

## Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem de células somáticas no leite

[Effects of temperature and storage on somatic cell counts in milk]

G.N. Souza<sup>1</sup>, M.R. Silva<sup>1</sup>, F.S. Sobrinho<sup>1</sup>, R.O. Coelho<sup>2</sup>, M.A.V.P. Brito<sup>1</sup>, J.R.F. Brito<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Gado de Leite  
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco  
36038-330 - Juiz de Fora, MG

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia e Bioquímica - Universidade Federal de Juiz de Fora – Juiz de Fora, MG

### RESUMO

Avaliou-se o efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem de células somáticas (CCS). Amostras de leite de 21 vacas, coletadas e armazenadas às temperaturas de 5, 27, 32 e 36°C e analisadas no 1º, 3º, 5º e 7º dia após coleta, foram classificadas em três grupos (células/ml): baixa (236.000±164.000), média (624.000±356.000) e alta CCS (1.320.000±945.000). O delineamento experimental foi o de parcelas subdivididas. As médias da CCS foram iguais ( $P>0,05$ ) para amostras mantidas à temperatura de 5°C e analisadas entre o primeiro e o sétimo dias após a coleta e para aquelas mantidas às temperaturas 5, 27, 32 e 36°C e analisadas no primeiro dia. Médias diferentes ( $P<0,05$ ) da CCS foram observadas para amostras mantidas a 27, 32 e 36°C a partir do 5º, 5º e 3º dias, respectivamente. Foram observados decréscimos de 57,6%, 58,5% e 27,9% nos valores iniciais da CCS nas amostras classificadas como baixa, média e alta, respectivamente. Os resultados mostram a necessidade de se encaminhar as amostras de leite para CCS sob refrigeração e de ser feita análise até sete dias após a coleta.

Palavras-chave: contagem de células somáticas, qualidade do leite, mastite bovina

### ABSTRACT

*Effects of temperature and storage duration on somatic cell counts (SCC) of milk samples were studied in a split plot design with seven replicates. Samples from 21 cows were maintained at 5, 27, 32 or 36°C (plots) and analyzed after 1, 3, 5 and 7 days of storage (split plots). Based upon an initial analysis, samples were classified into three groups: low (236,000±164,000), medium (624,000±356,000) and high (1,320,000±945,000) SCC/ml. No significant differences in SCC ( $P>0.05$ ) were observed among storage temperatures for milk samples tested after one day of storage. For milk samples stored at 5°C, SCC averages did not significantly change ( $P>0.05$ ) until the seventh day after collection. On days 5, 5 and 3, respectively, average SCC decreased for milk samples stored at 27, 32 and 36°C. Reductions of 57.6% (from 236,000 to 100,000), 58.5% (from 624,000 to 259,000) and 27.5% (from 1,320,000 to 952,000) from initial numbers of somatic cells were observed for samples classified as low, medium and high, respectively. Milk samples must be kept under refrigeration until analysis, and SCC must be measured within 7 days of sample collection.*

*Keywords: somatic cell count, milk quality, bovine mastitis, storage temperature, storage duration*

---

Recebido para publicação, em 21 de outubro de 2004

Recebido para publicação, após modificações, em 20 de julho de 2005

E-mail: gnsouza@cnp.gl.embrapa.br

## INTRODUÇÃO

A contagem de células somáticas (CCS) é um padrão usado mundialmente para definir a qualidade do leite cru, sendo parte do conjunto de atributos essenciais de qualidade que incluem composição, aspectos sensoriais, número de bactérias e ausência de drogas e resíduos químicos (Heesch e Reichmuth, 1995). A CCS é, também, indicador de saúde da glândula mamária de vacas, sendo usada para estimar a proporção de quartos mamários e de animais infectados no rebanho (Dohoo e Leslie, 1991; Harmon, 1994, Ott e Wells, 1999; Cook et al., 2002).

As células somáticas encontradas no leite pertencem a dois grupos: as células epiteliais secretoras de leite e os leucócitos (neutrófilos, macrófagos e linfócitos). O número e a proporção desses tipos de células são influenciados pelos estados fisiológicos e patológicos da glândula mamária (Burvenich et al., 1995; Paape e Contreras, 1997). No leite de quartos mamários livres de infecção, predominam os macrófagos (35 a 79%), seguidos por neutrófilos (3 a 26%), linfócitos (10 a 24%) e células epiteliais (2 a 15%); no leite de quartos mamários infectados, os neutrófilos podem alcançar quase 100% do total de células (Burvenich et al., 1995; Paape et al., 2000).

