individual cows – an update. *Proc. Annu. Meet. Nat. Mastitis Council*, p. 191-201, 1997.

ANSAY, S.E.; KASPAR, C.W. Survey et retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, p.131-134, 1997.

ARASHIRO, E.K.N.; TEODORO, V.A.M.; MIGUEL, E.M. *Mastite bovina: importância econômica e tecnológica*. Disponível em: (www.cienciadoleite.com.br). Acesso em 19 de fevereiro de 2008.

ASPERGER, H.; ZANGERL, P. *Staphylococcus aureus*. In: ROGINSKY, H.; TUQUAY, J.W.; FOX, P.F. (Eds). *Encyclopedia of dairy sciences*. v.4. Academic Press and Elsevier Science: Amsterdam, p.2563-2569, 2003.

BADINI, K.B.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A. Hábitos dos consumidores de leite cru produzido clandestinamente nos municípios de Botucatu, SP e São Manuel, SP. *Hig. Aliment.*, São Paulo, V.11, p.15-17, 1997.

BAKER, J.S. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. *Journal of Clinical Microbiology*, v.19, p.875-879, 1984.

BAL, E.B.B.; BAYAR, S.; BAL, M.A. Antimicrobial susceptibilities of coagulase-negative staphylococci (CNS) and streptococci from bovine subclinical mastitis cases. *The Journal of Microbiology*, v.48, n.3, p.267-274, 2010.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.61, p.1-10, 2000.

BANSAL, B.K.; HAMMAN, J.; GRABOWSKI, N.T.; SINGH, K.B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. *Journal of Dairy Research*, v.72, p.144-152, 2005.

BARBERIO, A.; GIETL, H.; DALVIT, P. "In vitro" sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. *Revista Napgama*, v.5, n.1, p.10, 2002.

BARBOSA, C.P.; BENEDETTI, E.; RIBEIRO, S.C.A.; GUIMARÃES, E.C. Relação entre contagem de células somáticas (CCS) e os resultados do "California Mastitis Test" (CMT), no diagnóstico de mastite bovina. *Bioscience Journal*, v.18, n.1, p.93-102, 2002.

BARROS, V. R. M.; PERCHES, E. M. C. Pesquisa de inibidores no leite tipo B distribuído ao consumo da grande São Paulo. *Rev. do Inst. Cândido Tostes*, n. 216, p.39-42, 1981.

BARROS, G.M.S.; JESUS, N.M.; SILVA, M.H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade de Salvador. *Revista Brasileira de Saúde em Produção Animal*, v.2, n.3, p.69-73, 2001.

BECKER, K.; KELLER, B.; VON EIFF, C.; BRICK, M.; LUBRITZ, G.; ETIENNE, J.; PETERS, G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, n.12, p.5551-5557, 2001.

BELOTTI, V.; MUELLER, E.E.; MEGID, J.; ROCHA, L.C.; METTIFOGO, E.; FREITAS, J.C. Ocorrência e caracterização de estafilococos coagulase negativos em mastite subclínica bovina no norte do Paraná, Brasil. *Semina*, v.12, n.1, p.49-52, 1991.

BELOTTI, V.; BARROS, M.A.F.; SOUZA, J.A.; SANTANA, E.H.W.; BALARIN, O.; CURIKI, Y. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procopio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. *Semina: Ci. Agr.*, v. 20, n.1, p. 12-15, 1999.

BESERRA, E.E.A.; VIEIRA, R.J.; SOUZA, J.A.T; NUNES, J.F. Efeitos do nitrogênio uréico no leite sobre a eficiência reprodutivas de vacas girolandas. *Revista Científica de Produção Animal*, v.11, n.1, p. 34-35, 2009.

BERSOT, L. S.; BARCELLOS, V.C.; MOTTA, D.S.; GALVÃO, J.A. Perfil dos consumidores de leite informal de Palotina, PR. *Rev. do Cons. Reg. de Med. Vet.do Paraná*, v. 4, p. 20, 2005.

BESSER, R.E.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: an emerging infectious disease. *Annual Review of Medicine*, v.50, p.355-367, 1999.

BIACCHI, N.C.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. Detecção de resíduos de antibióticos em leite bovino na região do Vale do Paraíba, São Paulo. *Revista de Biociências*, v.10, n.1-2, p.47-49, 2004.

BODDIE, R.L.; NICKERSON, S.C.; OWENS, W.E.; WATTS, J.L. Udder microflora in non lactating heifers. *Agriculture Practice*, v.8; p.22-25, 1987.

BORDOLLA, C.C. Métodos de detección de las mastitis bovina. *Revista Eletrónica de Veterinaria*, v.8, n.9, p.1-17, 2007.

BORGES, G. T. et al. Ocorrência de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado integral e padronizado produzido e comercializado no estado de Goiás. *Ciência Animal Brasileira*, v.1, n.1, p.59-63, 2000.

BOTARO, B.G.; CORTINHAS, C.S.; MESTIERI, L.; MACHADO, P.F.; SANTOS, M.V. Composição e frações protéicas no leite de rebanhos bovinos comerciais. *Revista Veterinária e Zootecnia*, v.18, n.1, p.81-91, 2011.

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

BRANDÃO, W. *Ocorrência de inibidores bacterianos (antibióticos) em leite cru tipo B produzido na região de Tupã, SP*. 2000. 67f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária-Vigilância Sanitária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II- Métodos físico-químicos*. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, 1981. 174 p.

BRASIL. Portaria n.08 de 26 de junho de 1984. Ministério da Agricultura, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária e Secretaria de Inspeção de

Produto Animal definem normas técnicas e higiênico Sanitárias para a produção de leite tipo "B". *Rev. Balde Branco*, v. 28, n. 238, p. 30-35, 1984.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.051 de 18 de setembro de 2002. *Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel*. Brasília, 2002. Disponível em: ([http://www.agricultura.gov.br/Instrução Normativa 51](http://www.agricultura.gov.br/Instrução%20Normativa%2051)). Acesso em 08 de janeiro de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Estatísticas agropecuárias*. Brasília, 2005. Disponível em: (www.mapa.gov.br). Acesso em 15 de fevereiro de 2011.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M.A. V. P. Qualidade higiênica do leite. Centro nacional de pesquisa de gado de leite. Juiz de Fora: EMBRAPA, 1998. _____. *A qualidade do leite*. Juiz de fora: EMBRAPA: São Paulo: Tortuga, 1998.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.5, p.531-537, 2001.

BRITO, M.A.V.P. *Segurança e Qualidade do Leite*. Disponível em: (www.cnpqgl.embrapa.br/pesquisa/seguranca.pdf). Acesso em 03 de janeiro de 2008.

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

BUERIS, V.; MOREIRA, C.G.; SANTOS, K.R.N. *Staphylococcus epidermidis* e outras espécies de *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Rothia* (*Stomatococcus*). In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 4.ed. Atheneu: São Paulo, p.183-187, 2005.

CHAPAVAL, L.; PIEKARSK, P. R. B. *Leite de qualidade: Manejo reprodutivo nutricional e sanitário*. Viçosa: UFV, 2000.

CAMPOS, E.P. *Qualidade microbiológica, físico-química e pesquisa de resíduos de antibióticos e pesticidas no leite bovino produzido pelo sistema convencional e pelo sistema orgânico*. 2004. 58f. Dissertação (Mestrado) – Vigilância Sanitária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

CARDOSO, H.F.T.; SILVA, N.; SENA, M.J.; CARMO, L.S. Production of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, v.29, p.347-349, 1999.

CARDOSO, H.F.T.; COSTA, G.M.; SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolado de leite bovino no Estado de Minas Gerais. *Rev. Brás. Méd. Vet.*,v.22, p.199-203, 1999.

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina 1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.1, p.7-10, 2000.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E.; PENA, E.C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, v.19, p.9-14, 2002.

CARVALHO, M.P.; MARTINS, P.C.; WRIGHT, J.T.C.; SPEARS, R.G. Cenários do leite no Brasil em 2020. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 2007, 190p.

CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F.; CARDOSO, F. Diagnóstico da qualidade do leite na região Sudeste entre 2005-2008, In Anais do 3 Congresso de Qualidade do Leite, Segurança Alimentar e Saúde Pública, Recife, PE, Ed. CCS, p.373, 2008.

CERQUEIRA, M.M.O.P; SOUZA, M.R.; RODRIGUES, R.; FONSECA, L.M.; RUBINICH, J.; QUINTAE., S. Alguns parâmetros microbiológicos de leite cru colhido em estabelecimento industrial e leite beneficiado em Belo Horizonte (MG). *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* v.9, n.6, p. 713-721, 1994.

CHAPAVAL, L, PIEKARSK, R. B. *Leite de qualidade: Manejo reprodutivo nutricional e sanitário*. Viçosa: UFV, 2000.

CHAPMAN, P.A.; WRIGHT, D.J.; HIGGINS, P. Untreated milk as a source of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Veterinary Record*, v.133, p.171, 1993.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard - 8th ed.* CLSI document M2-A9. Wayne, PA, USA: 2006.

COMERON, E.; ROMERO, L.; CUATRIN, A.; MACIEL, M. El efecto racial e genético. In: TAVERNA, M. (Ed) *Manual de referencias técnicas para el logro de leche de calidad*. 2.ed. INTA: Rafaela, p.119-134, 2005.

COSTA, E.O. Importância econômica da mastite infecciosa bovina. Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, v.15, n.1, p.21-26, 1991.

COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; PARDO, R.B.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.17, n.4, p.156-158, 1995a.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; WHITE, C.R.; PARDO, R.B. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.17, n.5, p.215-217, 1995b.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção de leite no país. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*. Fasc.1, v.1, p.3-9, 1998.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; MELVILLE, P.A. Infectious Bovine Mastitis Caused by Environmental Organisms. *Journal Veterinary Medicine*. v. 45, p.65-71, 1998.

COSTA, E.O.; MOTA, R.; SANTOS, F.G.B.; MÁRMORE, C.; ARCARO, J.R.P.; PEREZ, A.A.C. Contagem de células somáticas de amostras de leite de glândulas mamárias de fêmeas bovinas em lactação infectadas por microrganismos dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium*. *Revista Napgama*, v.8, n.2, p.3-7, 2005.

CULLOR, J. S. The control, treatment and prevention of the various types of bovine mastitis. *Veterinary Medicine Food-Animal Practice*, p. 571-579, 1993.

CUNHA, M.L.R.S.; SENZATO, Y.K.; SILVEIRA, L.V.A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative Staphylococci. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.99, n.8, p.855-860, 2004.

CUNHA, M.L.R.S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R.A.O.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, n.1, p.70-74, 2006.

CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; GENTILI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com o número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.1, p.19-24, 2008.

DEL PRATO, O.S. *Trattato di tecnologia casearia*. Bologna: [s.n.], 1998. 1070p.

DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. *Acta Veterinaria Brasílica*, v.1, n.1, p.23-27, 2007.

DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H.; PADOVANI, C.R.; GONZALES, J.A.H.; FREGONESI, O.B. Determinação de gordura, proteína, cobre, ferro, manganês, zinco e contagem de células somáticas no leite de vacas com mastite subclínica. *Semina: Ci. Agrárias*. Londrina, v.22, n.2, p.169-174, jul./dez. 2001.

DURR, J. W., CARVALHO, M. P., SANTOS, M V. *O compromisso com a qualidade do leite no Brasil*. Passo Fundo: UPF 2004.

DURR, João Walter. *Como produzir leite de alta qualidade*. Brasília: SENAR, 2005.

EBERHART, R. J. Coliform mastitis. *Veterinary Clinical North American Large Animal Practice*, v.6, n.2, p.287-300, 1984.

FACCIOLI, P.Y. *Detecção molecular de Staphylococcus aureus e de suas toxinas no leite de tanque de rebanhos bovinos, em condições de refrigeração, e sob temperatura ambiente*. 2011. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

FAGAN, E.P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; JOBIM, C.C. Avaliação de padrões físico-químico e microbiológico do leite em diferentes fases da lactação nas estações do ano em granjas leiteiras no Estado do Paraná – Brasil. *Semina*, v.29, n.3, p.651-660, 2008.

FAGUNDES, C. M. *Persistência de antibiótico no leite bovino em condições experimentais e prevalência nos leites tipo “B” e “C” consumidos em Belo Horizonte*. 1978. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1978.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural*, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FAO. Disponível em www.fao.org. Acesso em 27 abril de 2009.

FERGUSON, J.D.; AZZARO, G.; GAMBINA, M.; LICITRA, G. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *Journal of Dairy Science*, v.90, n.12, p.5798-5813, 2007.

FERNANDES, M.C.; RIBEIRO, M.G.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; LARA, G.H.B.; LISTONI, F.J.P. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistentes aos antimicrobianos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, p. 745-748, 2009b.

FERREIRA, L.M.; SOUZA, V.; PINTO, F.R.; FILHO, A.N.; MELO, P.C. Avaliação da qualidade físico-química de leite pasteurizado tipo C integral comercializado na cidade de Jaboticabal-SP, 2006. Disponível em: Acesso em 01/07/2010.

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

FONSECA, G.P.; CRUZ, A.G.; FARIA, R.S.; MOURA, M.R.L.; CARVALHO, L.M.J. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.2, 451-453, 2009.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. *Microbiologia de los Alimentos*. 4. Ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 681p.

FREITAS FILHO, J.F.; FILHO, J.S.; GONÇALVES, T.M.; SOUZA, J.F.; SILVA, A.H.; OLIVEIRA, H.B.; BEZERRA, J.D. Caracterização físico-química e microbiológica do leite 'in natura' comercializado informalmente no município de Garanhuns-PE, *Rev. Bras. de Tec. Agroind.*, Ponta Grossa, v. 03, n. 02: p. 38-46, 2009.

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.S.; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana "in vitro" de *Staphylococcus* coagulase-positiva isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

GELLI, D. S.; JAKABI, M.; SOUZA, A. Inibidores microbianos em leite pasteurizado do comércio da cidade de São Paulo. *Rev. do Inst. Adolfo Lutz*, v. 44, p. 19-24, 1984.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; BETANCOR, A. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.1913-1917, 2002.

GODKIN, A. Qualidade do leite ao redor do mundo: o papel da CCS. In: // *SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE*, 2000, Curitiba. Anais... Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2000. P. 9-20.

GOMES, S.T. Diagnóstico e perspectivas da produção de leite no Brasil. In: VILELA, D.; BRESSAN, M.; CUNHA, A.S. *Cadeia de lácteos no Brasil*:

restrições ao seu desenvolvimento. EMBRAPA Gado de Leite: Juiz de Fora, p.21-37, 2001.

GONZALEZ, F.H.D; DURR, J.W.; FONTANELLI, R. *Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras*. ed.1, Porto Alegre (UFRGS). v.1, 2001, p.72.

GONZALEZ, H.L.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; GOMES, J.F.; STUMPF JR., W.; SILVA, M.A. Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.6, p.1531-1534, 2004.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.S.M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, jan./fev. 2005.

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

HARMON, R. Somatic cell counts: myths vs reality. In: *NATIONAL MASTITIS COUNCIL REGIONAL MEETING*, 1998. Bellevue. Proceedings... 1998. p.40-50.

HARMON, R. J.; EBERHART, R. J.; JASPER, D. E.; LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. *Arlington: National Mastitis Council*, 1990. 34p.

HAMILTON, G.; EMANUELSON, V.; FORSLUND, K.; HANSON, I.; EKMAN, T. Mastitis and related management factors in dairy herds in Sweden. *Acta Vet Scand*. V.48, p 1-7, 2006.

HATA, E.; KATSUDA, K.; KOBAYASHI, H.; OGAWA, T.; ENDO, T.; EGUCHI, M. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus*

isolates from bovine mastitic milk in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.68, n.2, p.165-170, 2006.

HENDRIKSEN, R.S.; MEVIUS, D.J.; SCHROETER, A.; TEALE, C.; MEUNIER, D.; BUTAYE, P.; FRANCO, A.; UTINANE, A.; AMADO, A.; MORENO, M.; GREKO, C.; STARK, K.; BERGHOLD, C.; MYLLYNIEMI, A.; WASYL, D.; SUNDE, M.; AARESTRUP, F.M. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.50, n.28, p.1-10, 2008.

HILLERTON, J.E.; BERRY, E.A. Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. *Journal of Applied Microbiology*, v.98, n.6, p.1250-1255, 2005.

HOLANDA JR., E.V.; MADALENA, F.E.; HOLANDA, E.D.; MIRANDA, W.M.; SOUZA, M.R. Impacto econômico da mastite em seis fazendas de Araxá, Minas Gerais, Brasil. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal*, v.13, n.2, p.63-69, 2005.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Produção pecuária municipal*. IBGE, v.34, p.1-62, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em 22 dez. 2010.

INSTRUÇÃO NORMATIVA 51, Disponível em:
www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/InstrucaoNormativa51.pdf. Acesso em 16 agosto 2009.

KAIPANEM, T.; POHJANVIRTA, T.; SHPIGEL, N.Y.; SHWIMMER, A.; PYORALA, S.; PELKONEM, S. Virulence factors of *E. coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Veterinary Microbiology*, v.85, p.37-46, 2002.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, v.2, p.123-140, 2004.

KIRKAN, S.I.; GOKSOY, E.O.; KAYA, O. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus* coagulase negative from bovine mastitis in the Aydin region in Turkey, *Turk J. Vet. Anim. Sci.*, v.29, p.791-796, 2005.

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

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas colorido. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 2008, 1760p.

KUKUROVA, I.; HOZOVA, B. Interactions of antimicrobials in milk and their detection by the disk diffusion method and delvotest SP. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry International*, v.86, n.3, p.529-533, 2003.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACARI, E.M.; MELO, N.T. *Guia para identificação de fungos actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo: Sanvier, 1998. 445p.

LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.OP.; CARMO, L. S.; SANTOS, D.AA.; PENNA, C.F.M.A.; SOUZA, M.R. Contagem de *Staphylococcus* sp e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigeradas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

LANGENEGGER, J.; VIANNI, M. C. E e BAHIA, M. G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Seropédica, São Paulo, 1981.

LANGONI, H.; SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F.; Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.20, n.5, p.204-209, 1998.

LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*, v.3, n.3, p.57-64, 2000.

LANGONI, H.; SAKIYAMA, D.T.P.; GUIMARÃES, F.F.; MENOZZI, B.D.; SILVA, R.C. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.11, p.881-886, 2009.

LAVOR, U.L.; D'OVIDIO, L.; IZIDORO, T.B.; PADOVANI, C.R.; PINTO, J.P.A.N. Qualidade microbiológica do leite cru produzido na região de Botucatu, SP e impactos da nova legislação sobre a qualidade do produto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2, 2006, Goiânia. *Anais...* Goiânia, 2006. CD-ROM.

LECLERC, V.; DUFOUR, B.; LOMBARD, B.; GAUCHARD, F.; GARIN-BASTUJI, B.; SALVAT, G.; BRISABOIS, A.; POUMEYROL, M.; DE BUYSER, M.L.; GNANOU-BESSE, N.; LAHELLEC, C. Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. *Livestock Production Science*, v.76, p.195-202, 2002.

