

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

INFLUÊNCIA DA MASTITE NA QUALIDADE DO LEITE E LEITE
INSTÁVEL NÃO ÁCIDO EM DIFERENTES QUARTOS MAMÁRIOS

GIOVANI JACOB KOLLING

PORTO ALEGRE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

INFLUÊNCIA DA MASTITE NA QUALIDADE DO LEITE E LEITE
INSTÁVEL NÃO ÁCIDO EM DIFERENTES QUARTOS MAMÁRIOS

Autor: Giovani Jacob Kolling

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária Preventiva.

Orientadora: Profa. Dra. Maira Balbinotti Zanela

Co-orientadora: Profa. Dra. Vivian Fischer

PORTO ALEGRE

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Kolling, Giovani Jacob

Influência da mastite na qualidade do leite e
leite instável não ácido em diferentes quartos
mamários / Giovani Jacob Kolling. -- 2012.
74 f.

Orientador: Maira Balbinotti Zanela.
Coorientador: Vivian Fischer.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Composição do leite. 2. CCS. 3. Estabilidade do
leite. 4. Leite Instável Não Ácido. 5. Mastite
subclínica. I. Zanela, Maira Balbinotti, orient. II.
Fischer, Vivian, coorient. III. Título.

Giovani Jacob Kolling

INFLUÊNCIA DA MASTITE NA QUALIDADE DO LEITE E LEITE INSTÁVEL
NÃO ÁCIDO EM DIFERENTES QUARTOS MAMÁRIOS

Aprovada em 08 de março de 2012.

APROVADA POR:

Professora Dra. Maira Balbinotti Zanela
Faculdade de Veterinária – UFRGS
Orientadora e Presidente da Banca

Professor Dr. André Thaler Neto
Centro de Ciências Agroveterinárias – UDESC
Membro da Banca

Professor Dr. Jorge Damián Stumpfs Diaz
Faculdade de Veterinária – UNICRUZ
Membro da Banca

Professora Dra. Verônica Schmidt
Faculdade de Veterinária – UFRGS
Membro da Banca

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antonio Valdemar e Irene, por me apoiarem e acreditarem em mim,
guiando-me em todos os momentos da vida e por terem me presenteado
com o maior bem que alguém pode transmitir: a educação.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, que me deu a vida, pelo fato de ter saúde, de colocar em nossa trajetória pessoas que nos ensinaram a crescer. Por me dar força, seguir o destino e chegar até aqui, superando vários obstáculos e não me deixando desistir, sempre me guiando, incentivando e superando as dificuldades.

Aos meus pais, Antonio Valdemar e Irene Maria Lentz Kolling, por todo o apoio, esforço, dedicação, trabalho, confiança em mim depositada, que nunca mediram esforços para me dar uma vida digna, muitas vezes se privando e enfrentando dificuldades juntos, mas sempre me incentivando no estudo e em minhas decisões. Agradeço, por toda a educação, conhecimento e caráter que me repassaram, com certeza, esses dons levarei por toda vida. Muito Obrigado por terem acreditado em mim, Amo muito vocês!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade da realização do mestrado e por contribuírem no meu crescimento científico.

A Profa. Dra. Maira Balbinotti Zanela pela orientação, confiança e amizade. Sua postura profissional e o amor pelo ensino e pesquisa são um grande exemplo e incentivo para mim.

A Profa. Dra. Vivian Fischer, minha co-orientadora, pelas ideias, conhecimentos compartilhados e ajuda na estatística do trabalho.

Aos Profs. MSc. Cristiane Beck e Dr. Jorge Damián Stumpfs Diaz, que desde a graduação me incentivaram a prosseguir nos estudos e sempre estiveram em contato durante a realização do mestrado.

À Embrapa Clima Temperado pelo convênio de pesquisa, cessão das instalações, animais experimentais, funcionários e apoio logístico. Aos pesquisadores, funcionários e estagiários, em especial a Pesquisadora Maria Edi Rocha Ribeiro, pelos inúmeros conselhos, ensinamentos, incentivo, horas de conversa e amizade que me auxiliaram a crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG) e ao Sr. Getúlio Carlos Schmidt Franco pela cessão das instalações e animais experimentais utilizados durante o trabalho.

Aos colegas de pós-graduação Luisa Wolker Fava pelo apoio e amizade nesse período, Marcelo Stumpf pela colaboração na realização dos experimentos e Ângelo Brandelli Costa pela amizade, apoio nos trabalhos científicos e estudo do inglês.

Aos estagiários do Sistema de Desenvolvimento em Pecuária Leiteira (SISPEL-EMBRAPA), Carolina da Silva dos Santos, Laís Perin, Katarina Pagliani Pereira e Alana Borges Tavares pela disponibilidade e auxílio durante todas as etapas do trabalho.

Aos eternos amigos, Tiago Kunz, Letícia Follmann, Ivan Kaufmann e Manuela Sauer pelas horas de conversa, brincadeiras e descontração.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Aos demais parentes e amigos pela paciência e compreensão da ausência, incentivo e carinho.

Muito Obrigado!

*“Lute com determinação, abrace a vida com paixão,
perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo
pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser
insignificante.”*

Charles Chaplin

RESUMO

Objetivou-se verificar a relação entre a contagem de células somáticas do leite bovino ordenhado separadamente de quartos mamários com a qualidade físico-química do leite, em especial com o leite instável não ácido (LINA). Foram utilizadas 21 vacas das raças Holandês e Jersey, sendo selecionados a partir do teste do CMT os animais que apresentaram pelo menos um quarto mamário normal e os demais quartos com mastite subclínica. Realizou-se análise microbiológica, identificação dos agentes e, durante quatro dias consecutivos, as vacas foram ordenhadas com uma ordenhadeira especial de quartos individuais avaliando a produção, composição química, contagem de células somáticas (CCS) e análise física do leite. O principal agente isolado no leite foi o *Corynebacterium* sp. (27,38%). Ocorreu diminuição de 21,65% na produção de leite dos quartos com CCS acima de 750.000cél/mL. A instabilidade do leite não apresentou variação significativa dos quartos saudáveis em comparação com os quartos mastíticos. Dentre os componentes químicos do leite, o teor de lactose diminuiu à medida que ocorreu o aumento da CCS e não houve variação significativa nos teores de gordura, proteína bruta, sólidos totais e sólidos desengordurados. Houve variação significativa dos componentes do leite nas diferentes raças. Não houve relação entre a mastite subclínica e o LINA.

Palavras-chave: composição do leite, CCS, estabilidade do leite, Leite Instável Não Ácido.

ABSTRACT

*This study assessed the relationship between milk somatic cell count from different mammary quarters of cows with subclinical mastitis with physical and chemical milk quality, especially unstable non acid milk (UNAM). Twenty-one Holstein and Jersey cows were used which had at least one healthy quarter and the others with subclinical mastitis. Microbiological analysis was performed and the agents were identified. Cows were milked with a special milking machine which separate milk from each quarter for four consecutive days. Milk samples were collected to evaluate production, chemical composition, somatic cell count (SCC) and physical characteristics. The main agent identified in the milk was *Corynebacterium* sp. (27,38%). There was a decrease of 21,65% in quarter milk production of cows with SCC above 750.000cél/mL. Milk instability did not vary significantly from healthy quarters compared with mastitis. Among milk chemical components, lactose decreased as the SCC increased and there were no significant variation in levels of fat, protein, total solids and non-fat solids. There were significant variations in the components of milk in different breeds. There was no relationship between subclinical mastitis and UNAM.*

Keywoks: *milk composition, SCC, stability of milk, unstable non acid milk.*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Reação negativa e positiva ao teste do álcool.....	27
FIGURA 2	Prevalência do LINA na região sul do RS, nos meses de abril de 2002 a março de 2005.....	29
FIGURA 3	Ordenhadeira especial de quartos mamários individuais.....	37
FIGURA 4	Cultura em ágar-sangue de <i>Staphylococcus aureus</i> , mostrando a beta-hemólise.....	38
FIGURA 5	Concentrações de álcool utilizadas para o teste de instabilidade do leite (62 a 86°GL).....	40
Capítulo 4		
FIGURA 1	Contagem de células somáticas (CCS) das amostras nas diferentes concentrações de álcool.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Mudanças na composição do leite associadas com elevada CCS.....	23
TABELA 2	Variação nos componentes do leite instável em relação ao leite normal por diversos autores (amostras de rebanho).....	32
TABELA 3	Variação nos componentes do leite instável em relação ao leite normal por diversos autores (amostras de vacas individuais).....	32
TABELA 4	Variação nos minerais do leite instável em relação ao leite normal por diversos autores (amostras de vacas individuais).....	33
TABELA 5	Distribuição das amostras de leite normal e do LINA nos diferentes intervalos de células somáticas.....	35
Capítulo 4		
TABELA 1	Microrganismos isolados no leite de quartos mamários das vacas selecionadas no experimento de acordo com a reação de CMT.....	49
TABELA 2	Análise descritiva da produção, composição físico-química do leite e CCS de amostras com crescimento de <i>Corynebacterium sp.</i>	50
TABELA 3	Médias e desvios padrão da composição físico-química e produção de leite de quartos mamários de vacas com mastite subclínica (valores médios), de diferentes grupos de CCS.....	53
TABELA 4	Produção total dos componentes do leite de quartos mamários de vacas com mastite subclínica, nos diferentes grupos de CCS.....	57
TABELA 5	Composição físico-química e produção de leite de quartos mamários de vacas das raças Holandês e Jersey com mastite subclínica (valores médios).....	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C – graus Celsius

°D – graus Dornic

°GL – Gay-Lussac

CAVG – Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça

CBT – Contagem Bacteriana Total

cél/mL – células por mililitros

CCS – Contagem de Células Somáticas

CMT – *California Mastitis Test*

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO – *Food and Agriculture Organization*

g/cm³ – gramas por centímetro cúbico

g/dia – gramas por dia

L – litros

LE – Leite Estável

LINA – Leite Instável Não Ácido

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IN32 – Instrução Normativa nº 32

IN51 – Instrução Normativa nº 51

IN62 – Instrução Normativa nº 62

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL – mililitro

NRC – National Research Council

PNMQL – Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite

RS – Rio Grande do Sul

SAS – Statistical Analysis System

SISPEL – Sistema de Desenvolvimento em Pecuária Leiteira

UFPEL – Universidade Federal de Pelotas

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

v/v – volume por volume

VP – Prova de Voges-Proskauer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Hipótese.....	18
1.2	Objetivos.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Mastite.....	19
2.1.1	Conceito.....	19
2.1.2	Importância econômica.....	19
2.1.3	Classificação da mastite.....	19
2.1.4	Contagem de Células Somáticas (CCS) x Legislação.....	21
2.1.5	Alterações no leite.....	22
2.2	Leite Instável Não Ácido (LINA).....	26
2.2.1	Conceito e ocorrência.....	26
2.2.2	Causas do LINA.....	30
2.2.3	Alterações no leite.....	31
2.2.4	Relação LINA x CCS.....	34
3	MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS.....	36
3.1	Animais.....	36
3.2	Coleta de amostras.....	36
3.3	Análises realizadas.....	37
3.3.1	Teste do <i>California Mastitis Test</i>	37
3.3.2	Análise Microbiológica.....	38
3.3.3	Análise de composição química e CCS.....	39
3.3.4	Análise física do leite.....	39
3.3.4.1	Acidez titulável em graus Dornic.....	40
3.3.4.2	Teste do álcool.....	40
3.3.4.3	Densidade.....	41
3.3.4.4	pH.....	41
3.4	Análise Estatística.....	41

4	MASTITE SUBCLÍNICA E QUALIDADE DO LEITE DE DIFERENTES QUARTOS MAMÁRIOS.....	42
	Resumo	43
	Introdução.....	44
	Materiais e métodos.....	46
	Resultados e discussão.....	48
	Conclusão.....	58
	Referências bibliográficas.....	58
5	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	63
6	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA GERAL.....	65

1. INTRODUÇÃO

A pecuária leiteira vem passando, nos últimos anos, por modificações estruturais que resultaram em mudanças na gestão técnica e econômica dos sistemas de produção. Neste contexto, a qualidade do leite é uma ferramenta importante para a gestão dos sistemas e da cadeia de produção de lácteos. Isto se deve a grande importância do leite na alimentação e na segurança dos produtos ofertados ao consumidor. Devido à relevância que a qualidade do leite tem para os laticínios, qualquer alteração na mesma merece ressaltar.

A produção de leite no Brasil apresenta importância socioeconômica significativa, sendo considerado o quinto maior produtor mundial, registrando uma produção de 31,2 milhões de toneladas (FAO, 2011). De acordo com a projeção, a produção de leite no país tende a crescer 1,95% ao ano, dessa forma em 2020 deve ultrapassar os 37 bilhões de litros. Mesmo com o consumo interno em expansão terá, segundo a estimativa, um excedente de leite crescente, chegando em 2020 a 4,5 bilhões de litros (Brasil, 2010).

Com relação à função social, a atividade leiteira está presente na maioria das cidades brasileiras e destaca-se sua importância na geração de empregos e na formação de renda regional.

O leite bovino é um fluido composto de uma série de nutrientes sintetizados na glândula mamária, a partir de precursores derivados da alimentação e do metabolismo. É uma mistura homogênea composta de água, proteína, gorduras, lactose, minerais, vitaminas e enzimas (González, 2001). A produção e a composição do leite podem variar de acordo com a raça do animal, mudanças ambientais, alimentação, estágio de lactação e presença de infecções na glândula mamária do animal, como a mastite (Magalhães et al., 2006; Noro et al., 2006).

A mastite bovina é o fator que mais provoca perdas econômicas na cadeia produtiva do leite, principalmente pela redução da produção (Lescourret & Coulon, 1994). Essa redução ocorre devido a alterações nas células epiteliais secretoras e na permeabilidade vascular no alvéolo durante a infecção. A extensão da perda é influenciada por diversos fatores como gravidade da infecção, tipo de microrganismo causador, duração, idade do animal, época do ano, estado nutricional e potencial genético (Schultz, 1977).

O termo células somáticas do leite é utilizado para designar todas as células presentes no mesmo, incluindo as de origem sanguínea (leucócitos) e as de descamação do epitélio

glandular secretor. Diversos são os fatores que afetam a contagem de células somáticas (CCS), entre eles, o nível de infecção da glândula mamária, a época do ano, o estágio da lactação e a idade da vaca (Costa & Watanabe, 1999).

A contagem de células somáticas tem o propósito de fazer uma avaliação indireta da saúde da glândula mamária de fêmeas em lactação, utilizando-se como referência o aumento na concentração de células de defesa no leite, constituindo-se uma estimativa precisa do nível de infecção do úbere (Laranja & Amaro, 1998).

A análise de CCS vem sendo realizado há mais de 40 anos na pecuária leiteira e além de ser indicativo na avaliação da saúde animal, como auxiliar no diagnóstico de mastite, também é utilizado como parâmetro de avaliação da qualidade do leite (Laranja & Amaro, 1998). Além disso, quadros de mastites levam a um aumento da passagem de cloreto de sódio direto do sangue para o leite, gerando um desequilíbrio salino o que pode interferir na estabilidade do leite (Tozzetti et al., 2008).

Atualmente, a instabilidade do leite é um problema frequentemente encontrado em países em desenvolvimento e em vários estados do Brasil, apresentando uma ocorrência acima de 50% (Barbosa, 2011). No Brasil, esta instabilidade foi denominada como Leite Instável Não Ácido (LINA) que se caracteriza pela perda da estabilidade da caseína, resultando em precipitação positiva ao teste do álcool, sem apresentar acidez elevada – acima de 18°D e com alterações nas propriedades físico-químicas do leite (Zanela, 2006a).

Velloso (1998) relata que o leite instável ao etanol, por outras causas que não a acidez elevada, pode ocorrer no leite de animais com mastite.

1.1 Hipótese

A hipótese do trabalho é que a mastite subclínica afeta a qualidade do leite e a ocorrência de leite instável não ácido.

1.2 Objetivos

- Caracterizar a qualidade físico-química e microbiológica do leite oriundo de quartos mamários de vacas com mastite subclínica;
- Verificar a relação entre a estabilidade do leite com a contagem de células somáticas;
- Comparar a qualidade do leite estável e do Leite Instável Não Ácido (LINA) de diferentes quartos mamários de vacas da raça Jersey e Holandês com mastite subclínica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mastite

2.1.1 Conceito

O conceito de mastite, segundo Philpot & Nickerson (2002), é a inflamação da glândula mamária proveniente de trauma ou lesão, irritação química ou, sobretudo, infecção causada por microrganismos, especialmente por bactérias. A presença da mastite proporciona o aumento das qualidades indesejáveis do leite, tais como enzimas proteolíticas, sais e rancidez. Ao mesmo tempo, diminui as qualidades desejáveis, como teor de caseína, gordura e lactose, assim como aptidão para a fabricação de queijo e a estabilidade térmica.