O fator mais importante que interfere na CCS no leite é a presença ou não de infecção da glândula mamária. Em animais livres de infecção intramamária, há pequeno número de células somáticas, com contagens de 50 mil ou menos por mililitro de leite (Paape e Tucker, 1966; Shearer et al., 1992; Paape et al., 2000). Em presença de inflamação, o número de células aumenta, sendo comuns contagens acima de 500 mil por ml de leite e, em alguns casos, vários milhões por mililitro (Burvenich et al., 1995).

Três procedimentos são aceitos pela Federação Internacional de Laticínios (IDF) (International..., 1995) para a enumeração de células somáticas: o método microscópico, o método de citometria de fluxo por meio de equipamento automático e a contagem em *Coulter Counter*. De acordo com o IDF

(International..., 1995), amostras de leite com conservante e mantidas de 2°C a 6°C devem ser analisadas em três dias para se determinar a CCS. Normas americanas (Marshall, 1992) admitem que amostras de leite com conservante e mantidas de 0 a 4,4°C sejam analisadas em até sete dias após a coleta.

No Brasil, a CCS foi recentemente incluída como um requisito para aceitação do leite pela indústria (Brasil, 2002). Dados dos laboratórios que realizam análises para determinação da qualidade do leite mostram alta porcentagem de amostras analisadas com cinco ou mais dias de coleta. Além disso, por dificuldade logística, elevada porcentagem de amostras é enviada ao laboratório à temperatura ambiente (Brito et al., 2003; Ribas et al., 2003). Meyer et al. (2002) verificaram diminuição dos valores iniciais de CCS transformados para logaritmo em amostras de leite mantidas sob diferentes temperaturas e analisadas com até 15 dias após a coleta.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito diário do armazenamento de leite sob diferentes temperaturas e a influência do número de células inicial de amostras com baixa, média e alta CCS.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados exames microbiológicos e CCS em 60 vacas em lactação pertencentes ao Campo Experimental de Coronel Pacheco da Embrapa Gado de Leite. Vinte e uma vacas foram amostradas e distribuídas em três grupos de acordo com a CCS ( $\times 1.000$  células/ml), classificadas como de baixa ( $236 \pm 164$ ), média ( $624 \pm 356$ ) e alta contagem ( $1.320 \pm 945$ ) (Tab. 1). De cada animal foram obtidos dois litros de leite da produção total diária e distribuídos em frascos de 40ml contendo Bronopol® como conservante, após homogeneização.

Os exames microbiológicos foram realizados de acordo com as recomendações do National... (1990). A CCS foi determinada em equipamento Bentley Somacount 300, seguindo-se as recomendações da Federação Internacional de Laticínios (International..., 1995).

Tabela 1. Número e identificação de patógenos de mastite isolados de acordo com os grupos de contagem de células somáticas(CCS)

Patógeno	Grupo de CCS		
	Baixa	Média	Alta
Ausente	4	-	-
<i>Corynebacterium</i> spp.	2	3	-
<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase -	1	3	1
<i>Streptococcus</i> spp. esculina +	-	1	1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	5
Material contaminado*	-	-	1
Média ± desvio-padrão (CCS × 1.000/ml)	236 ± 164	624 ± 356	1.320 ± 945

\* Presença de mais de três colônias diferentes. Observação: um dos animais apresentou infecção mista por *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus* spp. coagulase negativa.