LUCCI, C.S; VALVASORI, E.; PEIXOTO JUNIOR.; K.; FONTOLAN, V. Concentrações de Nitrogênio na deita, no sangue e no leite de vacas lactantes no período pós parto. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.1, p.258-263, 2006.

MACHADO, P. F et al. CCS: Leite com mais qualidade e melhor rendimento industrial. *Indústria de Laticínios*, V.23, n.13, 1998.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRÍES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua Contagem de Células Somáticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.6, p.1883-1886, 2000a.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; PRADA E SILVA, L.F.; SARRÍES, G.A. Células somáticas no leite em rebanhos brasileiros. *Scientia Agrícola*, v.57, n.2, p.359-361, abr./jun. 2000b.

MACHADO, M.V.; ESCORSIN, S.; SANTOS, T.S.; DE PAULA, A.A.; JANSEN, P.R. *A inovação tecnológica em equipamentos para ordenha: estudo de caso em uma atividade agropecuária na região de Castro – PR*. Castro, set. 2005.

MACHADO, P.F. Pagamento do leite por qualidade. In Anais do III Congresso Brasileiro de qualidade do leite, Recife, PE, Ed CCS, 2008, p.373.

MAGALHÃES, H.; FARO, L.; CARDOSO, K.; PAZ, C.; MACHADO, P. Perdas econômicas decorrentes da contagem de células somáticas. In: *V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal*, 2004, Pirassununga. Anais... Pirassununga, SP, 2004.

MARTINS, J.L.S.; MARTINS, I.S. Inibidores bacterianos no leite tipo B comercializado no município de São Paulo, SP. *Rev. de Saúde Pública*, v. 19, p. 421-430, 1985.

MARTINEZ, M.B.; TRABULSI, L.R. *Enterobacteriaceae*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5.ed. Atheneu: São Paulo, p.271-280, 2008.

MARTINS, P.C. O leite como instrumento de desenvolvimento regional. In IX CONGRESSO PANAMERICANO DO LEITE, 9., Porto Alegre. Anais... Porto Alegre; Fepale, 2006. Cd 1.

MEAD, R.; CURNOW, R.N. *Statistical methods in agriculture and experimental biology*. 2.ed. London: Chapman e Hall, 1993. 415p.

MENDES, C.G.; SAKAMOTO, S.M.; SILVA, J.B.A.; LEITE, A.I. Pesquisa de resíduos de beta-lactâmicos no leite cru comercializado clandestinamente no município de Mossoró, RN, utilizando o Delvotest SP. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.75, n.1, p.95-98, 2008.

MENDONÇA, A.H. Qualidade físico-química de leite cru resfriado: comparação de diferentes procedimentos e locais de coleta. In: *Congresso Nacional de Laticínios*, Juiz de Fora. Anais. Juiz de Fora: Templo. 2001. p.276-282.

MESQUITA, A.J.; DÜRR, J.W.; COELHO, K.O. (Org.). *Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil*. Goiânia: Talento, 2006. 352p.

MINIUSSI, J.T. Resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal. In: CHARLES, T.P.; FURLONG, J. *Doenças dos bovinos de leite adultos*. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1992. p.169-174.

MÜLLER, E. E. Profilaxia e controle da mastite bovina. In. *Encontro de Pesquisadores em mastite*, III, 1999, Botucatu-SP. Anais..., Botucatu-SP, 1999, p. 57-61.

MÜLLER, E. E.. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Anais do II Sul-Leite: *Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil*. Maringá- PR, 2002, 206-217p.

MOTTA, R.A.; PINEIRO JUNIOR, J.W.; SILVA, D.R.; SILVEIRA, N.S.S.; GOMES, S.M.; SILVA, L.B.G.; CUNHA, A.P.; RABELLO, S.S.A.; SILVA, K.P.C.; BARBOSA, M.A.G. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do Estado de Pernambuco. *Revista Napgama*. V.7, n.1, p.10-13, 2004.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.O.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. *Manual of Clinical Microbiology*. 9.ed. ASM Press: Washington, 2v., 2007.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isolados na mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.5, p.1316-1318, 2007a.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.74, n.1, p.1-4, 2007b.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Revista de Nutrição*, v.14, n.2, p.119-129, 2001.

NMC - NATIONAL MASTITIS COUNCIL. *Current concepts of bovine mastitis*. 4.ed. NMC: Madison, 1996. 64p.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; NETTO, D.P.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Hazards in non-pasteurized milkon retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. *Braz. J. Microbiol.*, n.35, p. 211-215, 2004.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.j.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras; perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.25, n.1, p.191-195, 2005.

NERO, T.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; FRANCO, B.D.G.M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, n.2, p.391-393, 2007.

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. *Higiene Alimentar*, v.13, n.62, p.10-13, 1999.

OLIVEIRA, A.A.; MELO, C.B.; AZEVEDO, H.C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos leiteiros nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.1, p.226-230, 2009.

PAULA, M. C.; RIBAS, N. P.; MONARDES, H. G.; ARCE, J. E.; ANDRADE, U. Contagem de células somáticas em amostras de leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n. 5, p. 1303-1308, 2004.

PADILHA, M.R.F.; FERNANDEZ, Z.F.; PADILHA, M.R.F. Avaliação higiênico sanitária do leite tipo “C” comercializado no Recife/PE. *Rev. Higiene Alimentar*, São Paulo, v.13, n.61, p. 105-109, 1999.

PELAYO, J. S.; et al. Detecção de resíduos antimicrobianos no leite cru e pasteurizado tipo C comercializado na região de Londrina, PR. *Semina*, v.11, n.2, p.89-91, 1990.

PEREIRA, A.R.; PRADA E SILVA, L.F.; MOLON, L.K.; MACHADO, P.F.; BARANCELLI, G. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite gordura e proteína. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.36, n.3, p.121-124, 1999.

PINA, D.S.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.FD.; DETMANN, E.; CAMPOS, J.M.S.C; FONSECA, M.A.; TEIXEIRA, R.M.A.; OLIVEIRA, A.S. Síntese de proteína microbiana e concentrações de uréia em vacas alimentadas com diferentes fontes de proteína. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.4, p.1552-1559, 2006.

PINTO, J.P.A.N.; IZIDORO, T.B. Qualidade do leite: a Instrução Normativa 51/MAPA e os novos paradigmas. *Higiene Alimentar*, v.21, n.156, p.14-16, 2007.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. *Vencendo a luta contra a mastite*. 1.ed. Milkbizz: USA, 2002. 192p.

PRATIQUELEITE. *Leite na história humana*. Disponível em: (www.pratiqueleite.com.br). Acesso em 04 de janeiro de 2011.

POLEGATO, E.P.S.; RUDGE, A.C. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília – São Paulo/Brasil. *Revista Higiene Alimentar*, v.17, n.110, p.56-63, 2003.

PONCHIO, L.A.; GOMES, A.L.; PAZ, E. *Perspectivas de consumo do leite no Brasil*. Reportagem de julho de 2005. Disponível em: (www.cepea.esalq.usp.br). Acesso em 02 de janeiro de 2008.

POLEGATO, E. P. S.; RUDGE, A. C. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília – São Paulo/Brasil. *Rev. Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 17, n. 110, p. 56-63, 2003.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; POLONIO, A.L.C.; HONAGA, M.Y. Adequação do leite produzido na região de Araçatuba aos padrões preconizados pela IN 51\2002 (MAPA), Parte 2 (leite individual). Apresentação de trabalho. *In I Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite*. CBQL\Milk Point. Passo Fundo. RS, 2004.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe: London, 1994. 648p.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, E.C. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Artmed: Porto Alegre, 2005. 512p.

QUIST, M.A.; LeBLANC, S.J.; HAND, K.J.; LAZENBY, D.; MIGLIOR, F.; KELTON, D.F. Milking-to-milking variability for milk yield, fat and protein percentage, and somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, v.91, p.3412-3423, 2008.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. *Veterinary medicine. A textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10.ed. Saunders Elsevier: USA, 2007. 2156p.

RAJALA-SCHULTZ. Association between Milk ureanitrogen and fertility in Ohio dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.84, p.482-489, 2001.

REIS, G.L.; ALVES, A.A.; LANA, A.M.Q.; COELHO, S.G.; SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; PENNA, C.F.A.M.; MENDES, E.D.M. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físico-química e a contagem de células somáticas. *Ciência Rural*, v.37, n.4, p.1134-1138, 2007.

REDE BRASILEIRA DE QUALIDADE DO LEITE (RBQL). Manual de Instrução para a coleta e envio de amostras de leite para análises. Clínica do Leite – USP, Piracicaba, SP.(www.clinicadoleite.com.br), acesso 20 de janeiro de 2010.

RIBEIRO, M.G. *Fatores de virulência em cepas de Escherichia coli isoladas de mastite bovina clínica e subclínica*. 2001. 98p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S.; LANGONI, H.; GARINO JUNIOR, F.; VICTÓRIA, C.; LISTONI, F.J.P. Fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.5, p.724-731, 2006.

RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: ANDRADE, S.F. (Ed). *Manual de terapêutica Veterinária*. 3.ed. Roca: São Paulo, p.759-771, 2008.

RIBEIRO, M.G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite produzido no sistema orgânico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.1, p.52-58, 2009.

RODRIGUES, R.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R. Acidez do leite. *Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG*, Belo Horizonte, n. 13, p. 63-72, 1995.

ROESCH, G.; SCHAREN, W.; SCHALLIBAUM, M.; BLUM, J.W.; Subclinical mastitis in dairy cows in Swiss organic and conventional production systems. *J. Dairy. Res.* p.74-86, 2007.