2.1.2 Importância econômica

Segundo Bradley (2002), a mastite é a doença mais importante economicamente do gado leiteiro, sendo responsável por 38% do total dos custos diretos com as doenças comuns de produção.

No Brasil, vários levantamentos realizados a partir de 1970 indicam altos índices de mastite subclínica variando de 11,9% a 72,3% de vacas infectadas por rebanho, e a redução da produção de leite situa-se entre 25,4% e 43,0%. Este resultado é preocupante, já que a forma subclínica é responsável pelas maiores perdas na produção leiteira (Coldebella, 2003; Ribeiro et al., 2003).

Além dos impactos econômicos, causa prejuízos enormes para o próprio animal e compromete as lactações. Um quarto infectado no úbere pode reduzir a produção de leite de 10% a 12% na mesma lactação. Se a infecção ocorrer no período seco, a perda pode chegar a 40% no potencial do quarto na lactação seguinte (Lagoni et al., 2000).

2.1.3 Classificação da mastite

A etiologia da mastite é complexa e multivariada, o que torna necessária à identificação dos microrganismos que causam a infecção da glândula mamária, tanto para o controle e prevenção, quanto para o monitoramento de rebanhos (Ribeiro et al., 2003).

A reação inflamatória pode estar presente mesmo sem apresentar processo infeccioso na glândula, devido á lesões traumáticas, agressões por agentes químicos, entre outros fatores (Ribeiro et al., 2003).

A mastite bovina apresenta-se sob duas formas, clínica e subclínica. O animal com mastite clínica apresenta sinais evidentes, tais como, edema, hipertermia, endurecimento e dor na glândula mamária e/ou aparecimento de grumos, pus ou alterações visuais das características do leite (Bradley, 2002; Radostits et al., 2002; Fonseca & Santos, 2000; Tozzetti, 2008).

Na mastite subclínica não ocorrem mudanças visíveis no aspecto do leite ou do úbere. Caracteriza-se pela elevação da CCS e as mudanças na composição do leite estão diretamente relacionadas com a superfície do tecido mamário atingido pela reação inflamatória (Bradley, 2002; Gianola et al., 2004; Dias, 2007). Portanto, há uma relação direta entre a CCS e a concentração dos componentes do leite (Schäellibaum, 2000).

A forma subclínica mostra-se a mais prevalente, responsável por aproximadamente 70% das perdas (Harmon, 1998). Em média para cada caso clínico deve haver 15 a 40 casos subclínicos (Philpot, 2002).

Os testes de diagnósticos da mastite podem ser realizados no campo ou laboratório: os de campo são mais simples e podem ser realizados diariamente no momento da ordenha, destacando-se a caneca telada e o CMT (*California Mastitis Test*). O CMT é um método indireto, que avalia a quantidade de células somáticas do leite, sob a ação de um detergente aniônico capaz de romper a membrana celular. A formação do gel ocorre pela interação dos ácidos nucléicos do leite com o detergente (Rosemberg, 1993). É um método de triagem barato, de fácil execução e interpretação, capaz de detectar mastite subclínica. Os testes laboratoriais são a prova de whiteside, Contagem de células somáticas, cultura e antibiograma (Ribeiro Jr. et al., 2008).

Langenegger et al. (1981) ao estudar 70 pares de quartos mamários opostos concluiu que os quartos com mastite subclínica diagnosticada pelo CMT produziam 25,4% menos leite do que os quartos normais. A reação positiva ao CMT foi relacionada com o exame bacteriológico, onde se constatou que a intensidade com que a mastite subclínica afeta a produção de leite, em quantidade e qualidade, variou de acordo com a natureza dos agentes etiológicos envolvidos, com duração das infecções e propagação da infecção no rebanho.

Segundo Figueiredo (1995), os resultados negativos ao CMT são plenamente confiáveis e muito úteis nos trabalhos de campo. Entretanto Costa et al. (2001) discordam quanto a negatividade ao teste em relação à presença de agentes microbianos, caracterizando os animais portadores. Segundo este autor, o animal portador não apresenta reação positiva ao teste de CMT, entretanto pode apresentar resultado positivo ao exame microbiológico. Em estudo realizado com 8.116 amostras de quartos mamários negativos, observou-se que em 45,1% das amostras foram isolados microrganismos contagiosos. De forma contrária, Ribeiro et al. (2011) ao avaliar 154 vacas Jersey observaram que 70,56% de 316 quartos mamários reagentes ao CMT, não apresentaram crescimento microbiológico.

2.1.4 Contagem de Células Somáticas (CCS) x Legislação

As células somáticas (CS) são as células presentes no leite, que podem ser do tipo epitelial ou de defesa. As epiteliais são oriundas da descamação normal do tecido secretor e de revestimento da glândula. As células de defesa são principalmente os leucócitos, que migram do sangue para o úbere quando sofre uma agressão (Fonseca & Santos, 2000).

A Contagem de Células Somáticas (CCS) do leite de uma vaca indica de maneira quantitativa o grau de infecção da glândula mamária. Já a CCS do leite do tanque de resfriamento do rebanho indica a incidência média de mastite no rebanho. O entendimento da dinâmica da CCS de tanques é um importante passo para a melhoria da qualidade do leite (Machado; Pereira; Sarríes, 2000).

A CCS, que apresenta correlação positiva com a presença de mastite (Coffey et al., 1986; Emanuelson et al., 1988; Pösö & Mantysaari, 1996; Rupp & Boichard, 1999), passou a ser um dos principais métodos utilizados no diagnóstico e controle da infecção.

Além das infecções intramamárias, outros fatores que podem interferir na CCS são a época do ano, raça, estágio de lactação, produção de leite, número de lactações, estresse causado por deficiências no manejo, problemas nutricionais, efeito rebanho, condições climáticas e doenças intercorrentes (Müller, 2002).

No âmbito internacional, a CCS no leite bovino é usada como indicadora da qualidade do leite, para controle da mastite e, indiretamente, como indicadora da produção higiênica do leite (Wickström et al., 2009). Sendo assim, muitos países têm estabelecido limites máximos de CCS do leite de rebanho para assegurar a higiene e qualidade do leite. Os Estados Unidos e

Canadá estabeleceram um limite de 500.000 e 750.000cél/mL, respectivamente, enquanto na União Européia, Nova Zelândia e Austrália, o valor é de 400.000cél/mL (Philpot, 1998; Santos, 2002).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) fixou por meio da Instrução Normativa nº51 (IN51), de 18 de setembro de 2002, os requisitos mínimos de qualidade para o leite cru nas propriedades rurais, incluindo pela primeira vez, limites máximos para CCS. Esta norma estabeleceu o limite máximo legal de 1.000.000cél/mL, de 2005 a 2008, para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, e de 2007 a 2010, para as regiões Norte e Nordeste. A partir de 2008 o valor máximo estabelecido foi de 750.000cél/mL, e em 2011 a intenção inicialmente estabelecida foi de 400.000cél/mL, para a região Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Brasil, 2002). Dessa forma, em aproximadamente dez anos, o leite produzido no Brasil atenderia às exigências normativas atuais da União Européia e países como Nova Zelândia e Austrália.

Porém, em julho de 2011, tendo em vista que parte dos produtores ainda não conseguiam atingir o padrão máximo estabelecido, a redução da CCS prevista pela IN51, foi prorrogada por mais seis meses (Instrução Normativa nº 32) (Brasil, 2011a). Em dezembro de 2011 o MAPA publicou a Instrução Normativa nº 62 (IN62) que altera a IN51. A IN62 estabelece um novo cronograma para os padrões de qualidade, onde os limites para CCS a partir de 2012 são de 600.000cél/mL para as regiões Sul e Sudeste e a partir de 2013 para as regiões Nordeste e Norte. A partir de julho de 2014, o limite máximo será de 500.000 cél/mL (Brasil, 2011b). Apesar da mudança na legislação, a preocupação com a qualidade do leite permanece e os prejuízos da mastite refletem em toda a cadeia produtiva do leite.

2.1.5 Alterações no leite

A mastite determina mudanças nas concentrações dos principais componentes do leite, como proteína, gordura, lactose e outras substâncias como minerais e enzimas (Tabela 1). Os principais mecanismos pelos quais ocorre alteração nos níveis dos componentes do leite são: lesão às células epiteliais produtoras de leite, que pode resultar em alteração da concentração de lactose, proteína e gordura, e aumento da permeabilidade vascular, que determina o aumento da passagem de substâncias do sangue para o leite, tais como sódio, cloro, imunoglobulinas e outras proteínas (Pales et al., 2005).

Tabela 1. Mudanças na composição do leite associadas com elevada CCS

Componente do leite	CCSx10 ³ cél/mL				Alteração e motivo
	< 100	< 250	500-1000	> 1000	
Lactose	4,90	4,74	4,60	4,21	Redução (g/100mL)
Caseína (total)	2,81	2,79	2,65	2,25	
Gordura	3,74	3,69	3,51	3,13	
Proteínas séricas (total)	0,81	0,82	1,10	1,31	Aumento. Passagem a partir do sangue
Soroalbuminas	0,02	0,15	0,23	0,35	
Imunoglobulinas	0,12	0,14	0,26	0,51	
Cloro	0,091	0,096	0,121	0,147	
Sódio	0,057	0,062	0,091	0,105	
Potássio	0,173	0,180	0,135	0,157	
pH	6,6	6,6	6,8	6,9	

Fonte: MÜLLER (2002).

Segundo Schäellibaum (2000), a relação direta entre CCS e concentração de componentes do leite é modificada pela permeabilidade dos capilares sanguíneos e a redução da capacidade de síntese secretora das células.

Ventura et al. (2006) avaliando a CCS e seus efeitos nos constituintes do leite, verificou que quando ocorria um aumento nos valores de CCS acarretava em um acréscimo mínimo da porcentagem de gordura ($r=0,0300$). Da mesma forma, Miller et al. (1983), ao avaliarem o leite individualmente, e Mitchell et al. (1986), ao usarem o leite do tanque de expansão, verificaram aumento da porcentagem de gordura no leite com alta CCS (acima de 500.000cél/mL). Essa elevação pode ser justificada pela infecção da glândula mamária que reduz a produção de leite e acaba concentrando a gordura.

Entretanto, não há um consenso entre os autores com relação à variação no teor de gordura. Cunha et al. (2008), analisando o leite de vacas da raça Holandês de propriedades integrantes do programa de controle leiteiro da Associação de Criadores de Gado Holandês de Minas Gerais, observaram uma redução progressiva nas porcentagens de gordura e proteína (-0,29 e -0,34, respectivamente), coincidindo com os resultados de Schultz et al. (1977) que observaram variações negativas nas porcentagens de gordura relacionadas com a produção de leite. Mudanças bruscas são notáveis apenas em casos de CCS muito elevada, em níveis próximos a 2.000.000cél/mL de leite (Kitchen, 1981).

Bueno et al. (2005), observando os teores médios de gordura em diferentes intervalos da CCS, constataram que praticamente não houve variação entre os diferentes intervalos, ao

contrário de Harmon (1994) e Auld et al. (1995), que mencionaram a ocorrência de redução conforme aumento da CCS.

Referente à proteína do leite, Auld et al. (1998) mencionam que não há consenso na literatura em relação ao aumento da porcentagem de proteína total no leite de animais com alta CCS, porque ocorre redução na síntese de caseína e concomitante passagem de proteínas séricas para o leite. Segundo Schäellibaum (2000), com a diminuição da capacidade de síntese é possível verificar alterações no teor de proteínas do leite, com pouca variação nas proteínas totais. Ocorre diminuição das proteínas sintetizadas na glândula mamária (α e β caseínas) e elevação daquelas provenientes da corrente sanguínea (albumina sérica e imunoglobulinas) (Kitchen, 1981).

Segundo Kitchen (1981) e Munro et al. (1984), o aumento da concentração de proteínas séricas no leite de vacas com mastite subclínica pode ser atribuído ao aumento na permeabilidade vascular em consequência do processo inflamatório. Os pesquisadores observaram decréscimo na concentração de caseína durante a mastite, atribuído à redução na síntese e secreção da caseína e ao aumento da degradação em função do aumento da atividade das proteinases bacterianas, dos leucócitos e do sangue. De acordo com Harmon (1994), a concentração de caseína é o componente que sofre maior redução das proteínas totais.

Segundo Auld et al. (1998), em função do grande número de variáveis, não há consenso na literatura sobre as alterações na concentração de proteína total e gordura.

Um fator importante causado pela mastite subclínica é a redução no teor de lactose. Sabe-se que a lactose é o componente do leite com maior capacidade osmótica, por isso, a diminuição da lactose resulta na redução da produção de leite. Além disso, alguns microrganismos presentes nas infecções subclínicas podem causar obstrução de ductos na glândula mamária (Auld et al. 1998).

A redução na porcentagem de lactose pode ser explicada pela destruição de tecido secretor, à perda de lactose da glândula para a corrente sanguínea decorrente do aumento da permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue e à utilização da lactose pelos patógenos intramamários (Auld et al. 1995; Kitchen, 1981; Shuster, 1991).

Rajcevic et al. (2003) observaram correlação negativa entre Log de CCS e porcentagem de lactose ($r=-0,423$). Bueno et al. (2005) também encontraram uma redução significativa nos teores de lactose com o aumento da CCS (acima de 1.000.000cél/mL). Essa diferença representa uma redução de 5,22% e está em acordo com a redução descrita por Brito

& Dias (1998). Machado et al. (2000) e Silva et al. (2000) também observaram redução da concentração de lactose quando a CCS aumentou.

Portanto, pode-se inferir que a lactose é o componente do leite que sofre maior redução devido à elevação da CCS (Bueno et al., 2005).

De acordo com Machado et al. (2000) e Silva et al. (2000), não foi encontrado diferença significativa no percentual de sólidos totais. Essa ausência de significância provavelmente decorreu do fato de que os autores verificaram, concomitantemente, aumento da concentração de gordura, o que poderia mascarar o efeito da redução dos teores de lactose sobre a concentração de sólidos totais.

Para Bueno et al. (2005), a concentração de sólidos totais reduziu significativamente conforme a CCS aumentou, o que está em acordo com a redução na literatura citada por Brito & Dias (1998).

Inúmeros estudos demonstram as alterações da composição química causada pela mastite através da avaliação do leite individual ou de tanque. Porém, os trabalhos que relacionam essas alterações em diferentes quartos mamários são poucos e ainda não se encontrou um consenso entre os autores.

Forsbäck et al. (2010), ao avaliar mudanças na qualidade do leite em diferentes quartos mamários de vacas com baixa a moderada contagem de células somáticas, observaram que os grupos dos quartos com maior CCS (acima de 100.000cél/mL) apresentaram concentrações maiores de proteína e gordura e concentrações menores de lactose quando comparados com o grupo com baixa CCS (50.000cél/mL), porém sem diferença significativa entre os grupos.

Outro estudo realizado por Forsbäck et al. (2009), avaliando a composição e produção de leite de quartos mamários individuais de acordo com três diferentes grupos de CCS, verificou que o teor de caseína ($P=0,045$), lactose ($P=0,004$) e a produção de leite ($P=0,016$) foram significativamente menores no grupo 3 (acima de 300.000cél/mL) quando comparado ao grupo 1 (<100.000 cél/mL). A porcentagem de lactose ($P=0,042$) foi significativamente menor e a produção de leite ($P=0,058$) mostrou uma tendência de redução no grupo 3 quando comparado ao grupo 2 (>100.000 a 300.000cél/mL). A CCS ($P=0,001$) foi, como esperado, significativamente diferente nos três grupos, e não se encontrou diferença nos teores de gordura e proteína entre os grupos. Estes resultados mostram que o leite de quartos mamários afetados com mastite sofrem mudanças na composição, mas cálculos de separação simulada

indicam que as mudanças de composição em massa do tanque de leite são pequenas. Os autores concluíram que o efeito da separação de leite de quartos mamários individuais no volume do tanque de leite precisa ser mais estudado.

A mastite continua sendo um problema sério mesmo no atual panorama da pecuária nacional e está enraizada em fatores culturais, regionais e educacionais. Assim, num país tentando alcançar patamares de superpotência esta é uma das moléstias que se deve combater a fim de proporcionar à população um alimento rico e de qualidade (Dias, 2007).

2.2 Leite Instável Não Ácido

2.2.1 Conceito e ocorrência

O leite constitui a matéria-prima para as indústrias de laticínios, apresentando grande valor para a nutrição humana merecendo atenção especial e um controle de qualidade adequado (Lopes, 2008).

O Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite do MAPA (PNMQL), através da IN62 estabelece normas de produção, identidade e qualidade do leite, visando adequar as exigências mínimas de qualidade do leite cru e industrializado previstas na legislação internacional (Brasil, 2011b).