Utilizou-se o delineamento em parcelas subdivididas e com medidas repetidas no tempo, em que cada animal assumiu o papel de um bloco. A parcela foi definida como sendo as temperaturas 5, 27, 32 e 36°C, e as subparcelas como os tempos decorridos entre coleta e análise, ou seja, 1, 3, 5 e 7 dias. As amostras foram armazenadas em geladeira comercial com temperatura controlada, 5°C, ou em estufa incubadora para as temperaturas 27, 32 e 36°C. Foram feitas análises de variância e comparação de médias da CCS usando-se o teste t de Student. Os resultados originais da CCS (x 1.000 células) foram transformados para logaritmo natural (Ln), de acordo com Sampaio (1998). Apesar de a comparação de médias ter sido realizada com dados transformados para Ln, as médias foram apresentadas com os dados originais de CCS (x 1.000 células) (Sampaio, 1998). Para avaliar a variação da CCS em função da temperatura e do tempo de estocagem, foram aplicados modelos de regressão linear a partir dos dados originais e transformados para Ln. As análises estatísticas foram feitas com o uso do programa Sisvar (Ferreira, 1999; 2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No grupo de baixa CCS e presença de patógenos de mastite, não houve isolamento em 57% das amostras. No de média CCS, foram isolados *Staphylococcus* spp. coagulase negativa e *Streptococcus* spp. esculina positivo e, no de alta, *Streptococcus agalactiae* (Tab. 1). No primeiro dia após a coleta, não houve diferenças (P>0,05) na CCS entre as temperaturas testadas (Tab. 2). No terceiro dia após a coleta, a média da CCS das amostras mantidas a 5°C foi igual (P>0,05) à média das amostras mantidas a 27°C e diferente

(P<0,05) das mantidas a 32 e 36°C. No quinto dia de armazenamento, as médias das amostras mantidas a 5, 27 e 32°C foram diferentes (P<0,05) entre si, e as mantidas a 32 e 36°C foram iguais (P>0,05) entre si. No sétimo dia, os valores foram todos diferentes (P<0,05) entre si.

Tabela 2. Contagem de células somáticas (× 1.000 células/ml) de acordo com o tempo e a temperatura de armazenamento

Tempo (dias)	Temperatura (°C)			
	5	27	32	36
1	726aA	693aA	691aA	686aA
3	725aA	740abA	676bcA	653cB
5	738aA	658bB	570cB	559cC
7	755aA	592bC	490cC	436dD

Letras minúsculas e maiúsculas distintas nas linhas e colunas, respectivamente, indicam valores diferentes (P<0,05) pelo teste t de Student. Valores de CCS transformados para Ln.

Conforme recomendação (International..., 1995), as amostras de leite com Bronopol®, mantidas entre 2°C e 6°C, devem ser analisadas para CCS dentro de três dias. Não houve diferenças nos valores de CCS do primeiro ao sétimo dia após coleta nas amostras de leite mantidas a 5°C. Segundo Marshall (1992), as análises podem ser feitas até sete dias após a coleta, desde que a temperatura de armazenamento esteja entre 0 e 4,4°C. Verificou-se decréscimo dos valores iniciais da CCS transformados para Ln em função da temperatura de armazenamento e do tempo entre a coleta e a análise das amostras de leite. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Meyer et al. (2002).

A porcentagem de queda de CCS verificada neste estudo é preocupante, considerando que uma parcela das amostras analisadas no Brasil

### *Efeito da temperatura...*

não é armazenada nas temperaturas recomendadas, sendo enviada aos laboratórios à temperatura ambiente. Brito et al. (2003) afirmaram que apenas 60% do total das amostras de leite proveniente dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro chegam ao laboratório com cinco dias após a coleta. Dessa forma, os valores reais da CCS poderiam estar subestimados, pois os efeitos do tempo e da temperatura de armazenamento são evidentes neste estudo. Como a CCS é um quesito do regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado proposto pelo Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2002), existe a possibilidade de os valores estarem abaixo desse limite e serem classificados erroneamente como adequados pela indústria. Nessa situação, valores subestimados da CCS de amostras de leite do rebanho poderiam causar prejuízos à indústria, caso se adotasse o critério de pagamento pela qualidade com base na CCS.

Os valores subestimados da CCS poderiam também causar prejuízos ao produtor, que teria um falso indicador do estado de saúde da glândula mamária do rebanho. Desse modo, sugere-se mais discussão considerando-se o conhecimento existente e as normas internacionais (International..., 1995; Marshall, 1992), para regulamentação das recomendações relativas à temperatura e ao tempo de armazenamento das amostras até serem analisadas. Assim, os resultados da CCS poderão ser usados como critério de pagamento por qualidade, como indicador de saúde da glândula mamária e para atender à legislação.