RUBHUN, W.C. *Doenças do Gado Leiteiro*, São Paulo: Roca, 2000, p. 339-370.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A.O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.41, n.5, 2004.

SANDRINI, C.N.M.; PEREIRA, M.A.; BROD, C.S.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. *Escherichia coli* verotoxigênicas: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, v.37, n.1, p.175-182, 2007.

SANTANA, E.H.W.; CUNHA, M.L.R.S.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; MORAES, L.B.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; BELOTI, V. Assessment of the risk of raw milk

consumption related to staphylococcal food poisoning. *Ciência Animal Brasileira*, v.11, n.3, p.643-652, 2010.

SANTOS, M. V. Alta contagem bacteriana, *Revista Balde Brando*, p.60, abril, 2003 (a).

SANTOS, M. V. Antibióticos. Como não deixar resíduos no leite. *Revista Balde Brando*, São Paulo, fevereiro, 2003 (b).

SANTOS, M.V. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das células somáticas. In: BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e questão dos resíduos de antibióticos*. CBQL: Juiz de Fora, v.1, p.139-149, 2003 (c).

SANTOS, M.V; FONSECA, L.F.L. Estratégias para o controle da mastite e melhoria na qualidade do leite, Barueri, Ed Manole, 2006.

SANTOS, M.V. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das células somáticas. *In: Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibiótico*, Juiz de Fora, 2004 v.01, p.139-149.

SANTOS, F.G.B.; OLIVEIRA, W.L.M.; GARINO JÚNIOR, F.; COSTA, E.O.; LEAL BALBINO, T.C. Investigação dos mecanismos de resistência à oxacilina em *S. aureus* isolados de casos de mastite. *Revista Napgama*, v.8, n.2, p.14-17, 2005.

SANTOS, M. V. CCS E CBT siglas fundamentais para avaliar qualidade. *Balde Branco*, ano 15, n. 490, p.48-51, agosto 2005.

SANTOS, M. V. O uso da CCS em diferentes países. *In: MESQUITA, A. J.; DURR, J. W.; COELHO, K. O. Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil*. Goiânia: Talento, 2006. p. 181-197.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Qualidade microbiológica do leite: métodos de análise e estratégias de controle. In: Curso on line: Monitoramento da qualidade do leite. Milkpoint – Universidade de São Paulo (USP). p.1-15. (www.milkpoint.com.br) acesso 27 de julho de 2011.

SANTOS, M.V. Os atuais limites de CCS no Brasil estão adequados In: Curso on line: Monitoramento da qualidade do leite. Milkpoint – Universidade de São Paulo (USP). (www.milkpoint.com.br) acesso 10 de outubro de 2011.

SAWANT, A.A.; GILLESPIE, B.E.; OLIVER, S.P. Antimicrobial susceptibility of coagulase negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. *Veterinary Microbiology*, v.134, p.73-81, 2009.

SERRA, M.J.B. *Qualidade microbiana e físico-química do leite cru produzido na região de Pardinho, SP*. 2004. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

SCHALM, O.W.; CARROL, E.; JAIN, N.C. *Bovine mastitis*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1971. 360 p.

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.

SCHITO, G.C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, v.12, p.3-8, 2006.

SCHULTZ, R.P.J.; SMITH, K.L.; HOGAN, J.S.; LOVE, B.C. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Veterinary Microbiology*, v.102, p.33-42, 2004.

SEARS, P.M.; McCARTHY, K.K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v.19, p.171-185, 2003.

SILVA, J. P. et al. Prevalência de antibióticos no leite pasteurizado tipo B e especial 3.2% de gordura consumidos em Belo Horizonte, 1982-1983. *Rev. do Inst. Cândido Tostes*. V.39, p.7-12, 1984.

SILVA, E.R.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Veterinary Microbiology*, v.106, p.103-107, 2005.

SOUZA, M. R., RODRIGUES, R., FONSECA, L.M., CERQUEIRA, M. M. O. P. Pasteurização do leite. *Cad. Técnico da Escola de Vet. UFMG*, n. 13, p.85-93, 1995.

SOUZA, N. G. & BENEDET, H. D. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite de consumo no estado de Santa Catarina, Brasil. *Rev. do Inst. Cândido Tostes*, v.54, n.315, p.156-162, 2000.

SOUZA, V.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; CERESER, N.D. Características microbiológicas de amostras de tanque comunitário. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61,n.3,p.758-761, 2008.

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, v.80, n.8, p.1851-1865, 1997.

SCHALM, O. W.; CARROL, E.; JAIN, N. C. *Bovine mastitis*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. 360 p.

SMITH, B. *Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais*, v.2, São Paulo: Manole, 1994, p. 1045-1056.

SRINIVASAN, V.; SAWANT, A.A.; GILLESPIE, B.E.; HEADRICK, S.J.; CEASARIS, L.; OLIVER, S.P. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.3, n.3, p.274-283, 2006.

STEPHAN, R.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A.A.; LAMMLER, Ch. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Veterinary Microbiology*, v.78, p.373-382, 2001.

SUMNER, J. Farm production influences on milk hygiene quality. In: *Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk*, 1996, Wolfpassing. Proceedings... Brussels: International Dairy Federation, 1996.p. 94-102.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, p.1-13, 1997.

TEIXEIRA, N.M.; FREITAS, A.F.; BARRA, R.B. Influência dos fatores de meio ambiente na variação mensal da composição e contagem de células somáticas do leite em rebanhos do estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, n.4, p.491-499, 2003.

TEIXEIRA, L.M.; SANTOS, K.R.N.; BUERIS, V.; TRABULSI, L.R. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5.ed. Atheneu: São Paulo, p.175-182, 2008.

TEIXEIRA, S.R. Pagamento pela Qualidade. In: BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. A. *Qualidade do Leite*. Embrapa/Tortuga,. p.51-58, 1998.

TETZNER, T.A.D.; BENEDETTI, E.; GUIMARAES, E.C.; PERES, R.F. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro. *Higiene Alimentar*, v.19, n.130, p.69-72, 2005.

THORBERG, B.M.; DANIELSSON THAM, M.R.; EMANUELSON, V.; PERSON WALLER, K. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase negative staphylococci. *Journal of Dairy Science*, v.92, p.4962-4970, 2009.

THOMPSON, D. I.; POSTLE, D. S. The Wisconsin Mastitis Test – an indirect estimation of leucocytes in milk. *Journal of Milk and Food Technology*, Des Moines, v. 27, p. 271 – 275, 1964.

TURUTOGLU, H.; ERCELİK, S.; ÖZTÜRK, D. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v.50, p.41-45, 2006.

TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: Trabulsi, L. R.; Alterthum, F. *Microbiologia*. 4.ed. Atheneu: São Paulo, p.175-182, 2005a.

TRABULSI, L. R.; ORDOÑEZ, J. G.; MARTINEZ, M. B. *Enterobacteriaceae*. In: Trabulsi, L. R.; Alterthum, F. *Microbiologia*. 4.ed. Atheneu: São Paulo, p.269-276, 2005b.

TRIOLA, M.F. *Introdução à Estatística*. 7, Ed., Rio de Janeiro: LTC, 1999.

TRONCO, V.M. *Manual para Inspeção da Qualidade do Leite*. 2.ed., Santa Maria: Editora da UFSM, 2003.

VAN HORN, H. H.; WILCOX, C. J. Monitoring milk quality and udder health. In: *Large Dairy Herd Management*. Champaign: American Dairy Science Association, 1992. p. 475-86.

VASCONCELOS, C.G.C.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A.; PEREIRA, G.T. Influência da estação do ano, do estágio de lactação e da hora da ordenha sobre o número de células somáticas do leite bovino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.49, n.4, p.483-491, 1997.

VASCONCELOS, S. A; ITO, F.H. Principais zoonoses transmitidas pelo leite. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.9, n.1, p.32-37, 2011.

VERONESI, R.F. *Tratado de infectologia*. 3.ed. Atheneu: São Paulo, 2005. 2167p.

VILLA, F.B. *Qualidade físico-química, microbiológica e resíduos de antimicrobianos em leite in natura comercializados informalmente em Brotas, SP*. 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

VILELA, D.; GOMES, S. T.; CALEGAR, G. M. *Agronegócio leite e derivados: um programa nacional em C&T*. In.: CALDAS, et al.. (editores). *Agronegócio brasileiro; ciência, tecnologia e competitividade*. Brasília: CNPq, 1998. p. 257-275.

WILSON, D.J.; GONZALES, R.N.; DAS, H.H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pensilvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *Journal of Dairy Science*, v.80, n.10, p.2592-2597, 1997.

WINN JR., W. C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. *Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido*. 6.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008. 1565p.

ZAFALON, L.F.; AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e Estafilococos Coagulase Positivos e Negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. *Revista Napgama*, n.6, p.4-6, 1999.

ZAFALON, L.F.; ARCARO, J.R.P.; NADER FILHO, A.; VESCHI, J.L.A. Contagem de células somáticas no leite de vacas de diferentes raças em distintas lactações e condições climáticas. *Veterinária e Zootecnia*, v.17, n.3, p.378-385, 2010.

ZOCCAL, R. *Base de dados: leite em números*. Juiz de Fora: EMBRAPA/CNPGL, 2004. Disponível em: (www.cnp.gl.embrapa.com.br/produção). Acesso em 16 de janeiro de 2008.

9. TRABALHO CIENTÍFICO

9.1 Normas da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Normas Editoriais

A Revista Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia aceita, para submissão, artigos originais de pesquisa científica em sanidade animal e vegetal voltados ao agronegócio e suas implicações no agroambiente, incluindo nesse escopo a qualidade e a segurança alimentar. Aceita, também, artigos sobre pragas sinantrópicas. Todos os trabalhos devem se enquadrar nas normas redatoriais.