Há várias décadas existem dados sobre alterações nas características físico-químicas do leite por causas não totalmente esclarecidas. O aparecimento de leite que reage positivamente à prova do álcool, sem estar ácido nem ser originário de vacas com mastite, é um problema prático que acomete com frequência rebanhos leiteiros e/ou indústrias lácteas (Ponce, 1999).

Os primeiros registros de precipitação de leite cru a prova do álcool ocorreram em Utrecht, na Holanda, em 1930, tendo sido relacionada esta instabilidade da proteína ao calor e ao etanol, com a concentração de íons de cálcio do leite (Mitamura, 1937 *apud* Oliveira & Tim, 2007).

O leite instável não ácido (LINA) é um problema que acomete rebanhos leiteiros e que se caracteriza por apresentar alterações nas características físico-químicas do leite. A principal alteração identificada é a perda da estabilidade da caseína ao teste do álcool, resultando em precipitação positiva, sem haver acidez acima de 18°D (Zanela et al., 2004a).

O teste do álcool, ou alizarol, é a prova para avaliação da estabilidade do leite realizada nas propriedades rurais antes do recebimento do leite pelo transportador e novamente é realizada na plataforma de recebimento do leite nas indústrias (Fischer et al, 2011a). O leite produzido deve apresentar resultado negativo na prova do álcool/alizarol, ou seja, não deve formar grumos quando misturado a igual volume de solução de etanol em concentrações pré-estabelecidas, de acordo com a IN62, no mínimo 72% (v/v), antes de ser coletado para o tanque isotérmico do caminhão transportador. Entretanto, a ocorrência de leite sem acidez adquirida, com baixa contagem bacteriana, positivo na prova do álcool tem levado à rejeição de leite com boa qualidade (Oliveira & Timm, 2007).

Uma avaliação rápida, de baixo custo e confiável do leite cru nas propriedades rurais e na plataforma de recebimento do leite nas indústrias é necessária em função do elevado número de produtores rurais em cada linha de coleta do leite, da ampla variação na qualidade do leite e no seu impacto sobre o processamento nas indústrias e a qualidade dos derivados lácteos. A indústria necessita descartar amostras com problemas de acidez elevada e conhecer a estabilidade do leite recebido na plataforma, a fim de possibilitar a escolha do destino da matéria prima recebida sem causar prejuízos ao processamento (Fischer et al., 2011b).

O leite que apresenta precipitação no teste do álcool é considerado instável, embora alguns estudos (Molina et al., 2001; Negri et al., 2001; Machado, 2010), questionem essa relação entre estabilidade na prova do álcool e térmica.

Resultados positivos ao teste do álcool (precipitação) (Figura 1) podem ocorrer devido à redução de pH, pela fermentação da lactose até a produção de ácido láctico, resultando na instabilidade da proteína. Microrganismos mesófilos são responsáveis por essa fermentação e ocorrem em situações de falta de higiene e de refrigeração na produção de leite. No caso do LINA, a perda da estabilidade não está relacionada à contaminação bacteriana e não é causada pela acidez elevada (Zanela et al., 2006a).

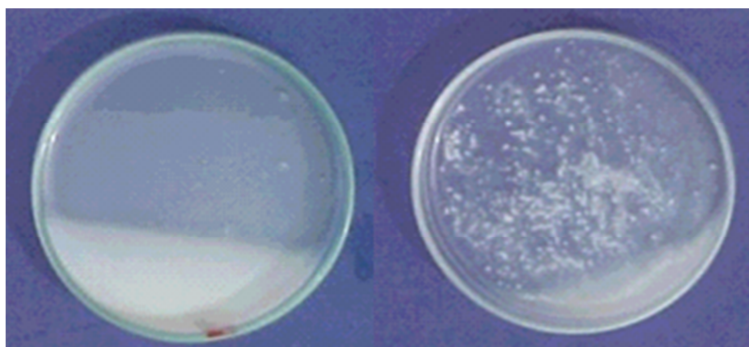


Figura 1 – Reação negativa (esquerda) e positiva (direita) ao teste do álcool. Fonte: Zanela (2006).

A acidez não é o único fator que provoca instabilidade da caseína. Processos inflamatórios na glândula mamária aumentam a concentração de plasmina no leite, cuja ação hidrolítica sobre a caseína leva à diminuição da estabilidade. Embora as causas não estejam ainda bem esclarecidas, diversos autores têm registrado a ocorrência de instabilidade da caseína em leites com acidez normal e baixa contagem de células somáticas (CCS) (Oliveira & Timm, 2006).

Alterações dessa natureza foram relatadas em diferentes países como no Irã (Sobhani et al., 1998), em Cuba (Ponce, 1999), no Uruguai (Barros et al., 1999), Argentina (Negri et al., 2001), Japão (Yoshida, 1980), Itália (Pecorari et al., 1984) e na Bolívia (Alderson, 2000). No Brasil, foram verificadas em vários estados: no Rio Grande do Sul (Zanela, 2004b; Marques, 2004; Machado, 2010), Rio de Janeiro (Donatele et al., 2003), São Paulo (Lopes, 2008; Roma Junior, 2008 e Oliveira et al., 2011), Santa Catarina (Abreu et al., 2011) e em Pernambuco (Pacheco, 2011).

Em Cuba, Ponce (1999) verificou que a maioria das amostras instáveis ao álcool 70°GL apresentou acidez titulável menor de 13°D, denominando essa alteração no leite como Síndrome do Leite Anormal (SILA). De acordo com Ponce & Hernández (2001), amostras alcalinas (acidez inferior a 14°D) podem ser oriundas de rebanhos com mastite e poderiam ser instáveis ao álcool por causa do processo inflamatório.

Segundo Ribeiro et al. (2006), a perda da estabilidade da caseína causa significativos prejuízos econômico-financeiros a toda cadeia produtiva, pois o leite é rejeitado ou subvalorizado pela indústria, mesmo apresentando níveis de acidez considerados normais pelos padrões do MAPA, sendo deixado na maioria das vezes, na propriedade rural.

Pesquisas, conduzidas no Rio Grande do Sul, mostram que uma quantidade expressiva das amostras de leite que precipitam na prova do álcool não é ácida. Cerca de 50% das amostras de leite coletadas dos produtores foi instável na prova do álcool 76% (v/v), mas apresentou acidez titulável entre 14 e 18°D (Abreu, 2008).

Zanela (2004b) ao analisar 2.396 amostras de leites de tanques durante o período de setembro de 2002 a agosto de 2003, em Panambi/RS, observou que a ocorrência mais alta de leite instável não ácido (LINA), utilizando o álcool 76°GL foi encontrada nos meses de verão, com uma média de 69,68%.

Em uma análise realizada em um laticínio no município de Pelotas, RS, foram analisadas 9.892 amostras de leite de tanque, de abril de 2002 a setembro de 2003, referente a positividade ao álcool 76°GL e acidez titulável. A ocorrência média do LINA foi de 58%. Segundo Marques et al. (2007), a ocorrência de LINA durante esse período foi mais elevada no outono e início do inverno, o que pode estar associada à redução do desenvolvimento das forrageiras de inverno. Os autores observaram, também, uma menor incidência do LINA na primavera e início do verão, fato que pode estar associado ao aumento da oferta de forragem conservada na forma de silagem e de pastagens de clima temperado.

Outra importante pesquisa foi realizada no Sul do Brasil, na bacia leiteira de Pelotas, RS, onde 26.032 amostras de leite foram analisadas (cerca de 730 amostras mensais), provenientes de unidades de produção leiteira, nos meses de abril de 2002 a março de 2005 (Fischer, 2005). Das amostras analisadas, foram utilizadas para análise estatística 18.662 amostras de leite, sendo 8.230 (44,1%) positivas ao LINA (Figura 2).

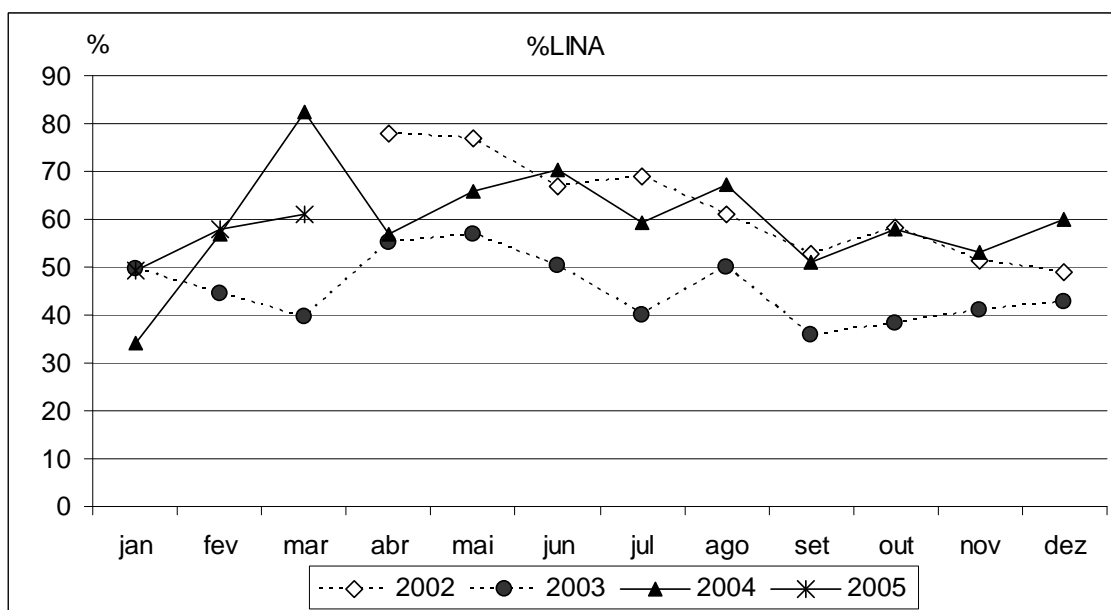


Figura 2. Prevalência do LINA na região sul do RS, nos meses de abril de 2002 a março de 2005.

Outro aspecto constatado é que o LINA é mais prevalente em estabelecimentos rurais com pequena produção leiteira, provavelmente associada às condições de alimentação e manejo desfavoráveis (Zanela et al., 2009; Machado, 2010). Dessa forma, há um aspecto social nessa situação, em que pode ocorrer maior rejeição pela indústria do leite proveniente dessas propriedades. O entendimento sobre a concentração de álcool mais adequada no teste e

como evitar os problemas de estabilidade poderia favorecer esses produtores (Fischer et al., 2011a).

De acordo com Fischer et al. (2011a), os impactos do LINA sobre a cadeia produtiva poderiam ser didaticamente divididos naqueles sobre o produtor de leite, indústria e consumidor. Aparentemente o impacto mais negativo incide sobre o produtor de leite, pois o mesmo corre o risco de ter seu leite rejeitado pela indústria e, na maioria das vezes, desconhece as causas e como evitar ou minorar o problema. Como produtores e técnicos ainda pensam que a precipitação do leite no teste do álcool ocorre se o leite estiver ácido, e como na maioria das vezes, o leite apresenta acidez normal e não coagula no teste da fervura, isto gera dúvidas e desconfiança por parte dos produtores em relação às indústrias.

2.2.2 Causas do LINA

Segundo Barros et al. (2001) tem sido constatada certa influência da época do ano sobre a estabilidade do leite na prova do álcool, sendo a alteração, aparentemente mais frequente nos meses de outono, na mudança de estação de inverno para a primavera e também relacionada com períodos de seca.

Conforme Marques et al. (2007), resultados obtidos em pesquisa realizada em Pelotas, RS, assemelham-se a Barros et al. (2001), onde verificaram certa influência da época do ano, obtendo uma frequência de leite com problemas de estabilidade ao etanol mais elevada no outono. Justifica-se que o produtor do Rio Grande do Sul tem, como maior fator de estrangulamento da produção, a falta de reserva alimentar, volume e qualidade, nos meses de março e abril de cada ano. Neste trabalho, concluiu-se que o LINA apresenta elevada ocorrência na bacia leiteira de Pelotas, embora os valores variem durante o ano, e afeta a composição do leite, com diminuição dos teores de proteína e lactose, mas aumento do teor de gordura. Todavia, a maior parte do leite instável não é ácido nem altera de forma expressiva a composição química do leite que apresenta valores considerados normais.

Um experimento realizado por Zanela et al. (2006), que teve como objetivo avaliar o efeito da restrição alimentar na incidência de leite instável não ácido e na composição do leite, para 8 vacas Jersey em lactação e confinadas, foram fornecidos dois tratamentos com 100 e 60% das exigências nutricionais. Os autores observaram que a restrição alimentar aumentou a ocorrência de LINA e diminuiu a produção de leite e a qualidade total dos componentes

produzidos, entretanto, não alterou os teores dos componentes lácteos. Também pode-se concluir que a etiologia do LINA não se encontra associada apenas a fatores nutricionais, mas pode estar associada também a fatores genéticos.

Apesar de se identificarem fatores relacionados ao manejo como subnutrição (Marques et al., 2010b; Fruscalso, 2007; Zanela et al., 2006), efeitos da suplementação sobre rebanhos com elevada prevalência de instabilidade (Marques et al., 2010b; Abreu, 2008; Zanela et al., 2006b), alterações digestivas (Ponce & Hernández, 2001), metabólicas e fatores relacionados aos animais como estágio de lactação (Marques et al., 2010a), existe uma expressiva variação durante o ano da composição e da estabilidade térmica do leite, não inteiramente relacionada a fatores identificados, e portanto não controlados pelos produtores ou pesquisadores.

Para Ribeiro et al. (2006), no Brasil, a incidência do LINA ainda necessita de diagnósticos devido à falta de trabalhos de pesquisa. As causas do LINA ainda não estão totalmente esclarecidas, entretanto sabe-se que o LINA é um problema multifatorial.

2.2.3 Alterações no leite

O leite bovino é uma fonte de alimentação que consiste de água e compostos orgânicos e inorgânicos essenciais ao bom desenvolvimento do corpo humano (Ceballos et al., 2009). O valor nutricional e, portanto, a qualidade do leite bovino, é o resultado de uma complexa interação fisiológica que ocorre no animal para produzir um fluido composto de uma série de nutrientes sintetizados a partir de precursores do metabolismo e da alimentação (Clegg et al., 2001; Baldi et al., 2007).

Vários fatores interferem na produção e no teor dos componentes do leite, entre eles: fator genético (espécie, raça dos animais, individualidade animal), fatores intrínsecos (idade, estágio de lactação, número de lactações), fatores nutricionais (tipo de alimento e disponibilidade, forma de conservação, adequação da dieta às exigências do animal), fatores ambientais (condições ambientais, estresse, estação do ano, manejo), fatores extrínsecos (sanidade animal, contaminação bacteriana), etc. (Zanela et al., 2011).

Quando se compara a composição do leite normal (estável) com o LINA, constata-se diferenças estatísticas, porém de pequena magnitude. Conforme revisão de Zanela et al. (2011) elas estão demonstradas nas Tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2. Variação nos componentes do leite instável em relação ao leite normal por diversos autores (amostras de rebanho).

Autor/Ano	Lopes	Marques	Negri	Oliveira & Timm	Roma Jr.	Zanela
Componente (%)	2008	2004	2002	2006	2008	2009
Gordura	↑	↑	→	↑	→	→
Proteína Bruta	↓	↓	→	→	→	↓
Caseína	→	na	↓	na	na	na
Lactose	↓	↓	→	↓	↓	↓
Sólidos totais	→	→	→	→	→	↓
Sólidos desengord.	↓	na	↓	na	↓	↓
% álcool	72 e 78* (Bronopol)	76	72 e 78*	70	78 (Bronopol)	76

legenda: ↑ aumento → sem dif. ↓ diminuição
na = não analisado *leite instável (+álcool 72%) e leite normal (neg. álcool 78%)

Fonte: Zanela et al. (2011).

A Tabela 2 apresenta os dados de leite de rebanhos avaliados por diferentes autores. A gordura apresentou aumento no leite instável em relação ao leite normal, em 50% dos trabalhos. A proteína bruta não variou ou apresentou redução. Apenas em um trabalho o teor de caseína se apresentou reduzido. A maior parte dos autores encontrou menores teores de lactose e sólidos desengordurados no leite instável, comparado ao leite normal (Zanela et al., 2011).

Tabela 3. Variação nos componentes do leite instável em relação ao leite normal por diversos autores (amostras de vacas individuais).

Autor/Ano	Barros	Chavez et al.	Ponce & Hernandez	Roma Jr.	Sobhani
Componente (%)	2001	2004	2001	2008	1998
Gordura	↑	→	→	→	→
Proteína Bruta	↑	→	↓	→	→
Caseína	na	↓	↓	na	na
Lactose	↓	→	↓	↓	↓
Sólidos totais	↑	na	↓	na	→
Sólidos desengord.	↑	↓	↓	→	→
% álcool	70	72 e 78*	75	78	-

legenda: ↑ aumento → sem dif. ↓ diminuição na = não analisado
*leite instável (+álcool 72%) e leite normal (neg. álcool 78%)

Fonte: Zanela et al. (2011).