A comparação entre as médias da CCS em amostras analisadas um dia após a coleta e mantidas a 5°C e as analisadas sete dias após a coleta e mantidas a 36°C revelou diferença no padrão de decréscimo da CCS de acordo com os grupos. O percentual de queda para os grupos de baixa, média e alta CCS foi de aproximadamente 57,6% (236.000 para 100.000), 58,5% (624.000 para 259.000) e 27,9% (1.320.000 para 952.000), respectivamente, quando se comparam amostras armazenadas a 5°C e analisadas no primeiro dia e amostras a 36°C e analisadas no sétimo dia. Sugere-se que o decréscimo da CCS, atribuído aos efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento de acordo com os grupos da CCS, ocorra em razão da proporção e meia-vida

dos tipos celulares (Burvenich et al., 1995; Paape, 2000).

### CONCLUSÕES

Houve decréscimo dos valores iniciais da CCS em amostras de leite em função da temperatura e do tempo de armazenamento com efeito mais intenso em amostras de leite classificadas como baixas e médias CCS em relação às classificadas como altas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF), 18 set. 2003.
- BRITO, J.R.F.; SOUZA, G.N.; BRITO, M.A.V.P. et al. Panorama da Qualidade do leite na região Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais e Rio de Janeiro. In: BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Epamig/CT/ILCT, 2003. p.47-61.
- BURVENICH, C.; GUIDRY, A.J.; PAAPE, M.J. Natural defence mechanisms of the lactating and dry mammary gland. In: INTERNATIONAL MASTITIS SEMINAR, 3., 1995, Tel Aviv. *Proceedings...* Tel Aviv: M. Lachmann Printers, 1995. Livro 1, seção 1, p.3-13.
- COOK, N.B.; BENNETT, T.B.; EMERY, K.M. et al. Monitoring nonlactating cow intramammary infection dynamics using DHI somatic cell count data. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.1119-1126, 2002.
- DOHOO, J.R.; LESLIE, K.E. Evaluation of changes in somatic cell counts as indicators of new intramammary infections. *Prev. Vet. Med.*, v.10, p.225-237, 1991.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: versão 4.3 (Build 43). Lavras: Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras, 2003.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factor affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, v.77, p.2103-2112, 1994.

- HEESCHEN, W.; REICHMUTH, J. Mastitis: influence on qualitative and hygienic properties of milk. In: INTERNATIONAL MASTITIS SEMINAR, 3., 1995, Tel Aviv. *Proceedings...* Tel Aviv: M. Lachmann Printers, 1995. Book 1, section 3, p.3-13.
- INTERNATIONAL Dairy Federation. Milk: enumeration of somatic cell. Brussels: IDF/FIL, 1995. 8p. (IDF Standard, 148A).
- MARSHALL, R.T. *Standard methods for the examination of dairy products*. Baltimore: American Public Health Association, 1993. 546p.
- MEYER, P.M.; MACHADO, P.M.; COLDEBELLA, A., et al. D. Methods of milk storage and age of samples on milk components percentage, somatic cells count and urea nitrogen. *J. Dairy Sci.*, v.85, suppl.1, p.285, 2002.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Current concepts of bovine mastitis. Madison: NMC, 1996. 64p.
- OTT, S.L.; WELLS, S.J.; SMITH, M.A. Bulk tank somatic cell counts of U.S. milk supply, 1997. In: ANNUAL MEETING. NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 38., 1999, Arlington. *Proceedings...* Arlington: NMC, 1999. p.154-156.
- PAAPE, M.J.; CONTRERAS, A. Historical perspective on the evolution of the milk somatic cell count. *Flem. Vet. J.*, v.66, suppl., p.93-105, 1997.
- PAAPE, M.J.; SHAFER-WEAVER, K.; CAPUCO, A.V. et al. Immune surveillance of mammary gland secretion during lactation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.480, p.259-277, 2000.
- PAAPE, M.J.; TUCKER, H.A. Somatic cell content variation in fraction-collected milk. *J. Dairy Sci.*, v.49, p.265-267, 1966.
- RENEAU, J.K. Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. *J. Dairy Sci.*, v.69, p.1708-1720, 1986.
- RIBAS, N.P.; PAULA, M.C.; ANDRADE, U.V.C. Contagem e escore de células somáticas em amostras de leite de tanques nos Estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo. In: BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Epamig/CT/ILCT, 2003. p.27-38.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 1998. 221p.
- SHEARER, J.K.; SCHMIDT, R.H.; RENEAU, J.K. Monitoring milk quality and udder health. In: VAN HORN, H.H.; WILCOX, C.J. (Eds.). *Large dairy herd management*. Champaign: American Dairy Science Association, 1992. p.475-488.