O Comitê Editorial fará análise dos trabalhos antes de submetê-los aos Consultores Científicos. Assim a revista busca publicar trabalhos científicos originais (artigos, relatos de casos e comunicações) que sejam de interesse para o desenvolvimento da ciência animal. Serão recomendados para publicação somente os trabalhos aprovados pelos editores, baseados na recomendação de dois revisores científicos da área pertinente e/ou do corpo editorial.

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o Webster's Third New International Dictionary. Para ortografia em português adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa.

Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

Autores. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

Resumo e Abstract devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos.

Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho.

Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a

correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados.

Referências bibliográficas. As referências devem relacionadas em ordem alfabética.

Citações bibliográficas

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)

dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)

mais de um trabalho citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem

cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Referências bibliográficas

São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

Periódicos

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. Am. J. Vet. Res., v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. Not. Med. Vet., n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. Anais... São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades

del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C. F. A. Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-Related-Articles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico

www.abmvz.org.br

Taxas de publicação

Taxa de submissão. O pagamento, no valor de R\$30,00, será feito por meio de boleto bancário (emitido quando da submissão do artigo). O autor deverá informar os dados para emissão da nota fiscal (Nome ou Razão Social, CPF ou CNPJ, Endereço).

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores.

9.1.1 Artigo 01

SURTO DE MASTITE BOVINA CAUSADA POR *ARCANOBACTERIUM*
PYOGENES
[OUTBREAK OF BOVINE MASTITIS CAUSED BY *ARCANOBACTERIUM*
PYOGENES]

R.G. Motta, M.G. Ribeiro, I.B.M. Perrotti, D.G. Motta, P.F. Domingues, T.M.
Lucas, T.O. Zamproga, F.J.P. Listoni

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP Caixa Postal 560,
18618-970 – Botucatu, SP

Arcanobacterium pyogenes são bactérias encontradas nas membranas mucosas dos animais domésticos (Quinn *et al.*, 2005), relacionadas a diferentes manifestações clínicas, que incluem: pneumonia, artrite, onfaloflebite, dermatite, endometrite, endocardite e abscessos em órgãos. As infecções mamárias em vacas por *A. pyogenes* são caracterizadas por processos purulentos, de difícil tratamento. São comumente reconhecidas como “mastite de verão”, em virtude da veiculação do agente para as vacas por moscas, cuja proliferação é favorecida em períodos do ano com altas temperatura e pluviosidade (Radostits *et al.*, 2007).

A mastite bovina por *A. pyogenes* acomete principalmente novilhas, vacas no período seco e, menos frequentemente, vacas em lactação (Radostits *et al.*, 2007; Santos e Fonseca, 2007). No decorrer da lactação, as infecções em vacas ocorrem comumente nas primeiras semanas pós-parto. A veiculação do microrganismo ocorre após contaminação do úbere e tetos por objetos perfurocortantes, por contaminação de ferimentos das mamas por moscas ou mesmo contaminação de utensílios de ordenha (Costa *et al.*, 2000). A infecção mamária é mais frequente em locais com excesso de umidade, acúmulo de sujidades e matéria orgânica, particularmente no ambiente da pré e pós-ordenha, pela presença de lama, terra e dejetos (Domingues *et al.*, 2008), caracterizando o microrganismo como agente ambiental na casuística da mastite bovina (Radostits *et al.*, 2007). O hábito das novilhas de mamar entre si é reportado também como uma das principais formas de transmissão do microrganismo nesta categoria animal (Domingues *et al.*, 2008).

A. pyogenes caracteriza-se por sinais de edema, formação de nódulos e abscessos isolados ou múltiplos nas mamas, e leite com presença de pus. Nos casos severos, ocorre formação de extensas áreas de abscessos com conteúdo purulento. Os abscessos mamários eventualmente expandem-se para os tecidos adjacentes da derme (Radostits *et al.*, 2007). Ocasionalmente são observados também sinais sistêmicos, como febre, agalaxia e anorexia (Costa *et al.*, 2000). O microrganismo revela certa sensibilidade aos antimicrobianos nos testes *in vitro*. No entanto, geralmente é refratário aos tratamentos intramamários e/ou parenterais nas infecções mamárias. Dessa forma, comumente recomenda-se a ablação química dos quartos acometidos (Ribeiro, 2008).

O presente estudo investigou um surto de mastite bovina causada por *A. pyogenes* em uma propriedade leiteira no município de Angatuba, SP, entre os meses de janeiro e fevereiro de 2010, a qual apresentava histórico de aumento súbito na ocorrência de mastite clínica, aliado a baixa eficiência do tratamento intramamário das vacas. O rebanho era constituído de 332 animais da raça Holandesa, sendo 217 vacas em lactação e produção diária de leite de 3.900. Os animais eram criados em sistema semi-intensivo, com ordenha mecânica do tipo “espinha de peixe”. O período do surto de mastite foi marcado por intensa precipitação pluviométrica, que culminou com excesso de umidade e acúmulo de barro nas imediações da sala de ordenha.

Procedeu-se ao exame das glândulas mamárias e ao consequente diagnóstico de mastite clínica, firmado nos animais que apresentaram alterações no leite – presença de grumos, pus, dessora ou estrias de sangue – ao teste da caneca telada de fundo escuro (Tamis), sinais de inflamação na glândula mamária – dor, edema, hiperemia ou nódulos – e sinais sistêmicos. A mastite subclínica foi caracterizada utilizando-se o teste clássico de *California Mastitis Test-CMT*, escores 1+ a 3+ (Radostits *et al.*, 2007). Simultaneamente, foi colhido leite das vacas – *pool* dos quatro quartos – para avaliação da contagem eletrônica de células somáticas (CCS). O material, acondicionado em frascos apropriados contendo o conservante bronopol, foi encaminhado em até 48 horas para a Clínica do Leite da Esalq-USP, Piracicaba, SP, e avaliado pelo equipamento *SomaCount 500*, pelo método de citometria de fluxo.

Foram colhidas assepticamente 597 amostras de leite de quartos mamários de 217 vacas em lactação e mantidas em temperatura de refrigeração (4 a 8oC) por 24 horas até o processamento. Todas as amostras de leite foram

semeadas em ágar-sangue bovino desfibrinado (5%) e ágar MacConkey, incubadas em aerobiose, a 37°C, por 72 horas. Os microrganismos isolados foram identificados com base nas características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo (Quinn *et al.*, 2005). O perfil de sensibilidade microbiana dos isolados foi realizado pela técnica de difusão com discos segundo o CLSI (Performance..., 2003), utilizando-se antimicrobianos disponíveis comercialmente para a terapia intramamária em vacas, a saber: amoxicilina (10µg), cefalexina (30µg), cefoperazona sódica (75µg), ceftiofur (30µg), enrofloxacin (5µg), espiramicina (100µg), florfenicol (30µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), penicilina (10UI) e tetraciclina (30µg).

Das 217 vacas em lactação, 38 (17,5%) apresentaram mastite clínica, e 114 (52,5%) subclínica. Nos animais com mastite clínica, foram observados: sensibilidade dolorosa acentuada à palpação da glândula mamária, presença de nódulos, abscessos isolados e múltiplos, e fístulas com drenagem de pus viscoso, esverdeado e de odor pútrido. A secreção láctea também mostrou aspecto purulento e odor desagradável. Em 26 (12,0%) vacas, das quais 10 com mastite clínica e 16 com mastite subclínica (escores 1+ a 3+ no CMT), foram isoladas colônias diminutas, com 1-2mm de diâmetro, β-hemolíticas, convexas, translúcidas, com 48 horas de incubação no meio de ágar-sangue. Na coloração de Gram, foram observados microrganismos pleomórficos, dispostos em arranjo de “paliçada” ou “letras chinesas”. O agente acusou reação negativa na prova de catalase e positiva no *Camp Test* frente ao *Staphylococcus aureus*. No ágar MacConkey, não houve isolamento bacteriano. Com base nestas características fenotípicas, o microrganismo foi classificado como *A. pyogenes*. Nos demais animais foram isolados os gêneros

Staphylococcus, 56 quartos com mastite subclínica e nove com mastite clínica; *Streptococcus*, 28 casos subclínicos e três clínicos; *Corynebacterium*, 14 subclínicos, *Enterobacter*; cinco clínicos; e *E. coli*, 11 clínicos.

O perfil de sensibilidade microbiana dos 26 isolados de *A. pyogenes* revelou que cefoperazona (92,3%), florfenicol (96,2%), cefalexina (84,6%) e ceftiofur (84,6%) foram os antimicrobianos mais efetivos. Os maiores índices de resistência das estirpes foram observados para neomicina (27,0%) e enrofloxacina (15,4%) (Tab. 1). A média da celularidade no tanque de resfriamento dos 217 animais em lactação foi de 1.080 CS/mL. Em contraste, a CCS dos 26 animais com isolamento de *A. pyogenes* acusou 2.273CS/mL, com variação de 989 a 4.321CS/mL. Os 10 animais com mastite clínica por *A. pyogenes* foram submetidos ao tratamento intramamário com produto comercial – associação de cefalexina e neomicina –, em duas aplicações diárias, com duração de cinco dias, resultando em sucesso terapêutico em somente três animais. Nos outros sete animais com mastite clínica por *A. pyogenes*, foi recomendada a ablação química dos quartos mamários, com infusão intramamária de iodo a 10%, diluído em 100 mL de solução salina (0,85%) estéril.