Segundo Zanela et al. (2011), na Tabela 3 encontram-se os resultados relativos a amostras de leite de vacas individuais. Neste caso, o único consenso entre os autores é relativo à redução dos teores de lactose do leite instável com relação ao leite normal.

A Tabela 4 demonstra a variação dos minerais no leite instável em relação ao leite normal, onde se verifica que poucos trabalhos estudaram esses componentes e que a maioria dos resultados não se encontrou mudanças significativas.

Tabela 4. Variação nos minerais do leite instável em relação ao leite normal por diversos autores (amostras de vacas individuais).

Autor/Ano	Chavez et al. 2004	Negri 2002	Fruscalso 2007	Machado 2010
Sódio	↑	↑	→	→
Cloro	↑	↑	na	na
Potássio	↑	↑	→	→
Fósforo	→	→	→	→
Mg	→	→	→	→
Citrato	→	→	na	na
Ca iônico	→	→	-	-
Ca total	→	→	→	→

legenda: ↑ aumento
 ↓ diminuição → sem dif.

Fonte: Zanela et al. (2011).

De forma geral, o leite instável apresenta composição química diferente do leite normal, principalmente no que se refere à menores teores de lactose e sólidos desengordurados. Com relação aos minerais, o leite instável apresentou teores mais elevados de sódio, cloro e potássio. Entretanto, nem sempre as variações foram significativas nos diferentes trabalhos (Zanela et al., 2011).

Conforme Fischer et al. (2011a), as indústrias se ressentem da reduzida estabilidade térmica e desconhecem muitas vezes as causas, medidas de prevenção e os pressupostos em que se baseiam os testes de estabilidade. Todavia, em função do que já se sabe, pode-se verificar que a composição química do LINA e do leite estável é semelhante, ainda que o LINA efetivamente possa apresentar menores teores de proteína, lactose e eventualmente gordura, o que poderia resultar em rendimentos menores na confecção dos lácteos, embora existam relativamente poucos resultados sobre isto e portanto necessidade em se pesquisar mais sobre o assunto. Há autores que reportam menores rendimentos e vida de prateleira mais curta dos produtos fabricados com leite instável, enquanto outros não observaram diferenças significativas com iogurte (Ribeiro et al., 2006), queijo (Costabel et al., 2010; Fischer, 2010a).

Todavia o LINA pode ser usado para a produção de leite pasteurizado, e o seu uso pode reduzir a capacidade ociosa das indústrias.

2.2.4 Relação LINA x CCS

O leite proveniente de animal com úbere lesado (irritação mecânica) ou com processo infeccioso instalado poderá apresentar reação positiva ao teste do álcool, ainda que a acidez titulável possa situar-se dentro da faixa considerada normal ou aceitável. Por outro lado, é preciso evitar conclusões apressadas acerca dos resultados obtidos com a prova do álcool. Algumas vezes são encontradas amostras que coagulam frente a uma mesma solução de álcool, enquanto apresentam diferentes níveis de acidez titulável, estando os demais parâmetros normais. Parece que, em tais casos, a composição biológica do leite tem maior transcendência do que a acidez titulável, e que a variedade dos microrganismos presentes importa mais que a sua quantidade (Velloso, 1998).

Fischer (2010a), cita que a sanidade da glândula mamária (mastite subclínica) aparentemente não exerce efeitos marcantes sobre a estabilidade do leite no teste do álcool. Porém, ainda existem dúvidas até que ponto o teste do álcool consegue identificar leites mastíticos (Chavez et al., 2004).

Donatele et al. (2003) sugerem não haver relação entre a positividade do leite ao teste do alizarol 72% e o número de células somáticas. No referido trabalho, 61,67% das amostras positivas ao alizarol apresentaram células somáticas inferior a 300.000cél/mL de leite. Esses autores também não encontraram envolvimento de bactérias na causa da instabilidade do leite *in natura* no teste do alizarol 72%.

Conforme Zanela (2004), as amostras de leite normais apresentaram distribuição similar ao LINA, sem encontrar diferença significativa nos diferentes intervalos de células somáticas, sendo que a maior porcentagem de amostras ficou abaixo dos limites de 300.000cél/mL (Tabela 5).

Negri et al. (2001) encontraram menor CCS no leite instável do que no leite normal e não foram detectadas diferenças significativas na contagem bacteriana total.

Segundo Oliveira et al. (2011), a contagem de células somáticas foi significativamente superior ($P < 0,05$) no leite instável não ácido, quando comparada com o valor médio obtido para o leite estável, independentemente da época do ano, em estudo

realizado com amostras de propriedades leiteiras fornecedoras de leite para um laticínio em São Paulo (SP), nos períodos chuvoso e seco do ano de 2007, totalizando 451 amostras.

Tabela 5. Distribuição das amostras de leite normal e do LINA nos diferentes intervalos de células somáticas

Intervalo de células somáticas x 1.000 cél/mL	Leite Normal (%)	LINA (%)
Menos 300	32,68	31,77
300 – 500	26,54	23,83
500 –1.000	27,19	28,67
Mais de 1.000	13,59	15,73
Total	100	100

Fonte: Zanela (2004).

Da mesma forma, Marques (2004), encontrou diferença significativa quando comparado leite normal e LINA. Após pesquisa realizada na região de Pelotas, RS, no período de abril de 2002 a setembro de 2003, totalizando 9.892 amostras avaliadas, verificou que o LINA apresenta CCS mais elevada (463.000cél/mL) que o leite normal (401.000cél/mL).

De acordo com dados citados por diferentes autores, até o momento não se encontrou um consenso referente à relação da contagem de células somáticas com o LINA e não foi encontrado trabalhos que relacionam a CCS em diferentes quartos mamários com a estabilidade do leite.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os animais foram selecionados a partir dos rebanhos leiteiros do Sistema de Desenvolvimento em Pecuária Leiteira (SISPEL) da Embrapa Clima Temperado, do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG) e de uma propriedade leiteira particular, situadas em Pelotas – RS, Brasil. Para seleção dos animais utilizou-se como critério de inclusão o teste do *California Mastitis Test* (CMT), sendo selecionadas as vacas que apresentassem pelo menos um quarto mamário normal (negativo ao teste) e os demais quartos com mastite subclínica e como critério de exclusão animais com mastite clínica ou com mais de 300 dias de lactação. Foram avaliadas 9 vacas da raça Holandês e 12 vacas da Jersey no período de maio a setembro de 2011, sendo registradas as informações referentes à produção diária de leite.

3.2 Coleta de amostras

Após a seleção dos animais foi realizada a desinfecção de todos os tetos com algodão previamente umedecido com álcool 70°GL e coletada uma amostra de leite individual por quarto, com aproximadamente 20mL em tubos estéreis devidamente identificados. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de bacteriologia e saúde populacional do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) para análise microbiológica e identificação dos agentes.

A coleta foi realizada durante quatro dias consecutivos buscando-se, dessa forma reduzir a possível variabilidade diária da composição do leite. As vacas selecionadas foram ordenhadas com uma ordenhadeira especial de quartos individuais marca Miele® (Figura 3), sendo os frascos da ordenhadeira lavados com água corrente entre a ordenha dos animais. As amostras de leite foram coletadas dos quartos mamários separadamente (ordenha da manhã e da tarde) em frascos de 250mL, limpos e higienizados, após prévia homogeneização, sendo acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo, enviadas ao laboratório e armazenadas em geladeira. Após a refrigeração do leite foi realizada a mistura das amostras (manhã e tarde) formando uma amostra composta por quarto, por dia.

Uma alíquota de cada quarto mamário de cada dia foi encaminhada para o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Clima Temperado, para análise da composição química e CCS do leite.



Figura 3 – Ordenhadeira especial de quartos mamários individuais.

3.3 Análises realizadas

3.3.1 Teste do *California Mastitis Test* (CMT)

Após higienização, os primeiros jatos de cada quarto foram utilizados para a realização do teste da caneca de fundo preto para identificação de mastite clínica e o CMT (*California Mastitis Test*) para identificação de mastite subclínica, sendo utilizando o detergente comercial, de acordo com a metodologia de Langenegger et al. (1970).

A interpretação do CMT foi realizada da seguinte maneira: score 0 (sem presença de reação entre o reagente e o leite) indica uma reação completamente negativa; 1: reação fracamente positiva (+); 2: reação positiva (++) e; 3: reação fortemente positiva (+++) conforme Tronco (1997).

3.3.2 Análise microbiológica

A análise foi realizada a partir das amostras de leite enviadas ao Laboratório de Bacteriologia e Saúde Populacional da UFPEL, sendo semeadas em placas de Petry com meio de cultura Ágar sangue contendo 5% de sangue ovino desfibrinado e, incubadas em estufa bacteriológica a temperatura constante de 37°C, durante 24-48 horas.

As colônias resultantes dos crescimentos bacterianos foram identificadas segundo Hogan et al. (1999). As colônias foram estudadas de acordo com sua morfologia macroscópica, levando em consideração o número de colônias, tamanho, coloração e a viscosidade e também a presença de hemólise na placa (Figura 4). No momento da fixação em lâminas foi realizado o teste da catalase, importante para a distinção de bactérias que possam se assemelhar morfologicamente à microscopia óptica, como os gêneros *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* Essas lâminas foram utilizadas para a realização da coloração de Gram, que tem por objetivo a análise microscópica, que permitiu o estudo da morfologia e arranjos bacterianos e a divisão em grupos Gram positivos e negativos. De acordo com os resultados encontrados em microscopia óptica foi possível a realização de provas bioquímicas para identificação da espécie bacteriana.



Figura 4 – Cultura em ágar-sangue de *Staphylococcus aureus*.

As bactérias foram caracterizadas segundo Krieg & Holt (1994), sendo os cocos Gram positivos, arranjados como “cacho de uva”, positivos ao teste da catalase e colônias esbranquiçadas com crescimento em 24 horas, foram considerados como gênero *Staphylococcus* e foi realizado, nessas cepas, o teste da coagulase para a diferenciação em dois grandes grupos de estafilococos. Aquelas cepas que apresentaram coagulação de plasma de cavalo, após 24 horas incubadas em estufa a 37°C, foram consideradas positivas ao teste.

Os testes bioquímicos realizados com os estafilococos foram redução do manitol e maltose e VP (Prova de Voges-Proskauer), além da formação e do tipo de hemólise em placa.

Cocos Gram positivos, arrançados em forma de corrente ou “colar de pérolas”, negativos ao teste da catalase, com colônias pequenas e translúcidas com crescimento em aproximadamente 24 horas foram considerados como gênero *Streptococcus*. Provas bioquímicas foram realizadas para diferenciação de espécie. As provas de CAMP, esculina, manitol e salicina foram realizadas e as placas e tubos incubados, por 24 horas em estufa a 37°C, para posterior leitura. A observação do padrão de hemólise também foi considerada.

Bactérias Gram positivas, com morfologia filamentosa e arrançada, na maioria das vezes em paliçada, catalase positivos, com colônias pequenas, esbranquiçadas, opacas e convexas que crescem em maior quantidade na parte gordurosa do leite semeado em aproximadamente 48 horas de incubação, foram classificados como microrganismos do gênero *Corynebacterium*.

3.3.3 Análise de composição química e CCS

Uma alíquota das amostras foi acondicionada em frascos contendo pastilhas de conservante Bronopol (2bromo-2nitropropano-1,3diol) para quantificação dos percentuais de gordura, lactose, proteína e sólidos totais, determinados por meio de espectrofotometria por radiação infravermelha, e contagem de células somáticas (CCS), por contagem eletrônica por citometria de fluxo (Fonseca & Santos, 2000) a qual foi encaminhada para o Laboratório de Qualidade de Leite da Embrapa Clima Temperado pertencente à Rede Brasileira de Laboratórios de Qualidade do Leite (RBQL).

3.3.4 Análise física do leite

Os testes de avaliação física do leite, cru refrigerado utilizados foram os seguintes: acidez, prova do álcool, densidade e pH, sendo avaliados diariamente a partir da amostra composta do dia de cada quarto mamário. Os métodos utilizados estão conforme Tronco (2008), Pereira et al. (2001) e Brasil (1999).

3.3.4.1 Acidez titulável em graus Dornic (°D)

A acidez natural do leite varia entre 0,14-0,18%, expressa como ácido láctico (14-18°D). A elevação da acidez é determinada pela hidrólise da lactose por enzimas microbianas, com formação de ácido láctico, caracterizando a acidez desenvolvida no leite. Tanto a acidez natural quanto à acidez desenvolvida são quantificadas, simultaneamente, em titulações por soluções alcalinas.

Segundo Fonseca & Santos (2000), a acidez do leite de vaca individual pode apresentar grande variação. São relatadas variações de 10 a 30°D em amostras individuais e, quando se considera a análises do leite total da fazenda (leite do tanque), o valor passa para níveis aceitáveis como normais de 16-18°D. Dessa forma, tendo em vista que as amostras foram coletadas de quartos mamários de vacas individuais, foram consideradas amostras normais até 20°D.

3.3.4.2 Teste do álcool

Esta prova possibilita a determinação rápida da estabilidade do leite. A técnica consiste em misturar, em uma placa de Petri, 2mL de leite e 2mL de solução alcoólica.

A instabilidade do leite foi avaliada pelo teste do álcool em diferentes concentrações (62 a 86°GL, com intervalos de 2°GL – Figura 5), sendo considerado o nível de instabilidade do leite como a menor concentração em que ocorreu a precipitação.



Figura 5 – Concentrações de álcool utilizadas para o teste de instabilidade do leite (62 a 86°GL).

3.3.4.3 Densidade

Para determinação da densidade coloca-se aproximadamente 250mL de leite em uma proveta e, utilizando um termolactodensímetro (de Quevene), avalia-se a densidade corrigida com a temperatura (°C) da amostra.

A densidade normal do leite varia entre 1,028 a 1,034g/cm³.

3.3.4.4 pH

O pH do leite foi avaliado através do Phmetro Portátil Digital mV/pH/Temperatura marca Lutron®. O aparelho foi calibrado diariamente nos dias de análise com soluções padrão de pH 7,0 e 4,0.

O pH normal do leite varia entre 6,6-6,8.

3.4 Análise Estatística

Foram calculadas as médias dos componentes analisados por quarto mamário por dia. Foi realizada a análise de variância por meio do delineamento completamente casualizado, sendo utilizadas, como fontes de variação, os grupos de CCS (n=4), raça (n=2) e interação. Os dias de lactação foram considerados como co-variável. A CCS foi transformada em escala logarítmica (log10), sendo apresentados os dados originais nas tabelas para melhor interpretação dos resultados. As médias foram comparadas pelo teste de Fisher ($\alpha \leq 0,05$) no programa SAS (9.2).

CAPÍTULO 4

Mastite subclínica e qualidade do leite de diferentes quartos mamários¹

¹Artigo científico sob as normas da revista a ser submetido.

MASTITE SUBCLÍNICA E QUALIDADE DO LEITE DE DIFERENTES QUARTOS MAMÁRIOS

SUBCLINICAL MASTITIS AND MILK QUALITY OF DIFFERENT UDDER QUARTER

Giovani Jacob Kolling⁽¹⁾, Maira Balbinotti Zanela⁽²⁾, Vivian Fischer⁽³⁾, Marcelo Tempel Stumpf⁽⁴⁾, Maria Edi Rocha Ribeiro⁽²⁾, Carolina da Silva dos Santos⁽⁵⁾ e Lais Perin⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) –, e-mail: giovanikolling@hotmail.com; ⁽²⁾ Pesquisadora Embrapa Clima Temperado (EMBRAPA-CPACT), endereço para correspondência: Embrapa Clima Temperado, Estação Terras Baixas. BR 392, Km 78, Cx. Postal 403, CEP: 96010-970 - Pelotas, RS – Brasil. Tel.: (53) 32758481, Fax: (53) 32758414; ⁽³⁾ Prof^a. Associado da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e bolsista do CNPq. ⁽⁴⁾ Mestrando do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); ⁽⁵⁾ Acadêmica do curso de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas.