Raramente as infecções mamárias por *A. pyogenes* em vacas ocorrem em alta frequência nos rebanhos, tampouco sob a forma de surtos. Wilson *et al.* (1997) descreveram *A. pyogenes* em 0,3% da casuística de mastite em vacas nos EUA. No Brasil, estudo envolvendo a etiologia da mastite bovina verificou a participação de *A. pyogenes* em somente 0,4% de 736 dos casos (Costa *et al.*, 1998). No presente estudo, *A. pyogenes* foi isolado de 26 dentre 217 animais em lactação, representando 12% de todo o efetivo do plantel, ou 17,1% dos

casos de mastite clínica ou subclínica (26/152), caracterizando a participação incomum do microrganismo sob a forma de surto.

Dentre os 26 animais acometidos por *A. pyogenes*, 10 apresentaram a forma clínica reconhecida como apresentação clássica nas infecções mamárias em vacas, descritas tanto no Brasil (Domingues *et al.*, 2008) como em outros países (Radostits *et al.*, 2007), representada por queda abrupta da produção e sinais clínicos graves, como formação de nódulos, abscessos, áreas de necrose com trajetos fistulosos, presença de leite com pus e odor desagradável. Curiosamente, *A. pyogenes* acomete geralmente novilhas e vacas no período seco (Wilson *et al.*, 1997; Costa *et al.*, 2000), fato não observado nos animais reportados, que se encontravam exclusivamente em lactação. Ademais, no presente surto, foram encontrados 16 animais com mastite subclínica por *A. pyogenes*. Este achado também é pouco frequente nas mastites em vacas por *A. pyogenes*, pois, segundo Hillerton e Bramley (1989) esta bactéria raramente é isolada de animais em lactação na ausência de sinais clínicos.

A mastite bovina por *A. pyogenes* ocorre com maior frequência em períodos de altos índices pluviométricos e temperaturas elevadas, que favorecem condições climáticas para a proliferação de moscas, intimamente relacionadas com a veiculação do microrganismo para o úbere e tetos, das mucosas dos animais, da secreção purulenta de abscessos ou mesmo do próprio ambiente contaminado (Wilson *et al.*, 1997; Hillerton e Berry, 2005). O surto relatado ocorreu entre os meses de janeiro e fevereiro de 2010, o que coincide com períodos quentes e chuvosos do ano na região, reforçando a denominação

popular de “mastite de verão”, em virtude de certa sazonalidade das infecções pelo microrganismo, neste período do ano.

A CCS constitui método indireto de diagnóstico da mastite, utilizado no monitoramento da saúde da glândula mamária de vacas, fundamentado na contagem de células inflamatórias – neutrófilos – e epiteliais (Santos e Fonseca, 2007). A mediana da CCS observada nos animais identificados com mastite por *A. pyogenes* foi de 2.273.000 CS/mL. Este resultado encontra-se muito acima de 200-250.000 ou 500.000 CS/mL, considerados, respectivamente, os valores de normalidade e indicativos de infecção em vacas (Santos e Fonseca, 2007). A alta celularidade evidenciada nos animais infectados provavelmente decorre do intenso processo piogranulomatoso mamário induzido por *A. pyogenes*, caracterizado por alta quimiotaxia de neutrófilos, que tende a elevar significativamente a contagem celular do leite (Radostits *et al.*, 2007).

Mesmo que o tratamento intramamário tenha sido feito em 10 animais, com base na sensibilidade à cefalexina no antibiograma, utilizando-se antimastítico disponível comercialmente, a cura só foi obtida em três (30%) animais. Essa baixa efetividade no tratamento antimicrobiano já foi relatada por Costa *et al.* (2000) e Santos e Fonseca (2007). A refratariedade de *A. pyogenes* aos tratamentos pode ser creditada à estrutura do piogranuloma mamário, constituído por cápsula de tecido conectivo que reveste os abscessos, além do denso conteúdo purulento, que limita os antimicrobianos convencionais a atingirem concentrações terapêuticas no interior do foco infeccioso (Ribeiro, 2008), ou mesmo pela viabilidade intracelular do microrganismo (Radostits *et al.*, 2007).

Diante da ineficácia do tratamento convencional da mastite por *A. pyogenes*, recomenda-se a secagem das fêmeas acometidas, a ablação química dos quartos afetados, ou mesmo o descarte dos animais. Recomenda-se, também, a adoção de medidas gerais de controle e profilaxia nas propriedades, voltadas para microrganismos ambientais envolvidos na mastite, quais sejam: realização de *pré-dipping*, retirada periódica de matéria orgânica e sujidades do ambiente da pré e pós-ordenha, limpeza dos equipamentos de ordenha, oferecimento de alimentos na pós-ordenha e cloração da água utilizada na sala de ordenha (Fernandes *et al.*, 2009). A secagem abrupta dos animais e a adoção da terapia da vaca seca também são recomendadas em rebanhos com grande número de animais acometidos (Costa *et al.*, 1998, 2000; Radostits *et al.*, 2007).

Palavras-chave: gado leiteiro, *Arcanobacterium pyogenes*, surto, mastite

ABSTRACT

An uncommon outbreak of mastitis caused by Arcanobacterium pyogenes in 26 cows is reported. The epidemiological findings, clinical signs, microbiological exams, somatic cell count, in vitro susceptibility profile of strains, efficacy of intramammary treatment and control measures were discussed. Florfenicol (96.2%), cefoperazona (92.3%), cefaloxin (84.6%) and ceftiofur (84.6%) were the most effective antimicrobials, and neomicin (27.0%) and enrofloxacin (17.4%) the least effective antimicrobials.

Keywords: dairy cattle, Arcanobacterium pyogenes, outbreak, mastitis

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. *et al.* Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *J. Vet. Med.*, v.45, p.65-71, 1998.
- COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. *et al.* Mastite por *Arcanobacterium pyogenes*: surto em rebanho de gado de corte. *Rev. Núcleo Apoio Pesq. Gland. Mamária Prod. Leiteira*, v.1, p.08-12, 2000
- PERFORMANCE standards for antimicrobial disk susceptibility test (CLSI-NCCLS). 8.ed. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.
- DOMINGUES, P.F.; FERREIRA, B.L.S.; GALDINO, M.C. *et al.* Mastite em bezerra por *Arcanobacterium pyogenes* - Relato de Caso. *Rev. Vet. Zootec.*, v.15, p.257-262, 2008.
- FERNANDES, M.C.; RIBEIRO, M.G.; SIQUEIRA, A.K. *et al.* Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, p.745-748, 2009.
- HILLERTON, J.E.; BRAMLEY, A. Infection following challenge of the lactating and dry udder of dairy cows with *Actinomyces pyogenes* and *Peptostreptococcus indoliticus*. *Br. Vet. J.*, v.145, p.148-158, 1989.
- HILLERTON, J.E.; BERRY, E. A. Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. *J. Appl. Microbiol.*, v.98, p.1250-1255, 2005.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K., CARTER, M.E. *et al.* *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

Tabela 1. Perfil de sensibilidade microbiana na prova de difusão com discos em 26 linhagens de *Arcanobacterium pyogenes* isoladas de surto de mastite bovina. Botucatu, SP, 2010.

Antimicrobianos	Número de linhagens (%)		
	Sensível	Parcialmente	Resistente
Amoxicilina	18 (69,3)	7 (26,9)	1 (3,8)
Cefalexina	22 (84,6)	3 (11,5)	1 (3,8)
Cefoperazona	24 (92,3)	1 (3,8)	1 (3,8)
Ceftiofur	22 (84,6)	4 (15,4)	0 (--)
Enrofloxacina	12 (46,1)	10 (38,5)	4 (15,4)
Espiramicina	21 (80,8)	5 (19,2)	0 (--)
Florfenicol	25 (96,2)	1 (3,8)	0 (--)
Gentamicina	21 (60,8)	4 (15,4)	1 (3,8)
Neomicina	6 (23,0)	13 (50,0)	7 (27,0)
Penicilina	21 (80,8)	2 (7,7)	3 (11,5)
Tetraciclina	19 (73,1)	4 (15,4)	3 (11,5)

% = porcentagem

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.63, n.3, p.736-740, 2011

9.1.2 Artigo 02

Comunicação

Estudo dos métodos de rotina diagnóstica de mastite no leite de éguas

Communication

(Study of routine diagnosis methods of mastitis in mares)

R.G. Motta, M.G. Ribeiro, H. Langoni, D.G. Motta, M.M.J. Franco, A.C.S.

Almeida, I.B.M. Perrotti, F.J.P. Listoni, B.D. Menozzi

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP

Caixa Postal 560, 18.618-970 – Botucatu, SP. Email: rgmotta@fmvz.unesp.br

Os equinos representam importante espécie de animal doméstico em virtude da sua utilização como meio de transporte, tração, entretenimento, esporte, na recuperação de crianças especiais ou mesmo para o consumo humano de produtos e subprodutos cárneos. Estima-se que a população de equídeos no Brasil seja da ordem de 10 milhões de animais, concentrados principalmente na região nordeste do país, seguido pelas regiões sul e sudeste (Ribeiro, 2008). Na América do Sul, o leite equino comumente não é utilizado para consumo humano. Porém, em países como a Alemanha e França, o leite de éguas é utilizado em hospitais na alimentação de crianças nascidas de parto prematuro (Morais et al., 1997). Dentre os mamíferos, o leite de éguas é o que apresenta maior semelhança com o leite da mulher, em virtude da alta digestibilidade, baixo teor protéico, alto teor de lactose e no equilíbrio da relação albumina-globulina (Morais et al., 1997, Prestes et al., 1999). A égua,

em geral, supre a necessidade de leite do potro, que se constitui na única fonte de nutrição nas suas primeiras semanas de vida, fator essencial para a sobrevivência do recém nascido (Smith, 2003).