Resumo

Objetivou-se verificar a relação entre a contagem de células somáticas do leite bovino ordenhado separadamente de quartos mamários com a qualidade físico-química do leite, em especial com o leite instável não ácido (LINA). Foram utilizadas 21 vacas das raças Holandês e Jersey, sendo selecionados a partir do teste do CMT os animais que apresentaram pelo menos um quarto mamário normal e os demais quartos com mastite subclínica. Realizou-se análise microbiológica, identificação dos agentes e, durante quatro dias consecutivos, as vacas foram ordenhadas com uma ordenhadeira especial de quartos individuais avaliando a produção, composição química, contagem de células somáticas (CCS) e análise física do leite. O principal agente isolado no leite foi o *Corynebacterium* sp. (27,38%). Ocorreu diminuição de 21,65% na produção de leite dos quartos com CCS acima de 750.000cél/mL. A instabilidade do leite não apresentou variação significativa dos quartos saudáveis em comparação com os quartos mastíticos. Dentre os componentes químicos do leite, o teor de lactose diminuiu à medida que ocorreu o aumento da CCS e não houve variação significativa nos teores de gordura, proteína bruta, sólidos totais e sólidos desengordurados. Houve variação significativa dos componentes do leite nas diferentes raças. Não houve relação entre a mastite subclínica e o LINA.

Palavras-chave: composição do leite, CCS, estabilidade do leite, Leite Instável Não Ácido.

Abstract: This study assessed the relationship between milk somatic cell count from different mammary quarters of cows with subclinical mastitis with physical and chemical milk quality,

especialmente unestável não ácido (UNAM). Vinte e uma Holstein e Jersey foram utilizadas, cada uma com pelo menos um quarto saudável e as outras com mastite subclínica. Análise microbiológica foi realizada e os agentes foram identificados. As vacas foram ordenhadas com uma máquina especial que separa o leite de cada quarto por quatro dias consecutivos. Amostras de leite foram coletadas para avaliar produção, composição química, contagem de células somáticas (SCC) e características físicas. O principal agente identificado no leite foi *Corynebacterium* sp. (27,38%). Houve uma redução de 21,65% na produção de leite por quarto das vacas com SCC acima de 750.000 células/mL. A instabilidade do leite não variou significativamente entre quartos saudáveis e com mastite. Entre os componentes químicos do leite, a lactose diminuiu com o aumento da SCC e não houve variações significativas nos níveis de gordura, proteína, sólidos totais e sólidos não gordurosos. Houve variações significativas nos componentes do leite entre as raças. Não houve relação entre mastite subclínica e UNAM.

Keywoks: milk composition, SCC, stability of milk, unstable non acid milk.

Introdução

O leite é um alimento rico em nutrientes contendo proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e sais minerais. Sua qualidade é um dos temas mais discutidos atualmente dentro do cenário nacional de produção leiteira (Fonseca e Santos, 2000). A saúde da glândula mamária, a higiene de ordenha e os procedimentos de limpeza do equipamento de ordenha são fatores que afetam diretamente a qualidade do leite cru.

A indústria leiteira mundial atravessa um período de intensas transformações, podendo-se identificar como principais tendências a diferenciação do pagamento ao produtor e o aumento nas exigências de qualidade do leite, assim como maior preocupação dos consumidores com relação à segurança alimentar. Nesse novo cenário, os produtores precisam se adequar de forma a manter a atividade de produção de leite como uma operação rentável e eficaz.

A mastite bovina é o fator que mais provoca perdas econômicas na cadeia produtiva do leite, principalmente na redução da produção (Lescourret e Coulon, 1994). Pode ser classificada da forma clínica, apresentando sintomas, ou subclínica, sem sinais visíveis no leite ou no úbere. Tanto a mastite clínica como a subclínica podem causar alterações na composição do leite, aumento da contagem de células somáticas (CCS) e aumento do risco de

lipólise e proteólise. Mesmo em baixos níveis de CCS, ou seja, um pouco acima 50.000 células/mL, a composição do leite é alterada em quartos separados do úbere (Dias, 2007).

A CCS do leite de uma vaca indica de maneira quantitativa o grau de infecção da glândula mamária. Já a CCS do leite do tanque de resfriamento do rebanho indica a incidência média de mastite no rebanho (Machado et al., 2000).

A elevação da CCS e as mudanças na composição do leite estão diretamente relacionadas com a superfície do tecido mamário atingido pela reação inflamatória. Portanto, há uma relação direta entre a CCS e a concentração dos componentes do leite (Schäellibaum, 2000).

Essas mudanças nas concentrações podem ser vistas nos principais componentes do leite, como proteína, gordura e lactose, além de minerais e enzimas. Os principais mecanismos pelos quais ocorre alteração nos níveis dos componentes do leite são: lesão das células epiteliais produtoras de leite, que pode alterar as concentrações de lactose, proteína e gordura, e aumentar a permeabilidade vascular, que aumenta a passagem de substâncias do sangue para o leite, tais como sódio, cloro, imunoglobulinas e outras proteínas (Pales et al., 2005).

No âmbito internacional, a CCS no leite bovino é usada como indicadora da qualidade do leite, para controle da mastite e, indiretamente, como indicadora da produção higiênica do leite (Wickström et al., 2009). Sendo assim, muitos países têm estabelecido limites máximos de CCS do leite de rebanho. Os Estados Unidos e Canadá estabeleceram um limite de 500.000 e 750.000cél/mL, respectivamente, enquanto na União Européia, Nova Zelândia e Austrália, o valor é de 400.000 cél/mL (Philpot, 1998; Santos, 2002).

No Brasil, em dezembro de 2011 o MAPA publicou a Instrução Normativa 62 (IN62) que alterou a IN51 (Brasil, 2002). A partir de 2012, a IN62 estabelece os limites para CCS de 600.000cél/mL para as regiões Sul e Sudeste e em 2013 para as regiões Nordeste e Norte. Em julho de 2014, o limite máximo será de 500.000cél/mL (Brasil, 2011).

Muita ênfase tem sido dada para avaliar as alterações na composição do leite causadas pela mastite clínica e subclínica. Entretanto, a maioria das pesquisas tem sido realizada utilizando-se leite de animais individuais ou de rebanhos, resultando na mistura do leite de quartos mamários saudáveis com mastíticos, podendo comprometer os resultados. A avaliação dos quartos mamários de um mesmo animal, em diferentes condições sanitárias (saudáveis e mastíticos) pode tornar mais fidedigno o conhecimento sobre as mudanças na composição do

leite causadas pela mastite, evitando-se os efeitos da variação individual. Também pode futuramente, com o uso de máquinas automatizadas de ordenha, ser utilizado para decidir se o leite de quartos individuais com um aumento de CCS deve ser separado ou não (Forsbäck et al., 2009).

Além disso, a relação entre a mastite subclínica e a instabilidade do leite ao teste do álcool ainda é controversa.

O teste do álcool é utilizado pelas indústrias lácteas para avaliação da qualidade do leite no momento da coleta na propriedade e na plataforma da indústria (Fischer, 2011). Segundo a IN62, o leite cru refrigerado deve ser estável no mínimo ao álcool 72°GL.

O Leite Instável Não Ácido (LINA) é o leite que apresenta instabilidade no teste do álcool sem acidez titulável elevada. Quanto menor a concentração de álcool necessária para precipitação, mais instável é o leite. Alguns trabalhos não encontraram relação entre o LINA e a mastite (Donatele, 2001); outros relações positivas (Machado, 2010; Zanela, 2004; Molina et al., 2001) e outros relações negativas (Negri et al., 2001). Entretanto, os trabalhos foram realizados com leite de animais individuais ou de rebanhos, e muitas vezes utilizaram a sanidade como fator de seleção dos animais experimentais (Machado, 2010; Zanela, 2009; Abreu, 2008) ou na exclusão de amostras (Oliveira et al., 2007). Não existem trabalhos que enfoquem diretamente a relação entre a mastite e o LINA.

O objetivo deste estudo foi verificar a relação entre a contagem de células somáticas do leite oriundo de diferentes quartos mamários de vacas com mastite subclínica com a qualidade físico-química do leite, em especial com o leite instável não ácido (LINA).

Material e métodos

O estudo foi realizado no período de maio a setembro de 2011. Foram utilizadas 9 vacas das raças Holandês e 12 vacas da raça Jersey. Os animais foram selecionados a partir dos rebanhos leiteiros do Sistema de Desenvolvimento em Pecuária Leiteira (SISPEL) da Embrapa Clima Temperado, do Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG) e de uma propriedade leiteira particular, situadas em Pelotas-RS, Brasil. Para seleção dos animais utilizou-se como critério de inclusão o teste do *California Mastitis Test* (CMT), sendo selecionadas as vacas que apresentassem pelo menos um quarto mamário normal (negativo ao

teste) e os demais quartos com mastite subclínica e como critério de exclusão animais com mastite clínica ou com mais de 300 dias de lactação.

Antes da ordenha, e após higienização dos tetos, os primeiros jatos de cada quarto foram utilizados para a realização do teste da caneca de fundo preto para identificação de mastite clínica e o CMT para identificação de mastite subclínica, sendo utilizando o detergente comercial, de acordo com a metodologia de Langenegger et al. (1970).

A interpretação do CMT foi realizada da seguinte maneira: escore 0 (sem presença de reação entre o reagente e o leite) indica uma reação completamente negativa; 1: reação fracamente positiva (+); 2: reação positiva (++) e, 3: reação fortemente positiva (+++) conforme Tronco (1997).

Após a seleção dos animais foi realizado a desinfecção de todos os tetos com algodão previamente umedecido com álcool 70°GL e coletada uma amostra de leite individual por quarto, com aproximadamente 20mL em tubos estéreis devidamente identificados. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de bacteriologia e saúde populacional do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) para análise microbiológica e identificação dos agentes.

Durante quatro dias consecutivos as vacas selecionadas foram ordenhadas com uma ordenhadeira especial de quartos individuais (marca Miele®), sendo que após a ordenha de cada vaca era realizada a lavagem da ordenhadeira com água corrente. A produção de cada quarto mamário foi medida e amostras de leite foram coletadas dos quartos mamários separadamente (ordenha da manhã e da tarde) em frascos de 250mL limpos e higienizados, após prévia homogeneização. Os frascos foram acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo, enviados ao laboratório e armazenados em geladeira. Após a refrigeração do leite foi realizada a mistura das amostras (manhã e tarde) formando uma amostra composta por quarto por dia.

Para análise de composição química e CCS, uma alíquota das amostras foi acondicionada em frascos contendo pastilhas de conservante Bronopol (2bromo-2nitropropano-1,3diol) para quantificação dos percentuais de gordura, lactose, proteína e sólidos totais determinados por meio de espectrofotometria por radiação infravermelha e contagem de células somáticas (CCS) por contagem eletrônica por citometria de fluxo (Fonseca e Santos, 2000), as quais foram encaminhadas para o Laboratório de Qualidade de

Leite da Embrapa Clima Temperado pertencente à Rede Brasileira de Laboratórios de Qualidade do Leite (RBQL).

Os testes para análise física do leite, cru refrigerado, utilizados foram os seguintes: acidez titulável, prova do álcool, densidade e pH. Os métodos utilizados estão conforme Tronco (2008), Pereira et al. (2001) e Brasil (1999).

O teste do álcool foi realizado em uma placa de Petri com 2mL de leite e 2mL de solução alcoólica, onde a instabilidade do leite foi avaliada em diferentes concentrações (62 a 86°GL, com intervalos de 2°GL), sendo considerado o nível de instabilidade do leite como a menor concentração em que ocorreu a precipitação.

A produção de leite foi corrigida para 4% de gordura (NRC, 2001), através da fórmula:

$$PLC = 0,4 \times PL + 15 \times (\% \text{ GB} / 100) \times PL$$

Sendo:

PLC = Produção de leite corrigida para 4% gordura

PL = Produção de leite

GB = Gordura bruta

Os quartos foram classificados de acordo com a CCS em quatro grupos: G1 ($\leq 100 \times 10^3$ cél/mL leite, quartos saudáveis); G2 ($+100 - \leq 300 \times 10^3$ cél/mL leite); G3 ($+300 - \leq 750 \times 10^3$ cél/mL) e G4 ($> 750 \times 10^3$ cél/mL leite).

Foram calculadas as médias dos componentes analisados por quarto mamário. Foi realizada a análise de variância por meio do delineamento completamente casualizado, sendo utilizados como fontes de variação os grupos de CCS (n=4), raça (n=2) e interação. Os dias de lactação foram considerados como co-variável. A CCS foi transformada em escala logarítmica (log10), sendo apresentados os dados originais nas tabelas para melhor interpretação dos resultados. As médias foram comparadas pelo teste de Fisher ($\alpha \leq 0,05$). Foi utilizado o programa SAS (9.2).

Resultados e discussão

Dos 84 quartos avaliados, 27,38% apresentaram reação negativa ao CMT, 30,96% CMT1; 25% CMT2 e 16,66% CMT3.

A Tabela 1 apresenta os microrganismos isolados no leite dos quartos mamários das vacas com mastite subclínica. Houve prevalência de *Corynebacterium* sp. entre os microrganismos isolados (27,38%), seguidos por bactérias do gênero estafilococos coagulase negativa (13,10%). Destaca-se que, mesmo havendo reação positiva no teste do CMT, um elevado percentual de amostras de leite não apresentou crescimento bacteriano.

Tabela 1 – Microrganismos isolados no leite de quartos mamários das vacas selecionadas no experimento de acordo com a reação de CMT.

Microrganismo	Reação CMT				Total	%
	0	1	2	3		
Sem crescimento	11	12	13	5	41	48,81
<i>Corynebacterium</i> sp.	8	8	5	2	23	27,38
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	3	3	2	3	11	13,10
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	1	2		2	5	5,95
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva + <i>Corynebacterium</i> sp.				1	1	1,19
<i>Streptococcus</i> sp. + <i>Corynebacterium</i> sp.			1		1	1,19
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa + <i>Streptococcus</i> sp.				1	1	1,19
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa + <i>Corynebacterium</i> sp.		1			1	1,19
Total Geral	23	26	21	14	84	100

Na mastite subclínica, a reação inflamatória pode estar presente mesmo sem processo infeccioso na glândula, devido às lesões traumáticas, agressões por agentes químicos ou, o agente microbiano pode ainda já ter sido eliminado, de forma natural pelos processos de auto cura, resultando em cultura negativa (Ribeiro et al., 2003). Este fato possivelmente tenha contribuído para a falta de isolamento microbiológico em 48,81% das amostras analisadas, apesar de 73,17% destas apresentarem reação positiva de diferentes graus no CMT.

Segundo Ribeiro et al. (2003), os resultados referentes à identificação da mastite subclínica pelo *California Mastitis Test* (CMT) sugerem uma maior cautela no uso deste teste como indicativo de infecção intramamária pela constatação de grande número de amostras de leite sem crescimento microbiano. Ribeiro et al. (2011) ao avaliarem 154 vacas Jersey

observaram que 70,56% de 316 quartos mamários reagentes ao CMT, não apresentaram crescimento microbiológico, semelhante aos resultados deste estudo.

Segundo Figueiredo (1995), os resultados negativos ao CMT são plenamente confiáveis e muito úteis nos trabalhos de campo. Entretanto Costa et al. (2001), discordam quanto à negatividade ao CMT em relação à presença de agentes microbianos, caracterizando os animais portadores. Segundo estes autores, o animal portador não apresenta reação positiva ao teste de CMT, entretanto pode apresentar resultado positivo ao exame microbiológico. Em estudo realizado com 8.116 amostras de quartos mamários negativos ao CMT, observaram que em 45,1% das amostras foram isolados microrganismos contagiosos. No presente trabalho das 23 amostras negativas ao CMT, 52,17% apresentaram crescimento microbiológico.

Os resultados encontrados também estão de acordo com Martins et al. (2010), que ao avaliarem 108 vacas da microrregião de Cuiabá, estado de Mato Grosso, encontraram 85,2% dos animais portadores de mastite em pelo menos um quarto mamário. Quanto à etiologia, os agentes causais mais prevalentes foram *Corynebacterium* sp. (27,6%), *Staphylococcus aureus* (21,5%), *Corynebacterium* sp. + *S. aureus* (6,8%) e *Staphylococcus intermedius* (6,5%).

A Tabela 2 demonstra uma análise descritiva da produção, composição físico-química do leite e CCS de amostras com crescimento de *Corynebacterium* sp., agente com maior prevalência encontrado.

Tabela 2 – Análise descritiva da produção, composição físico-química do leite e CCS de amostras com crescimento de *Corynebacterium* sp.

Característica				
	média	variância	mínimo	máximo
Leite (L/quarto/dia)	4,48	4,40	2,20	7,00
Álcool (°GL)	74,35	74	62	86
Dornic (°D)	16,74	16	14	20
pH	6,78	6,80	6,61	7,00
Densidade (g/L)	1031.8	1031.3	1029.1	1034.3
Gordura (%)	2,79	2,61	1,61	4,80
Proteína (%)	3,12	3,00	2,73	3,68
Lactose (%)	4,61	4,74	3,92	5,03
Sólidos totais (%)	11,36	11,08	10,26	13,70
CCS (cél/mL/Leite)	162.782	82.000	22.000	1.724.000

O *C. bovis* dissemina-se entre os animais durante o processo de ordenha, caso esta operação não seja conduzida de forma higiênica. Além disso, uma elevada prevalência de

infecções intramamárias por *C. bovis* é um indicativo da ausência ou ineficiência da desinfecção dos tetos após a ordenha, processo esse denominado *pós-dipping* (Haltia et al., 2006).