A ocorrência de mastites em éguas é considerada baixa se comparada aos ruminantes domésticos (Radostits et al., 2007). Ocorre com maior frequência na lactação e secundariamente no período seco, geralmente como consequência de ferimentos nas mamas ou nos tetos (McCue e Wilson, 1989). Os microrganismos mais frequentemente isolados do leite e das secreções de glândulas mamárias dos equídeos são *Streptococcus* beta-hemolíticos, *Staphylococcus* spp (Radostits et al., 2007), *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinobacillus* spp e enterobactérias (Prestes et al., 1999). Na suspeita de mastite, é fundamental o cultivo microbiológico do leite para se firmar o diagnóstico (Koterba et al., 1990). Os métodos de diagnóstico da mastite em vacas, particularmente o *California Mastitis Test*-CMT e a contagem de células somáticas, não estão padronizados para a espécie equina (Smith, 2003; Ribeiro, 2008). O presente estudo investigou em 55 éguas em lactação, os principais métodos de rotina de diagnóstico de mastite em vacas, incluindo a caneca telada de fundo escuro (Tamis), CMT, CCS, o perfil microbiano do leite e a sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos.

Foram utilizadas 55 éguas adultas em lactação, entre 15 a 150 dias pós-parto, com idade entre 4 e 15 anos, primíparas ou múltíparas (1 a 9 partos), de diferentes raças e cruzamentos distribuídas como segue: 18 (32,72%) mestiças, 14 (25,45%) quarto de milha, 12 (21,81%) mangalarga, 4 (7,27%) crioula, 4 (7,27%) appaloosa e 3 (5,45%) paint horse. Os animais eram utilizados em atividades de entretenimento, esporte, tração e como receptoras

de embriões.

Foram avaliadas 110 mamas de 55 éguas. O diagnóstico de mastite clínica foi firmado nos animais que apresentaram alterações no leite (presença de grumos, pus, dessora ou estrias de sangue) no teste da caneca telada de fundo escuro (Tamis), sinais de inflamação na glândula mamária (dor, edema, hiperemia ou nódulos) e/ou sistêmicos (Radostits et al., 2007). A presença de infecção mamária subclínica foi caracterizada utilizando o CMT (escores 1+ a 3+). Procedeu-se a colheita de 55 amostras de leite (5 a 10 ml), sob a forma de “pool” das duas mamas de cada égua, após anti-sepsia dos canais dos tetos, utilizando solução de álcool-iodado 2%. Após desprezar os primeiros jatos de leite, foram colhidas as amostras em frascos esterilizados para o envio ao laboratório para o cultivo microbiano, em até 24 horas, acondicionados em temperatura de refrigeração (4 a 8°C). Todas as amostras de leite foram semeadas em ágar-sangue bovino desfibrinado (5%) e ágar MacConkey, incubadas em aerobiose a 37°C, por 72 horas. Os microrganismos isolados foram identificados com base nas características morfotintoriais, bioquímicas e de cultivo (Quinn et al., 2005). O perfil “in vitro” de sensibilidade microbiana (antibiograma) dos isolados foi realizado pela técnica de difusão com discos (CLSI-NCCLS, 2006), utilizando os seguintes antimicrobianos: ceftiofur (30µg), enrofloxacina (5µg), florfenicol (30µg), gentamicina (10µg), penicilina (10UI), sulfa-trimetoprim (25µg), azitromicina (15µg), amicacina (30µg) e norfloxacina (10µg). Simultaneamente foi colhido leite do “pool” das mamas das 55 éguas para contagem eletrônica de células somáticas. O material foi acondicionado em frascos contendo o conservante bronopol, encaminhado em até 48 horas para o Núcleo de Pesquisa em

Mastites-NUPEMAS da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, avaliado pelo equipamento *SomaCount* 300, pelo método de citometria de fluxo (Arashiro et al., 2008).

Das 55 éguas em lactação, duas (3,64%) apresentaram mastite clínica, com sensibilidade dolorosa à palpação da glândula, presença de nódulo, abscesso isolado, pus viscoso e leite com grumos evidentes na prova da caneca telada. No teste do CMT, 13 (23,60%) éguas acusaram reação escore 1+, 7 (12,72%) 2+ e 12 (21,88%) 3+. Em 23 (41,80%) fêmeas não se observou qualquer reação no CMT.

O cultivo microbiológico das 55 amostras de leite revelou o isolamento de 71 estirpes de microrganismos, provenientes de 47 (85,45%) animais. Nas duas amostras de leite de animais com mastite clínica foram isolados *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Arcanobacterium pyogenes* (*A. pyogenes*). Das 55 amostras de leite cultivadas, em oito (14,55%) não foi obtido o isolamento microbiano. A presença de éguas com isolamento microbiano no leite, reagentes no CMT escores 1+, 2+ e 3+ foi observada em, respectivamente 12 (25,53%), 6 (12,76%) e 12 (25,53%) dos animais, perfazendo 30 éguas com reações entre 1 a 3+ (63,82%). Em contraste, em 17 (36,17%) das 47 éguas com isolamento microbiano não se evidenciou qualquer reação ao CMT.

O perfil de sensibilidade microbiana das 71 linhagens de microrganismos revelou que amicacina (78,9%), ceftiofur (74,7%), sulfa-trimetoprim (69,0%) e norfloxacina (69,0%) foram os antimicrobianos mais efetivos. Os maiores índices de resistência das estirpes foram observados para penicilina (64,8%), gentamicina (35,2%), azitromicina (35,2%), enrofloxacina (28,2%) e florfenicol

(28,2%) [Tabela 1]. A média e mediana da celularidade do leite das oito éguas sem isolamento de microrganismos, CMT negativas, foi 247, 57 e 259,81 x 10³ CS/mL, respectivamente. Em contraste, a CCS dos 47 animais com isolamento microbiano do leite, revelou 1.621,86 e 1.397,97 x 10³ CS/mL para média e mediana, variando de 110 a 9.589 x 10³ CS/mL. As éguas infectadas com *A. pyogenes* e *S. aureus* acusaram, respectivamente, 9.589 e 6.320 x 10³ CS/mL.

Welsh (1984), no Canadá, relatou mastite clínica em duas éguas por *Streptococcus zooepidemicus* no quarto mês de lactação, que apresentavam exsudato purulento em ambas as mamas. Estudo realizado na Alemanha entre 1985 a 1988, com 33 éguas de várias raças e idades (4 e 14 anos) apresentando mastite aguda, identificou predominantemente: *S. aureus*, *Escherichia coli* e os gêneros *Streptococcus* e *Klebsiella* (Bostedt et al., 1988). McCue e Wilson, (1989) em revisão de 28 casos de mastite clínica em éguas, isolaram: *Streptococcus* spp (36,8%), *Staphylococcus* spp. (14,5%) e *Actinobacillus suis* (10,5%). No Brasil, Prestes et al. (1999) estudaram 38 amostras de leite de éguas e identificaram diferentes linhagens de microrganismos distribuídos como segue: 17 (33,3%) *Staphylococcus* spp, 15 (29,4%) *Streptococcus* spp, 10 (19,6%) *Corynebacterium* spp, 5 (9,8%) *Bacillus* spp, 4 (7,9%) *Pasteurella* spp, 4 (7,9%) *Candida* spp, 4 (7,9%) *Enterobacter cloacae* e 4 (7,9%) *Shigella* spp. À semelhança dos ruminantes domésticos, foi observado no presente estudo predomínio de microrganismos contagiosos dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium*. Este grupo de bactérias possui como hábitat a pele e mucosas dos animais, e podem estabelecer infecções oportunistas secundárias a traumatismos nas

mamas ou via ascendente pelos canais dos tetos, pelo próprio ato de mamar dos potros (Smith, 2003; Radostits et al., 2007). Somente duas dentre as 55 éguas apresentaram sinais de mastite clínica, com isolamento de *S. aureus* e *A. pyogenes*. Este achado concorda com outros autores que também referem à baixa ocorrência de casos clínicos de mastite infecciosa em éguas (Prestes et al., 1999; Smith, 2003).

No presente estudo foi observado moderada concordância entre os animais reagentes ao CMT escores 1 a 3+ (63,82%) e o isolamento microbiano do leite. Este achado indica certa limitação do uso desta técnica - padronizada para bovinos - em éguas, como indicativo de infecção mamária. Em ruminantes domésticos, os testes indiretos utilizados como indicativos de infecção mamária - particularmente o CMT e CCS - são fundamentados no aumento da celularidade do leite, principalmente como consequência do elevado afluxo de neutrófilos. Para o exame de amostras individuais do leite de vacas considera-se normal entre 100 a 250 x 10³ CS/mL de leite, enquanto valores $\geq 500 \times 10^3$ CS/mL são indicativos de infecção (Santos e Fonseca, 2007). Apesar do uso pontual do CMT e CCS em éguas lactantes (Prestes et al., 1999; Santos et al., 2005; Reis et al., 2009), estes procedimentos não estão padronizados para a espécie eqüina (Smith, 2003).