Segundo Victória et al. (2005), o *C. bovis* é um patógeno de significado relevante nas mastites, seja pelo aumento da taxa de seu isolamento, observado nos últimos anos, bem como pela demonstração da elevação do conteúdo celular do leite, acarretando grandes perdas econômicas aos produtores e às indústrias de subprodutos lácteos.

Brito et al. (1999) verificaram prevalência do crescimento bacteriano de 6.315 amostras de leite obtidas de todos os quartos mamários de 1.609 vacas em lactação, originárias de 48 rebanhos localizados na Zona da Mata e Campo das Vertentes do Estado de Minas Gerais. O estudo demonstrou que os principais agentes isolados foram: *Corynebacterium* sp. 55,2%, *Staphylococcus aureus* 19,2% e *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) 12,4%. Em 2.463 amostras (39% do total) não houve isolamento no exame microbiológico. *Corynebacterium* sp. foi o microrganismo mais frequentemente isolado, presente em todos os rebanhos, com porcentagens de quartos mamários infectados que variaram entre 1% e 58,6%.

O *Corynebacterium* sp. isolado nesse trabalho, causa primariamente infecções subclínicas e é considerado como um patógeno de significância limitada ou um microrganismo comensal da glândula (Huxley et al., 2003). Entretanto, a sua elevada prevalência em infecções intramamárias (Bueno et al., 2003; Pitkälä et al., 2004) e a sua influência negativa na produção leiteira (Zafalon et al., 1999) sugerem que talvez seja mais apropriado não considerá-lo um patógeno secundário. Segundo Carneiro et al. (2009), a mastite causada por patógenos chamados menores e microrganismos ambientais é o principal desafio para a indústria leiteira moderna.

O aumento da participação do *Corynebacterium bovis* como causador de mastites também é relatado por pesquisadores de outros países. Pitkälä et al. (2004) informam uma redução da prevalência de patógenos clássicos como o *S. agalactiae* e o *S. aureus* ao longo dos anos em rebanhos finlandeses. Entretanto, o *C. bovis* e os SCN, considerados

tradicionalmente microrganismos de menor patogenicidade, têm se tornado mais frequente em tais rebanhos.

Houve correlação moderada positiva significativa entre CMT e CCS ($P=0,0001$; $r=0,5729$) sendo que a CCS foi utilizada para classificação dos grupos para evitar subjetividade do avaliador ao teste do CMT. Essa subjetividade também foi citada por Brito et al. (1997) ao estudar a relação entre os dois testes.

Não houve interação significativa entre grupos de CCS e raça para as características avaliadas. Na Tabela 3 são apresentadas as médias de produção e composição físico-química do leite de vacas com mastite subclínica nos diferentes Grupos de CCS.

Tabela 3 – Médias e desvios padrão da composição físico-química e produção de leite de quartos mamários de vacas com mastite subclínica (valores médios), de diferentes grupos de CCS.

<i>Característica</i>	<i>Grupo CCS*</i>				
	G1	G2	G3	G4	P=F
Número de amostras	24	27	19	14	
Leite (L/quarto/dia)	3,88 ± 0,20a	4,06 ± 0,19a	3,47 ± 0,24ab	3,04 ± 0,33b	0,0363
PLc (4% gordura)	3,78 ± 0,23	4,03 ± 0,21	3,47 ± 0,27	2,98 ± 0,36	0,0747
Álcool (°GL)	72,91 ± 1,42	71,71 ± 1,33	75,51 ± 1,70	74,26 ± 2,28	0,3467
Acidez (°D)	16,33 ± 0,31	16,08 ± 0,29	16,01 ± 0,38	15,22 ± 0,50	0,3320
pH	6,76 ± 0,017b	6,76 ± 0,016b	6,82 ± 0,020a	6,86 ± 0,027a	0,0090
Densidade (g/L)	1.031,33 ± 0,32	1.031,18 ± 0,30	1.031,58 ± 0,38	1.030,16 ± 0,51	0,1618
Gordura (%)	4,06 ± 0,21	4,40 ± 0,19	4,57 ± 0,25	4,25 ± 0,33	0,4329
Proteína Bruta (%)	3,36 ± 0,08	3,47 ± 0,07	3,67 ± 0,09	3,44 ± 0,13	0,1173
Lactose (%)	4,52 ± 0,07a	4,37 ± 0,06ab	4,26 ± 0,08bc	4,02 ± 0,11c	0,0016
Sólidos Totais (%)	12,96 ± 0,29	13,28 ± 0,27	13,56 ± 0,34	12,71 ± 0,46	0,3876
Sólidos desengordurados (%)	8,90 ± 0,11	8,88 ± 0,11	8,99 ± 0,14	8,45 ± 0,18	0,1124
CCS***	82.366	157.384	473.560	2.924.604	

* G1 ($\leq 100 \times 10^3$ céls/mL leite, quartos saudáveis); G2 ($>100 - \leq 300 \times 10^3$ céls/mL leite); G3 ($>300 - \leq 750 \times 10^3$ céls/mL) e G4 ($>750 \times 10^3$ céls/mL leite).

** médias com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa pelo teste de Fisher ($\alpha=0,05$). PLc: Produção de leite corrigida a 4% de gordura.

*** não foi realizada análise estatística.

A média da produção de leite dos quartos mamários do grupo com menor CCS foi de 3,88L, sendo que houve uma diminuição significativa de 21,65% na produção de leite do quarto mamário do G4 com relação ao G1. Porém quando comparada a produção de leite corrigida para 4% de gordura, observou-se apenas uma tendência de redução ($P=0,0747$).

De acordo com Fonseca e Santos (2000), a elevação da CCS está associada à diminuição da produção de leite e, segundo Reis et al. (2003), as perdas na produção de leite atribuídas às mastites subclínicas alcançam de 10% a 26% do total da produção, de acordo com grau de intensidade do processo inflamatório, da prevalência da doença, da patogenicidade do agente infeccioso e do estágio de lactação. Essa diminuição ocorre em razão das lesões causadas nas células epiteliais da glândula mamária, que reduzem a capacidade de síntese e a secreção da glândula mamária (Auldism e Hubble, 1998).

Na caracterização física do leite encontrou-se diferença significativa apenas no pH ($P=0,0090$), verificando que ocorreu um aumento a partir do G2 ($+100 - \leq 300 \times 10^3 \text{cél/mL}$ leite). Della Libera et al. (2001) também observaram um aumento no pH em amostras com CCS acima de $500 \times 10^3 \text{cél/mL}$ leite, deixando as amostras mais alcalinas que o leite com baixa CCS.

Não foi encontrada diferença significativa na acidez titulável e na densidade nas amostras do leite nos diferentes grupos de CCS. Também não houve diferença na instabilidade do leite ao teste do álcool, o que indica a falta de relação entre o LINA e a mastite.

A relação entre a CCS e o leite instável ainda é controversa. Segundo Machado (2010), a relação positiva entre CCS e a instabilidade ao álcool poderia ser esperada devido ao aumento da permeabilidade das junções epiteliais do alvéolo mamário, aumentando a passagem de componentes desestabilizantes do sangue para o leite, como é o caso do sódio, cloro e fósforo.

Molina et al. (2001) analisaram amostras de leite de tanque e observaram que amostras instáveis ao etanol apresentavam numericamente maiores valores de CCS, o que poderia levar a uma menor termoestabilidade do leite na indústria. Amostras positivas a uma concentração de etanol de 73,75% apresentaram uma CCS de 514.000cél/mL comparados com amostras positivas a uma concentração de etanol superior a 78% e CCS inferior a $210.000 \pm 144.000 \text{cél/mL}$.

Donatele et al. (2001), ao analisarem 847 quartos de 37 animais de uma propriedade em Campos dos Goytacazes/RJ, avaliaram amostras positivas ao alizarol 72% e verificaram que 61,67% das amostras apresentaram CCS menor que 300×10^3 cél/mL, 11,5% 301- 1.000×10^3 cél/mL e 26,83% mais que 1.000×10^3 cél/mL, demonstrando assim, um maior número de amostras que possuem baixa CCS, sugerindo não haver relação da positividade dos leites no teste do alizarol com o número de células somáticas.

Por outro lado, Negri et al. (2001), na Argentina, analisaram 85 amostras de leite provenientes de unidades de produção leiteira, no período de março a novembro de 2000. As amostras foram classificadas em dois grupos, negativas (não apresentavam precipitação ao teste do álcool 78%) e positivas (apresentavam precipitação ao álcool 72%). A composição do leite das amostras positivas diferiu das amostras negativas, sendo que o instável apresentou menor CCS ($233-346 \times 10^3$ cél/ml) do que o leite estável ($324-427 \times 10^3$ cél/ml).

Entretanto, os trabalhos citados dizem respeito a amostras de leite de conjunto, ou de animais individuais. Isto pode comprometer os resultados das análises devido à mistura do leite de animais saudáveis com o leite de animais com mastite, ou de quartos saudáveis com quartos mastíticos. No presente estudo, as amostras foram coletadas dos quartos mamários de forma individual, sendo que não houve diferença significativa da instabilidade do leite dos quartos mamários saudáveis e dos mastíticos ($P=0,3467$, Figura 1).

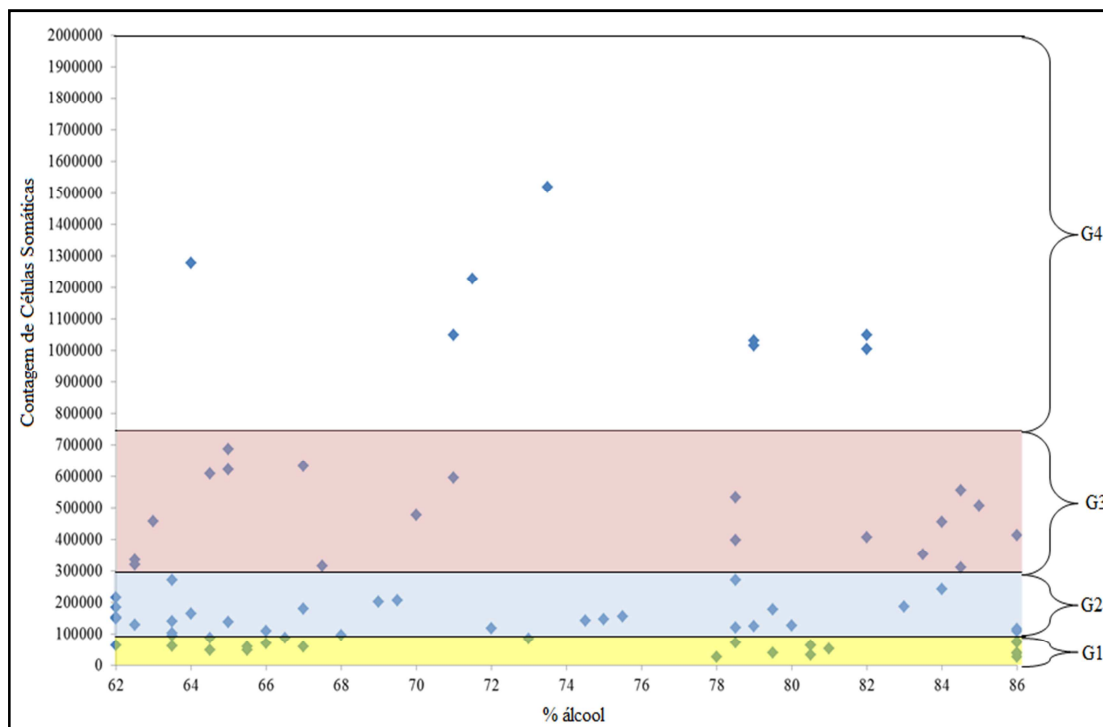


Figura 1. Contagem de células somáticas (CCS) das amostras nas diferentes concentrações de álcool.

Com relação à composição química do leite, apenas a porcentagem de lactose foi diferente significativamente entre os grupos ($P=0,0016$). A elevada CCS está associada à diminuição na concentração de lactose no leite, devido à passagem de lactose do leite para o sangue e, redução da capacidade de síntese de lactose pelo epitélio glandular, devido às lesões no epitélio (Fonseca e Santos, 2000).

Rajcevic et al. (2003) observaram correlação negativa entre Log de CCS e porcentagem de lactose ($r=-0,423$). Bueno et al. (2005) também encontraram uma redução significativa nos teores de lactose com o aumento da CCS (de $<200.000\text{cél/mL}$ para $>1.000.000\text{cél/mL}$). Neste trabalho, houve uma redução de 5,22% entre o G1 e o G3, estando de acordo com a redução descrita por Brito e Dias (1999). Machado et al. (2000) e Silva et al. (2000) também observaram redução da concentração de lactose quando a CCS aumentou. Portanto, pode-se inferir que a lactose é o componente do leite que sofre maior redução devido à elevação da CCS (Bueno et al., 2005).

Forsbäck et al. (2010) ao avaliarem mudanças na qualidade do leite de diferentes quartos mamários de vacas com baixa a moderada contagem de células somáticas observaram que os grupos dos quartos com maior CCS (acima de 100.000cél/mL) apresentavam concentrações numericamente menores de lactose quando comparados com o grupo com baixa CCS (50.000cél/mL), porém sem diferença significativa entre os grupos.

Outro estudo realizado por Forsbäck et al. (2009), avaliando a composição e produção de leite de quartos mamários individuais de acordo com três diferentes grupos de CCS verificou que a lactose ($P=0,004$) foi significativamente menor (2,18%) no grupo 3 (acima de 300.000cél/mL) quando comparado ao grupo 1 (<100.000cél/mL), concordando com os resultados obtidos nesse trabalho.

Não se observou variação significativa entre os teores de gordura e proteína, concordando com Auldist e Hubble (1998) que, em virtude do grande número de variáveis, afirmam não haver um consenso na literatura sobre as alterações na concentração desses componentes em leites provindos de animais individuais ou tanques.

Bueno et al. (2005), observando os teores médios de gordura em diferentes intervalos da CCS, constatou que praticamente não houve variação entre os diferentes intervalos, ao contrário de Harmon (1994) e Auldist et al. (1995), que mencionaram a ocorrência de redução conforme aumento da CCS.

Concordando com os resultados de Machado et al. (2000) e Silva et al. (2000), não foi encontrado diferença significativa no percentual de sólidos totais, sendo essa ausência de significância provavelmente decorrida ao fato de que os autores verificaram, concomitantemente, aumento da concentração de gordura, o que poderia mascarar o efeito da redução dos teores de lactose sobre a concentração de sólidos totais. Também não houve variação no teor de sólidos desengordurados do leite.

Em relação à produção total diária dos componentes do leite por quarto mamário, os resultados demonstram que apesar dos teores de alguns componentes do leite não apresentarem variação significativa, houve redução significativa da produção total da proteína bruta, lactose, sólidos totais e sólidos desengordurados nos diferentes grupos de CCS (Tabela 4).

Tabela 4 – Produção total dos componentes do leite de quartos mamários de vacas com mastite subclínica, nos diferentes grupos de CCS.

Característica	Grupo CCS*				P=F
	G1	G2	G3	G4	
Gordura (g/dia)	148,69	160,35	139,08	117,59	0,1715
Proteína Bruta (g/dia)	126,99a	136,02a	121,28ab	100,57b	0,0477
Lactose (g/dia)	178,11a	180,86a	152,10ab	129,09b	0,0237
Sólidos totais (g/dia)	492,00a	517,42a	447,10ab	376,35b	0,0425
Sólidos desengordurados (g/dia)	343,31a	357,07a	308,01ab	258,76b	0,0315

** G1 ($\leq 100 \times 10^3$ cél/mL leite, quartos saudáveis); G2 ($>100 - \leq 300 \times 10^3$ cél/mL leite); G3 ($>300 - \leq 750 \times 10^3$ cél/mL) e G4 ($>750 \times 10^3$ cél/mL leite).

**médias com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa pelo teste de Fischer ($\alpha=0,05$).

A raça Holandês apresentou maior produção leiteira ($P=0,0001$), 4,15L/quarto/dia comparada com a raça Jersey com 3,08L/quarto/dia, porém a produção leiteira corrigida a 4% de gordura não foi diferente entre as raças ($P=0,1347$). As raças não diferiram significativamente quanto às características físicas do leite: álcool estabilidade no teste do álcool, acidez titulável, pH e densidade do leite (Tabela 5).

Tabela 5 - Composição físico-química e produção de leite de quartos mamários de vacas das raças Holandês e Jersey com mastite subclínica (valores médios).

Característica	Raça		P=F
	Holandês	Jersey	
Leite (L/quarto/dia)	4,15±0,20	3,08±0,14	0,0001
PLc (4% gordura)	3,36±0,22	3,77±0,16	0,1347
Álcool (°GL)	75,09±1,39	72,11±1,00	0,0851
Acidez (°D)	16,20±0,31	15,62±0,22	0,1292
pH	6,79±0,02	6,81±0,01	0,2466
Densidade (g/L)	1.031,11±0,31	1.031,02±0,23	0,8280
Gordura (%)	3,01±0,20	5,63±0,15	0,0001
Proteína Bruta (%)	3,16±0,08	3,81±0,06	0,0001
Lactose (%)	4,45±0,07	4,13±0,05	0,0002
Sólidos Totais (%)	11,48±0,28	14,77±0,22	0,0001
Sólidos desengordurados (%)	8,47±0,11	9,15±0,08	0,0001

De acordo com González (2001) a raça Jersey apresenta valores mais elevados gordura (5,5%), proteína (3,9%) e sólidos totais (15%), quando comparado com a raça Holandês que apresenta 3,5%, 3,1% e 12,2%, respectivamente. Para a lactose, o autor cita como média das duas raças 4,9%. Porém no presente estudo encontraram-se valores

de gordura e proteína bruta abaixo do citado anteriormente na raça Holandês (3,01% e 3,16%, respectivamente), a concentração de lactose foi menor na raça Jersey (4,13%) quando comparado a Holandês (4,45%) e o valor de sólidos totais e sólidos desengordurados foi maior na raça Jersey (14,77% e 9,15%).

Nos resultados do presente estudo, foram encontradas diferenças significativas os teores de gordura ($P=0,0001$), proteína bruta ($P=0,0001$) e lactose ($P=0,0002$), estando de acordo com Prendiville et al. (2009) que verificaram diferença nos teores de gordura (3,96% e 5,33%), proteína (3,49% e 4,06%) e lactose (4,49% e 4,53%) entre a raça Holandês e Jersey ao avaliar a qualidade do leite entre as duas raças e suas cruzas.

Conclusão

O principal agente isolado no leite dos animais com mastite subclínica é o *Corynebacterium* sp. (27,38%). A mastite subclínica reduz a produção de leite em 21,65% nos quartos mamários com CCS acima de 750.000cél/mL. Apenas o teor de lactose variou com a CCS. Não há relação da mastite subclínica com o LINA.

Referências Bibliográficas

ABREU, A. S. Leite instável não ácido e propriedades físico-químicas do leite de vacas Jersey. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia da UFRGS, Porto Alegre, 2008.

AULDIST, M.J.; COATS, S.; ROGERS, G.L. et al. Changes in the compositional of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. Australian Journal of Experimental Agriculture, v.35, n.4, p.427-436, 1995.

AULDIST, M.J.; HUBLLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. Australian Journal of Dairy Technology, v.53, p.28-36, 1998.

BUENO, V. F. F.; NICOLAU, E.S.; MESQUITA, A.J. et al. Etiologia e suscetibilidade a antimicrobianos dos agentes da mastite bovina isolados na região de Pirassununga, SP, Brasil. Revista de Patologia Tropical, v.32, n.1, p.33-44, 2003.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S. et al. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. Ciência Rural, v.35, n.4, 2005.

BRASIL. Portaria nº 56, de 07 de dezembro de 1999. Submete à consulta pública os regulamentos técnicos sobre produção, identidade e qualidade de todos os tipos de leite e coleta de leite cru resfriado e transporte a granel. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, Seção 1, n.234, p.34-49, 1999.

BRASIL. Instrução Normativa n. 51 de 18 de setembro de 2002. Dispõe sobre regulamentos técnicos aplicados ao leite cru e pasteurizado. Diário Oficial da União, Brasília, Seção 1, n.183, p.13-22, 2002.

BRASIL. Instrução Normativa n. 62 de 29 de dezembro de 2011. Alteração do caput da Instrução Normativa MAPA n. 51, de 18 de setembro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, 29 dez. 2011.

BRITO, J.R.F.; CALDEIRA, G.A.V.; VERNEQUE, R.S. et al. Sensibilidade e especificidade do *California Mastitis Test* como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.17, n.2, p.49-53, 1997.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M.T. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.51, n.2, p.33-35, 1999.

CARNEIRO, D.M.V.F.; DOMINGUES, P.F.; VAZ, A.K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. Ciência Rural, v.39, n.6, p.1934-1943, 2009.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; GARINO Jr., F. et al. Portador: um importante elo na epidemiologia de mastite infecciosa bovina. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 28, 2001, Salvador, Anais... Salvador: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2001. p.159.

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

DELLA LIBERA, A.M.M.P.; ARAUJO, W.P.; COSTA, E.O. et al. Características físico-químicas e microbiológicas do leite de vacas sem alterações ao exame físico da glândula mamária e com alta contagem de células somáticas. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. v.1, n.2, p.42-47, 2001.

DONATELE, D.M.; VIEIRA, L.F.P.; FOLLY, M.M. Relação do teste alizarol 72% (v/v) de leite “in natura” de vaca com acidez e contagem de células somáticas: análise microbiológica. Revista Higiene Alimentar, v.17, n.110, p.95-100, 2003.

FIGUEIREDO, J. B. Mastite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11., 1995, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte, 1995. p.176.

FISCHER, V.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R. et al. Leite instável não ácido (LINA): prevenção na propriedade leiteira e impactos nos laticínios. In: SIMLEITE, 3, Anais... Viçosa: Universidade Federal Viçosa, p.45-65. 2011.

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

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MANSSON, H.; ANDRÉN, A. et al. Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk. Animal. v.3, p.710-717, 2009.

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MANSSON, H.; ANDRÉN, A. et al. Evaluation of quality changes in udder quarter milk from cows with low-to-moderate somatic cell counts. *Animal*. v.4, p. 617–626. 2010.

GONZÁLEZ, F.H.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; PERES, J.R. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, p.5-22, 2001.

HALTIA, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; SPIRIDONOVA, I. et al. A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.48, p.22-27, 2006.

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

HUXLEY, J.N. *Corynebacterium bovis* – friend or foe? British Mastitis Conference, 2003, Garstang, Proceedings... 2003. p.23-34. Disponível em: <<http://www.britishmastitisconference.org.uk/Page9final09-04-16.html>>. Acesso em: 15 ago. 2009.

LANGENEGGER, J.; COELHO, N. M.; LANGENEGGER, C. H. et al. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Vet.*, v.5, p.437-440, 1970.

LESCOURRET, F.; COULON, J.B. Modeling the impact of mastitis on milk production by dairy cows. *Journal of Dairy Science*. v.77, n.8, p.2289-2301, 1994.

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, 2000.

MACHADO, S.C. Fatores que afetam a estabilidade térmica do leite bovino. 2010. 132f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MARTINS, R.P.; SILVA, J.A.G.; NAKAZATO, L. et al. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. *Ciência Animal Brasileira, Goiânia*, v.11, n.1, p.181-187, 2010.

MOLINA, L.H.; GONZALEZ, R.; BRITO, C. et al. Correlation between heat stability and alcohol test of milks at a milk collection center. *Archivos de Medicina Veterinária*, v.2, 2001.

NATIONAL RESEACH COUNCIL. Nutrient requirements of Dairy Cattle. National Academy Press, Washington, D.C., p.7-381, 2001.

NEGRI, L.; CHAVEZ, M.; TAVERNA, M.; ROBERTS, L.; SPERANZA, J. Fatores que afectan la estabilidad térmica y la prueba de alcohol en Leche cruda de calidad higiénica adecuada. Informe técnico final Del proyecto. INTA EEA/Rafaela - INTI CÍTIIL Rafaela, 2001.

PALES, A.P.; SANTOS, K.J.G.; FIGUEIRAS, E.A. et al. A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos*, v.1, n.2, p.162-173, 2005.

PEREIRA, D.B.C.; SILVA, P.H.F.; COSTAJÚNIOR, L.C.G. et al. Físico-química do leite e derivados – Métodos Analíticos. 2.ed. Juiz de Fora: EPAMIG, p.13-33, 2001.

PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S. et al. Bovine mastitis in Finland 2001: prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.2433-2441, 2004.

PHILPOT, N.W. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: Simpósio Internacional sobre Qualidade de leite, I, Curitiba. Anais... p.28-35, 1998.

PRATA, L. F. Fundamentos de ciência do leite. São Paulo: Unesp, 1998. 119p.

PRENDIVILLE, R.; PIERCE, K.M.; BUCKLEY, F. An evaluation of production efficiencies among lactating Holstein-Friesian, Jersey, and Jersey x Holstein-Friesian cows at pasture. *J. Dairy Sci.* v.92, p.6176–6185, 2009.

RAJCEVIC, M.; POTOČNIK, K.; LEVSTEK, J. Correlations between somatic cells count and milk composition with regard to the season. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, v.68, p.221-226, 2003.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F. et al. Relação entre mastite clínica e subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.9, n.3, p.287-290, 2003.

RIBEIRO, M.E.R.; KOLLING, G.J.; ZANELA, M.B. et al. Monitoramento da mastite em um rebanho Jersey no sul do Rio Grande do Sul – Resultados parciais 201. In: XIV Fórum de Produção Pecuária Leite e I Salão de Trabalhos Científicos. Anais... p.201-206, 2011.

REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, n.3, p.651-658, 2003.

SANTOS, M.V. Efeito da mastite sobre a qualidade de leite e derivados lácteos. In: Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite, 2, Ribeirão Preto, 2002. Anais... São Paulo: Instituto Fernando Costa, p.179-188, 2002.

SILVA, L.F.P.; PEREIRA, A.R.; MACHADO, P.F. et al. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II – lactose e sólidos totais. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science*, v.37, n.4, p.330-333, 2000.

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, p.21-26, 2000.

TRONCO, V. M. Manual para inspeção da qualidade do leite. 3.ed. Santa Maria: UFSM, 2008.

VICTÓRIA, C.; SILVA, A.V.; ELIAS, A.O. et al. *Corynebacterium bovis* e os padrões de contagem de células somáticas no Brasil. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia*, v.8, p.161-164, 2005.

WICKSTRÖM, E.; PERSSON-WALLER, K.; LINDMARK-MÅNSSON, H. et al. Relationship between somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte count and quality parameters in bovine bulk tank milk. *Journal of Dairy Research*, v.76, p.195-201, 2009.

ZAFALON, L.F.; AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A. et al. 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.

ZANELA, M.B. Caracterização do leite produzido no Rio Grande do sul, ocorrência e indução experimental do Leite Instável Não Ácido (LINA). Pelotas, 2004. 143f. Tese (Doutorado em Zootecnia – Produção Animal) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2004.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A inocuidade do leite vem sendo intensificada há vários anos e, com isso o rigor pela matéria prima de qualidade é exigido pela indústria e consumidores. Neste contexto, a mastite e a estabilidade do leite se tornam fatores decisivos para a coleta na propriedade e industrialização do mesmo.

A controvérsia entre os resultados encontrados por diversos pesquisadores a respeito do LINA e da mastite subclínica motivou a realização do presente estudo. Além disso, desconhece-se um trabalho que tenha focado diretamente essa relação. Salienta-se que os experimentos anteriores conduzidos pela equipe de pesquisa buscavam selecionar apenas os animais saudáveis na condução dos experimentos, tendo em vista que os objetivos geralmente direcionavam-se aos efeitos da nutrição animal sobre o LINA.

No planejamento desse estudo inédito acreditou-se que a forma mais precisa de avaliar o efeito da mastite subclínica na estabilidade do leite seria utilizando-se o leite de quartos mamários de um mesmo animal sob diferentes condições sanitárias (saudáveis e mastíticos). Dessa forma, estaria eliminando-se a maioria dos efeitos estranhos, como alimentação, metabolismo, fatores ambientais e variações individuais. Entretanto, a utilização de animais de apenas um rebanho, que era desejável, foi inviabilizada pelo reduzido número de animais que se apresentavam nessas condições.

Os resultados do presente trabalho demonstraram não haver relação entre o aumento na CCS, os níveis de estabilidade do leite e o LINA, descartando a hipótese apresentada no início da pesquisa.

Comprovando pesquisas anteriormente descritas a mastite subclínica causa alterações na composição do leite, variando conforme o aumento da contagem de células somáticas. Dentre os componentes químicos do leite, o teor de lactose é o mais afetado.

Entre as raças houve variação significativa principalmente nos teores de proteína bruta e sólidos totais. A interação entre a estabilidade do leite e raça apresentou diferença na produção de leite, percentagem de álcool, pH, densidade, teores de gordura, lactose, sólidos desengordurados e Contagem de Células Somáticas.

Acreditou-se que a forma mais precisa de avaliar o efeito da mastite subclínica na estabilidade do leite seria utilizando-se o leite de quartos mamários de um mesmo

animal sob diferentes condições sanitárias (saudáveis e mastíticos). Dessa forma, se eliminaria a maioria dos efeitos estranhos, como alimentação, metabolismo, fatores ambientais e variações individuais. Entretanto, a utilização de animais de apenas um rebanho, que era desejável, foi inviabilizada pelo reduzido número de animais que se apresentavam nessas condições.

Sugerem-se estudos futuros com um número maior de amostras de um mesmo agente etiológico e avaliação das alterações na composição, estabilidade e frações proteicas do leite causadas por este.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA GERAL

ABREU, A.S. **Leite instável não ácido e propriedades físico-químicas do leite de vacas Jersey**. 2008. 106 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

ABREU, A.S.; FISCHER, V.; KOLLING, G.J.; STUMPF, M.T.; RAVAZI, E.O.; PEREIRA, P.A.; CAMILLO, D.R.; VOLPATO, M.; MENDES, J.C.R.; WERNCKE, D.; ROSSETTO, G.K. Ocorrência do leite instável no oeste catarinense e sua relação com acidez e tempo de coagulação. In: **Conferencia Internacional de leche inestable**, II, Uruguai, p. 67, 2011.

ALDERSON, E. Small scale milk collection and processing in developing countries. E-mail conference. **FAO** 2000. Disponível em: www.fao.org/ag/aga/agap/lps/dairy/ecs/proceedings. Acesso em fev/2004.

AULDIST, M.J.; COATS, S.; ROGERS, G.L.; McDOWELL, G.H. Changes in the compositional of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.35, n.4, p.427-436, 1995.

AULDIST, M.J.; HUBLLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.53, p.28-36, 1998.

BALDI, A.; CHELI, F.; PINOTTI, L.; PECORINI, C. Nutrition in mammary gland health and lactation: advances over Eight Biology of Lactation in Farm Animals meetings. **Journal of Animal Science**, vol. 86, p.3-9, 2007;

BARBOSA, R.S. **Perfil eletroforético das frações protéicas e estabilidade do leite de vacas em lactação sob diferentes tipos de dietas**. 2011. 137 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Pelotas, 2011.

BARROS, L.; DENIS, N.; GONZALEZ, A.; NÚÑEZ, A. Prueba del alcohol em leche y relación con calcio iónico. **Revista Prácticas Veterinarias**, v.9, 315p, 1999.

BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. In: GONZÁLES, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELLI, R.S. (Ed.). **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, RS. p. 44-57, 2001.

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.

BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: An evolving disease. **The Veterinary Journal**. v.163, p.1-13, 2002;

BRASIL. **Instrução Normativa n. 32** de 30 de junho de 2011. Dispõe sobre a prorrogação de 6 (seis) meses a vigência dos prazos estabelecidos para a adoção de novos limites microbiológicos e de células somáticas, que entrariam em vigor a partir de 1º de julho de 2011 para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, dispostos na Tabela 2

do Anexo IV da Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Diário Oficial da União (da República Federativa do Brasil), Brasília, Seção 1, p.4, 30 jun. 2011a.

BRASIL. **Instrução Normativa n. 51** de 18 de setembro de 2002. Dispõe sobre regulamentos técnicos aplicados ao leite cru e pasteurizado. Diário Oficial da União (da República Federativa do Brasil), Brasília, Seção 1, n.183, p.13-22, 20 set. 2002.

BRASIL. **Portaria nº 56**, de 07 de dezembro de 1999. Submete à consulta pública os regulamentos técnicos sobre produção, identidade e qualidade de todos os tipos de leite e coleta de leite cru resfriado e transporte a granel. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, Seção 1, n.234, p. 34-49, 8 dez. 1999.

BRASIL. **Instrução Normativa n. 62** de 29 de dezembro de 2011. Alteração do caput da Instrução Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002. Diário Oficial da União (da República Federativa do Brasil), Brasília, 29 dez. 2011b.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA. **Projeções do agronegócio 2009/10 a 2019/20**. Brasília, 2010. 48p.

BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa/Tortuga, 1998. 98p.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T.; VEIGA, V.M.O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n.2, p. 33-35. Apr. 1999.