A CCS de éguas pode ser realizada pela contagem microscópica em lâminas (Prestes et al., 1999) e, recentemente, tem sido realizada eletronicamente em aparelhos de citometria de fluxo (Reis et al., 2009), que permitem quantificar grande número de amostras em curto período de tempo (Santos e Fonseca, 2007). No entanto, a contagem eletrônica não está padronizada para a espécie eqüina. No Brasil, Prestes et al. (1999) avaliaram CCS do leite de 38

éguas em lactação aparentemente saudáveis ou com infecções subclínicas utilizando a contagem de células em lâminas, e constataram que somente três (9,6%) animais resultaram em contagens superiores a 500×10^3 CS/mL. Reis et al. (2009) também encontraram baixa celularidade ($16,4 \times 10^3$ CS/mL) no leite de éguas aparentemente saudáveis da raça mangalarga. De maneira similar, em oito dentre as 55 éguas amostradas sem sinais aparentes de infecção, CMT-negativas, acusaram contagens celulares inferiores a 250×10^3 CS/mL, valor que seria considerado dentro da normalidade para o leite de vacas (Santos e Fonseca, 2007).

Reis et al. (2009) encontraram valores elevados nas contagens celulares (2.550×10^3 CS/mL) e CBT em éguas mangalarga marchador com infecção mamária. De forma similar, em 47 das éguas amostradas nas quais se obteve isolamento microbiano do leite, foram encontradas contagens médias de $1.621,86 \times 10^3$ CS/mL. Este valor médio de celularidade nas éguas seria superior a 500×10^3 CS/mL, considerado indicativo de infecção para vacas, mostrando certa similaridade entre a resposta celular em vacas e éguas com infecção na glândula mamária. Apesar da alta CCS nas 55 éguas estudadas, somente dois animais exteriorizaram mastite clínica. Tal achado pode ser creditado ao predomínio dos microrganismos contagiosos nas 55 éguas estudadas, visto que este grupo de bactérias está adaptado às mucosas e conjuntivas de animais domésticos e, ao contrário dos ambientais, as infecções pelos contagiosos geralmente ocorrem sob a forma subclínica (Ribeiro, 2008).

Nas duas éguas com mastite clínica amostradas no presente estudo, com isolamento microbiano de *A. pyogenes* e *S. aureus* foram observadas

contagens celulares, respectivamente, de 9.589 e 6.320 x 10³ CS/mL, significativamente superiores às observadas para as éguas sadias, CMT-positivas e/ou com isolamento de outros microrganismos. Tal resultado pode ser justificado, em virtude de estes microrganismos apresentarem em comum grande número de fatores de virulência, estabelecerem infecções intracelulares e alta quimiotaxia por fagócitos - particularmente neutrófilos -, que resultam em infecções com alta celularidade no leite (Santos e Fonseca, 2007).

O teste de sensibilidade “in vitro” aos antimicrobianos revelou que a amicacina, ceftiofur, sulfa-trimetoprim e norfloxacin foram os mais efetivos, podendo ser indicados como fármacos de escolha no tratamento de infecções mamárias em éguas. Em contraste, foi observada alta resistência das linhagens frente à penicilina e, secundariamente, a gentamicina, a azitromicina, a enrofloxacin e ao florfenicol. Curiosamente, estes antimicrobianos que se mostraram pouco efetivos frente aos isolados são princípios ativos indicados no tratamento de diferentes afecções em eqüinos (Radostitis et al., 2007), incluindo na mastite em éguas (Bostedt et al., 1988; McCue e Wilson, 1989). Este achado reforça, de maneira similar às outras espécies de animais de produção, a necessidade da instituição dos tratamentos mamários em éguas com o respaldo dos testes “in vitro” de sensibilidade microbiana, com vistas a otimizar a cura microbiana (Ribeiro, 2008). Os achados do presente estudo permitiram inferir para a baixa ocorrência de mastite clínica em éguas, o predomínio de microrganismos contagiosos nas infecções mamárias, a moderada associação entre a CCS e o cultivo microbiano, certa similaridade da resposta de células somáticas das

éguas com as vacas, assim como a necessidade da instituição do tratamento mamário com respaldo no antibiograma.

ABSTRACT

Routine diagnosis methods used in bovine mastitis were studied in 55 mares in lactation. The findings of strip cup test, California Mastitis Test-CMT, electronic somatic cell count-CCS, microbiological culture and "in vitro" antimicrobial susceptibility profile of isolates were discussed. Streptococcus sp, Staphylococcus sp and enterobacterias were the most common microorganisms isolated in health and CMT-positive mammary glands. Staphylococcus aureus and Arcanobacterium pyogenes were identified in two mares presenting clinical mastitis. Somatic cell count of eight mares without presence of microorganism in milk was 247.57×10^3 CS/mL while in 47 mares with positive microbiological culture was observed $1.621,86 \times 10^3$ CS/mL. Moderate concordance (63.8%) between positive reactions in CMT (1 to 3+) and microbiological culture was observed. Amicacin (78.9%), ceftiofur (74.7%), sulpha-trimetoprim (69,0%) and norfloxacin (69,0%) were most effective drugs, while mainly resistance of isolates were observed against penicilin (64.8%), gentamycin (35.2%), azitromycin (35.2%), enrofloxacin (28.2%) and florfenicol (28.2%).

Keywords: mare, mastitis, etiology, California Mastitis Test, somatic cell count

REFERÊNCIAS

- ARASHIRO, E.K.N.; TEODORO, V.A.M.; MIGUEL, E.M. Mastite bovina: importância econômica e tecnológica. Disponível em: (www.cienciadoleite.com.br). Acesso em 21 de julho de 2010.
- BOSTEDT, H.; LEHMANN, B.; PEIP, D. Mastitis in mares. *Tierarztliche Praxis*. v.16, n.4, p.367-71, 1988.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test (CLSI-NCCLS)*. 9.ed. Pennsylvania, 2006.
- KOTERBA, A.M.; DRUMOND, W.H.; KOSCH, P.C. *Equine Clinical Neonatology*, USA : Lea & Febiger, 1990. 844p.
- McCUE, P.M.; WILSON, W.D. Equine mastitis – a review of 28 cases. *Equine Veterinary Journal*, v.21, n.5, p.351-3, 1989.
- MORAIS, M.T.; SIMONE, E.M.; ROMANO, L.A. Estudo da composição do leite de égua e comparação com o leite da mulher. *A Hora Veterinária*, ano 16, n.25, p.37-43, 1997.
- PRESTES, N.C.; LANGONI, H.; CORDEIRO, L.A.V. Estudo do leite de éguas sadias ou portadoras de mastite subclínica, pelo Teste de Whiteside, análise microbiológica e contagem de células somáticas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. V.36, n.3, 1999.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K., CARTER, M.E.; et al. (Eds). *Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. et al. (Eds). *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*.

10.ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p.724-725.

REIS, A. P., MESQUITA, A. J., MOREIRA, C. H. G., CURADO, E. A. F., SILVA, E. B., NICOLAU, E. S. Composição do leite de éguas da raça Mangalarga Marchador. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 66, n.2, p.130-135, 2007.

REIS, A. P., MESQUITA, A. J., SANTOS, K. R. P., OLIVEIRA, F. H., BAUDUINO, R., MACIEL, I. B., SILVA, E. B., NICOLAU, E. S. Avaliação da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total do leite de éguas da raça Mangalarga Marchador. *Veterinária e Zootecnia*, Botucatu, v.16, n.1, p.204-212, 2009.

RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: ANDRADE, S.F. (Eds). *Manual de Terapêutica Veterinária*. 3.ed. Roca: São Paulo, 2008. p.759-771.

SANTOS, E. M., ALMEIDA, F. Q., VIEIRA, A. A, PINTO, L. F. B., CORASSA, A., PIMENTEL, R. R.M.P., SILVA, V. P., GALZERANO, L. Lactation in Mangalarga Marchador mares: yield production and composition of milk, and weight gain of suckling foals. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v.34, n.2,p.627-634, 2005.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. (Eds.) *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. São Paulo: Manole, 2007. 314p.

SMITH, PB. *Large Animal Internal Medicine*. 4 Ed. St Louis: Mosby. 2003, p.937-998.

WELSH, R.D. The significance of *S. zooepidemicus* in the horse. *Equine Practice*, v.6, n.9, p.6-16, 1984.

Tabela 2. Perfil de sensibilidade microbiana na prova de difusão com discos em 71 linhagens de microrganismos isolados no leite de éguas sadias ou portadoras de infecção mamária. Botucatu, 2010.

Antimicrobianos	Número de linhagens (%)		
	Resistente	Parcialmente	Sensível
Penicilina	46 (64,8)	16 (22,5)	9 (12,7)
Sulfa trimetoprim	22 (31,0)	0 (--)	49 (69,0)
Gentamicina	25 (35,2)	11(15,5)	35(49,3)
Azitromicina	25 (35,2)	30 (42,3)	16 (22,5)
Ceftiofur	13 (18,3)	5 (7,0)	53 (74,7)
Enrofloxacina	20 (28,2)	12 (16,9)	39 (54,9)
Amicacina	15 (21,1)	0 (--)	56 (78,9)
Florfenicol	20(28,2)	10 (14,0)	41 (57,8)
Norfloxacino	16 (22,5)	6 (8,5)	49 (69,0)

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.63, n.4, p.1028-1032, 2011

ANEXO 1

Tabela 1. Padrões de Qualidade Físico-Química para o leite bovino cru refrigerado segundo Instrução Normativa 51.

Requisitos	Limites
Temperatura máxima conservação	7°C (máximo) Tanques individuais e Tanques comunitários
Gordura	3,00 % (mínimo)
Proteína	2,90% (mínimo)
Extrato seco desengordurado	8,40g 100g (mínimo)
Densidade relativa á 15°C *	1 028 á 1034 g/mL
Índice Crioscópico *	0,530°H
Eabilidade Álcool-Alizarol	72% (estável)
Acidez	0,14 á 0,18g\100mL

* Os testes de Índice crioscópico (ponto de congelamento) e de Densidade relativa tem como objetivo principal verificar a adição de água no leite.

Adaptado: Brasil (2002)