CEBALLOS, L.S.; MORALES, E.R.; ADARVE, G.D.T.; CASTRO, J.D.; MARTINEZ, L.P.; SANZ SAMPELAYO, M.R. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 22, p. 322–329, 2009.

COFFEY, E.M.; VINSON, W.E.; PEARSON, R.E. Potential of somatic cell concentration in milk as a sire selection criterion to reduce mastitis in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.69, n.8, p.2163-72, 1986;

COLDEBELLA, A. **Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas confinadas**. 2003, 99 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

COSTA, E.O.; WATANABE, E.T. Tratamento de mastite. In: Encontro de pesquisadores em mastite, 3., 1999. Botucatu. **Anais...** Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 1999. p.87-101.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; GARINO Jr., F.; et al. Portador: um importante elo na epidemiologia de mastite infecciosa bovina. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 28., 2001, Salvador, **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 2001. p.159.

COSTABEL, L.M.; CUATRIN, A.L.; PAEZ, R.; TAVERNA, M.; WALTER, E.G.; CAMPOS, S.; ADORNI, M.B. Estudio de la relación entre aptitud a la coagulación por cuajo y prueba de alcohol en muestras de leche de vacas individuales. In: **Avanços**

científicos e caminhos para inovações na América Latina. RIBEIRO, M.E.R.; ZANELA, M.B.; SCHAFFHAUSER JR., J. (Org.). Embrapa: Pelotas. p. 63-74. 2010.

CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com 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.

CHAVEZ, M.; NEGRI, L.; TAVERNA, M.A; CUATRÍN, A. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.201-206, 2004.

CLEGG, R.A.; BARBER, M.C.; POOLEY, L.; ERNENS, I.; LARONDELLE, Y.; TRAVERS, M.T. Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. **Livestock Production Science**, v.70, p.3-14, 2001.

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

DONATELE, D.M.; VIEIRA, L.F.P.; FOLLY, M.M. Relação do teste de Alizarol a 72% (v/v) em leite "in natura" de vaca com acidez e contagem de células somáticas: análise microbiológica. **Revista Higiene Alimentar**, v.7, n.110, 2003.

EMANUELSON, U.; DANELL, B.; PHILIPSSON, J. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts, and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.2, p.467-76, 1988.

FISCHER, V. Incidência, caracterização, quadro experimental e tratamento do leite instável não ácido (Lina) no Rio Grande do Sul. In: **Relatório técnico final das atividades desenvolvidas relativas ao projeto 474974/2003-0**. 2005. 70 p.

FISCHER, V. Avaliação do leite na fazenda: impacto do uso do alizarol/álcool sobre a cadeia produtiva do leite. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, IV, 2010. **Anais...** 2010a.

FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; MARQUES, L.T. Alimentação de vacas leiteiras: reflexos sobre a produção leiteira e características físico-químicas do leite. In: **Avanços científicos e caminhos para inovações na América Latina**. RIBEIRO, M.E.R.; ZANELA, M.B.; SCHAFFHAUSER JR., J. (Org.). Embrapa: Pelotas. p.125-138. 2010b.

FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; MARQUES, L.T.; ABREU, A.S.; MACHADO, S.C.; FRUSCALSO, V.; BARBOSA, R.S.; STUMPF, M.T.; KOLLING, G.J.; VIERO, V. Leite instável não ácido (LINA): prevenção na propriedade leiteira e impactos nos laticínios. In: SIMLEITE, III, **Anais...** Viçosa: Universidade Federal Viçosa, p.45-65. 2011a.

FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; MARQUES, L.T.; STUMPF, W. ; VIDAL, L.E.B. Prevalência, indução e tratamento do leite instável não ácido (LINA) no sul do Brasil. In: GONZALEZ, F.D.; PINTO, A.T.; ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; BONDAN, C. (Org.). **Qualidade do leite bovino: variações no trópico e no subtropico**. 1.ed. Passo Fundo: UPF, v. 1, p. 119-138. 2011b.

FIGUEIREDO, J. B. Mamite bovina: visão panorâmica de uma doença complexa In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, XI, 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 1995. p 176.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Milk and milk products**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/ai474e/ai474e10.htm>> Acesso em: 20/12/2011.

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MANSSON, H.; ANDRÉN, A.; AKERSTEDT, M.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk. **Animal**. v.3, p.710-717. 2009.

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MANSSON, H.; ANDRÉN, A.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Evaluation of quality changes in udder quarter milk from cows with low-to-moderate somatic cell counts. **Animal**. v.4, p.617-626. 2010.

FRUSCALSO, V. **Influência da oferta da dieta, ordem e estágio de lactação sobre as propriedades físico-químicas e microbiológicas do leite bovino e a ocorrência do Leite Instável Não Ácido**. 2007. 134p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia- Produção Animal) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2007.

GIANOLA, D.; HERINGSTAD, B.; KLEMETSDAL, G.; CHANG, Y. M. Longitudinal analysis of clinical mastitis at different stages of lactation in Norwegian cattle. **Livestock Production Science**. v.88, p.251-261, 2004.

GONZÁLEZ, F. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. p.5-21. 2001.

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

HARMON, R. J. Fatores que afetam a contagem de células somáticas. In: Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite. **Anais...** Curitiba: UFPR, p.7-15, 1998.

HOGAN, J.S; GONZALEZ, R.N; HARMON, R.J; NIKERSON, S.P; PANKEY, J.W; SMITH, K.L. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. **National Mastitis Council**, Medison, 1999. 222p.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). 2009. **Censo Agropecuário 2009**. <http://www.ibge.gov.br>.

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, p.167-188, 1981.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 1268p.

LANGENEGGER, J.; COELHO, N.M.; LANGENEGGER, C.H.; CASTRO, R.P. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, p.437-440, 1970.

LANGENEGGER, J.; VIANI, M.C.E.; BAHIA, M.G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.1, n.2, p.47-52. 1981.

LANGONI, H.; ARAÚJO, W.N.; SILVA, A.V.; SOUZA, L.C. Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacin bem como com sua associação. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.67, n.2, p.77-180, 2000.

LARANJA, L.F.; AMARO, F. Contagem de células somáticas: conceitos e estratégias de controle. **Balde Branco**, n.408, p.28-34, 1998.

LESCOURRET, F.; COULON, J.B. Modeling the impact of mastitis on milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.77, n.8, p.2289-2301, 1994.

LOPES, L.C. **Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido (LINA) na região de Casa Branca, Estado de São Paulo**. 2008, 64 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia e Engenharia dos Alimentos), Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2008.

MACHADO, S.C. **Fatores que afetam a estabilidade térmica do leite bovino**. 2010. 132 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

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, 2000.

MAGALHÃES, H.R.; FARO, L.E.; CARDOSO, V.L.; PAZ, C.C.P.; CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.415-421, 2006.

MARQUES, L.T. **Ocorrência do leite instável não ácido (LINA) e seu efeito sobre a composição química e aspectos físicos**. 2004. 68f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

MARQUES, L.T.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF Jr., W.; FISCHER, V. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (LINA) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.13, n.1, p.91-97, 2007.

MARQUES, L.T.; FISCHER, V.; ZANELLA, M.B.; STUMPF JR, W.; RIBEIRO, M.E.R.; BARROS, L.E.; RODRIGUES, C.M.; PETERS, M.D.P. Suplementação de vacas holandesa em estádio avançado de lactação. **Ciência Rural**, v.40, n.6, p.1392-1398, 2010a.

MARQUES, L.T.; FISCHER, V.; ZANELLA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JR, W.; MANZKE, N.E. Fornecimento de suplementos com diferentes níveis de energia e

proteína para vacas Jersey e seus efeitos sobre a instabilidade do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.12, p.2724-2730, 2010b.

MILLER, R.H.; EMANUELSSON, U.; PERSSON, E. et al. Relationships of milk somatic cell counts to daily milk yield and composition. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v.33, p.209-223, 1983.

MILKPOINT. **Demanda global por lácteos aumentou 15 % em 5 anos**. 15 dez/2008. Disponível em: www.milkpoint.com.br. Acesso em: 16 de julho de 2010.

MITAMURA, K. Studies on the alcohol coagulation of fresh cow milk. *J Fac Agric Hokkaido Univ*, 41: 102-364, 1937, apud OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Instabilidade da caseína em leite em leite sem acidez adquirida. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v.102, p.17-22, 2007.

MITCHEL, G.E.; ROGERS, S.A.; HOULIHAN, D.B. et al. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. 1. Composition of farm bulk milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.41, p.9-12, 1986.

MOLINA, L.H.; GONZALEZ, R.; BRITO, C.; CARRILLO, B.; PINTO, M. Correlation between heat stability and alcohol test of milks at a milk collection center. **Archivos de Medicina Veterinaria**. v.33, p.233-240, 2001.

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

MUNRO, G.L.; GRIEVE, P.A.; KITCHEN, B.J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.39, p.7-16, 1984.

NEGRI, L.; CHAVEZ, M.; TAVERNA, M.; ROBERTS, L.; SPERANZA, J. Factores que afectan la estabilidad térmica y la prueba de alcohol en leche cruda de calidad higiénica adecuada. **Informe técnico final Del proyecto**. INTA EEA / Rafaela - INTI CITIL Rafaela, 2001.

NORO, G.; GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. ; DÜRR, J. W. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, p.1129-1135, 2006.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Composição do leite com instabilidade da caseína. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p.259-263, 2006.

OLIVEIRA, C.F.; LOPES, L.C.; FRANCO, R.C.; CORASSIN, C.H. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, n.2, p.508-515, 2011

PACHECO, M.S. **Leite cru refrigerado do Agreste Pernambucano: caracterização da qualidade e do sistema de produção**. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2011.

PALES, A.P.; SANTOS, K.J.G.; FIGUEIRAS, E.A.; MELO, C.S. A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v.1, n.2, p.162-173, 2005.

PECORARI, M.; FPSSA E., AVANZINI, G.; MARIAN, P. Milk with abnormal coagulation: acidity, chemical composition and observation on the metabolic profile of the cow. *Sci. Tec. Latt. Cas.* XXXV: 4:263-278, 1984. In: PONCE CEBALLO, P.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Ed.: GONZÁLEZ, F.H.D. et al., Porto Alegre, 2001.

PEREIRA, D. B. C. et al. **Físico-química do leite e derivados – Métodos Analíticos**. 2.ed. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001.

PONCE, P. Caracterização da síndrome do leite anormal: um enfoque das suas possíveis causas e correção. In: Simpósio Internacional sobre Produção Intensiva de Leite, IV, **Anais...** Instituto Fernando Costa (Caxambu), p.61-76, 1999.

PONCE CEBALLO, P.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Ed.: GONZÁLEZ, F.H.D. et al., Porto Alegre, 2001.

PÖSÖ, J.; MÄNTYSAARI, E.A. Relationships between clinical mastitis, somatic cell score and production for the first three lactations of Finnish Ayrshire. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.7, p.1284-91, 1996.

PHILPOT, N.W. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: Simpósio Internacional sobre Qualidade de leite, I, Curitiba. **Anais...** p.28-35, 1998.

PHILPOT, N.W.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Piracicaba: Westfalia Surge/ Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002. 192p.

RADOSTITS, O. M.; CLIVE, C. G.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e ovinos**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1123p.

RAJCEVIC, M.; POTOČNIK, K.; LEVSTEK, J. Correlations between somatic cells count and milk composition with regard to the season. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v.68, p.221-226, 2003.

RANGEL, A.H.N.; MEDEIROS, H.R.; SILVA, J.B.A.; BARRETO, M.L.J.; LIMA JÚNIOR, D.M. Correlação entre a contagem de células somáticas (CCS) e o teor de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado do leite. **Revista Verde**. v.4, n.3, p.57-60. 2009.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR. W.; GOMES, J.F.; SCHIRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastite clínica e subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras

na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**. v.9, n.3, p.287-290, 2003.

RIBEIRO, M.E.R.; KROLOW, A.C.R.; BARBOSA, R.S.; BORGES, C.D.; ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; HAUSEN, L.J.V. Ensaio preliminares sobre o efeito do leite instável não ácido (LINA) na industrialização do iogurte batido. In: Congresso brasileiro de qualidade do leite, II, Goiânia-GO, 2006. **Anais...** Goiânia - GO: Talento, 2006.

RIBEIRO, M.E.R.; KOLLING, G.J.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M.T.; SCHRAMM, R.C. Monitoramento da mastite em um rebanho Jersey no sul do Rio Grande do Sul – Resultados parciais 201. In: XIV Fórum de Produção Pecuária Leite e I Salão de Trabalhos Científicos. **Anais...** p.201-206, 2011.

RIBEIRO JR, E.; SILVA, M.H.; VIEGAS, S.A.A.; RAMALHO, E.J.; RIBEIRO, M.D.; OLIVEIRA, F.C.S. *California Mastitis Test* (CMT) e whiteside como métodos de diagnóstico indireto da mastite subclínica. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.4, p. 680-686, 2008.

ROMA JUNIOR, L.C. **Características quantitativas e qualitativas da proteína do leite produzido na região Sudeste**. 2008. 148 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo.

ROSEMBERGER, G. **Exame Clínico dos Bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 1993. 306p.

RUPP, R.; BOICHARD, D. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, production, udder type traits, and milking ease in first lactation Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.10, p.2198-204, 1999.

SANTOS, M.V. Efeito da mastite sobre a qualidade de leite e derivados lácteos. In: Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle de Mastite, II, Ribeirão Preto, 2002. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Costa, p.179-188, 2002.

SILVA, L.F.P. et al. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II – lactose e sólidos totais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.37, n.4, p.330-333, 2000.

SEARS, P. M.; GONZÁLEZ, R. N.; WILSON, D. J.; et al. Procedures for mastitis diagnosis and control. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v.9, n.3, Nov.1993.

SOBHANI, S.; VALIZADEH, R.; NASERIAN, A. Alcohol stability of milk and its relation to milk and blood composition in Holstein dairy cows. *Journal of Animal Science* v. 80, Suppl. 1/J. **Dairy Science** v. 85, Suppl. 1, 1998.

SCHÄELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. In: Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite, II, 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CIETEP/FIEP, p.21-26, 2000.

SCHULTZ, L.H. Somatic cells in milk physiological aspects and relationship to amount and composition of milk. **Journal of Food Protection**. v.40, p.125-131, 1977.

SHUSTER, D.E.; HARMON, R.J.; JACKSON, J.A.; HEMKEN, R.W. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.11, p.3763-74, 1991.

TOZZETTI, D.S. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.10, 2008.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3.ed. Santa Maria: UFSM, 2008.

VELLOSO, C.R.V. Noções básicas da acidez In: BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. (Ed.) **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA/São Paulo: Tortuga, 1998.

VENTURA, R. V.; LEME, T A. R. P.; MENDONÇA, L. C.; DIAS, M. S.; AMORIM, M. A. Contagem de células somáticas e seus efeitos nos constituintes do leite. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. Goiânia, II, **Anais...** Goiânia: 2006. p.187-189.

YOSHIDA, S. Studies in the Utrecht abnormality of milk in the Miyuki Dairy Farm. *Journal Japanese Applied Biology Science Hir. University* 19:39-54, 1980. In: PONCE CEBALLO, P.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Ed. GONZÁLEZ, F.H.D. et al., Porto Alegre, 2001.

WICKSTRÖM, E.; PERSSON-WALLER, K.; LINDMARK-MÅNSSON, H.; ÖSTENSSON, K.; STERNESJÖ, A. Relationship between somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte count and quality parameters in bovine bulk tank milk. **Journal of Dairy Research**, v.76, p.195-201, 2009.

ZANELA, M. B. et al. Indução experimental ao leite instável não ácido (LINA) em animais da raça Jersey através de restrição alimentar. In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, I, Passo Fundo, 2004. **Anais...** Passo Fundo: UPF, 2004a.

ZANELA, M.B. **Caracterização do leite produzido no Rio Grande do sul, ocorrência e indução experimental do Leite Instável Não Ácido (LINA)**. 2004. 143 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2004b.

ZANELA, M.B.; MARQUES, L.T.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF Jr., W. ; BARROS, L.E.; RODRIGUES, C.M. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.835-840, 2006a.

ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; BARBOSA, R.S.; MARQUES, L.T.; STUMPF Jr., W. ; ZANELA, C. Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.1, p.153-159, 2006.

ZANELA, M.B; RIBEIRO, M.E.R.; FISCHER, V. GOMES, J.F.; STUMPF Jr., W. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.1009-1013, 2009.

ZANELA, M.B.; KOLLING, G.J.; RIBEIRO, M.E.R.; FISCHER, V. Análises de composição e estabilidade do leite ao álcool. In: Conferencia Internacional sobre Leche Inestable, II, 2011, Colonia del Sacramento - Uruguay. **Anais...** Universidad de la Republica – UY, 2011.

