

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

Parecer

*Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Luiz Francisco Prata e aprovada pela Comissão Julgadora em 27.09.84.
Campinas, 27 de setembro de 1984.*

*impl.
27/10/92
PROJETO*

[Assinatura]
Presidente da Banca

APLICAÇÃO DO MÉTODO DE CONTAGEM MICROSCÓPICA NO
CONTROLE MICROBIOLÓGICO DO LEITE CRU.

LUIZ FRANCISCO PRATA

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ SÁTIRO DE OLIVEIRA

14/84

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

- 1984 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Este trabalho é dedicado à Alda Maria ,
minha esposa, pela compreensão e incentivo,
e aos meus filhos, Camila e Bruno, significa
do maior do meu empenho.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Sâtiro de Oliveira, pela orientação e amizade demonstrada em todos os momentos;

Ao Professor Dr. Adalberto José Crocci, do Departamento de Ciências Exatas da FCAVJ/UNESP, pela orientação e disponibilidade quando do tratamento estatístico dos resultados;

À Professora Marta A. Barbieri Belarmino, pela paciência e dedicação com que efetuou a revisão do original;

Às indústrias de laticínios, que gentilmente facilitaram o acesso às suas dependências;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal-UNESP, configurada pela sua Direção, pela permissão de afastamento para frequência em curso de pós-graduação;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pela concessão de bolsa de estudos, que muito contribuiu na realização deste trabalho;

E à Associação Brasileira de Indústrias de Alimentos-ABIA, pelo fornecimento das cópias xerox e capas.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	I
SUMMARY.....	II
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
Qualidade Microbiológica do Leite Cru.....	3
Principais Métodos para Exame e Classificação do Leite...	10
Contagem Padrão em Placas.....	12
Métodos de Redução.....	14
Azul de Metileno.....	15
Resazurina.....	17
Contagem microscópica.....	19
MATERIAL E MÉTODOS	
Amostras.....	30
Contagem Microscópica (CM).....	31
Contagem Padrão em Placas (CPP).....	32
Teste de Redução do Azul de Metileno (TRAM).....	33
Contagem de Células Somáticas.....	33
Análise Estatística.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	
Adaptação do Método.....	35
Aplicação do Método.....	37

Comparação do Método Microscópico com a Contagem em Placas.....	49
Comparação do Método Microscópico com o Teste de Redutase.....	51
Outras Comparações.....	55
Qualidade Microbiológica do Leite Cru.....	58
Aplicação da Contagem Microscópica a Leite Pasteurizado....	64
CONCLUSÕES.....	70
RECOMENDAÇÃO.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
APÊNDICE.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Desenvolvimento de bactérias no leite em função da temperatura.....	5
2. Classificação das bactérias de acordo com o desenvolvimento máximo e o limite de temperatura.....	5
3. Leite de excelente qualidade, contagem nula.....	42
4. Leite de boa qualidade.....	42
5 e 6. Leite de qualidade regular.....	43
7 e 8. Leite de qualidade ruim.....	44
9. Leite de péssima qualidade.....	45
10. Representação da Fig. 9 no aumento de 400 X.....	45
11. Leite anormal, excesso de células somáticas.....	47
12. Leite anormal, evidência de mastite estreptocócica.	47
13. Campo visual típico de uma película corada, sem a presença de células.....	48
14. Contrastes entre microrganismos, células somáticas e película de leite.....	48

Figura

Página

- | | | |
|-----|--|----|
| 15. | Comparação gráfica dos resultados da contagem <u>mi</u>
croscópica com a contagem em placas, em 215 <u>amo</u>
tras de leite cru..... | 50 |
| 16. | Comparação gráfica dos resultados da contagem <u>mi</u>
croscópica com o teste de redutase, em 319 <u>amo</u>
tras de leite cru..... | 52 |
| 17. | Comparação gráfica dos resultados da contagem <u>pa</u>
drão em placas com o teste de redutase, em 215
amostras de leite cru..... | 54 |
| 18. | Correlação entre tempos de redução proporcionados
por soluções de azul de metileno com concentrações
finais de 1:200.000 e 1:250.000..... | 56 |
| 19. | Comparação gráfica dos resultados da contagem <u>mi</u>
croscópica de células somáticas com o teste de <u>re</u>
dutase, em 319 amostras de leite cru..... | 57 |

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro		Página
I	Comportamento da contagem microscópica frente a amostras de baixa, média e alta contagem, tendo como referência a contagem padrão em placas.....	38
II	Coefficientes de correlação linear (associações) estimados entre as técnicas, dos resultados referentes a leite tipo "Especial", tipo "B" e do total dos resultados, independentemente do tipo de leite.....	59
III	Classes de qualidade definidas pelos valores médios obtidos dos resultados da contagem microscópica (CM), contagem padrão em placas (CPP) e teste de redução do azul de metileno (TRAM).....	62
IV	Sistema de classificação obtido com base nas inter-relações dos resultados da contagem microscópica (CM), contagem padrão em placas (CPP) e teste de redução do azul de metileno.....	65
V	Resultados das contagens microbiológicas (CPP e CM), de células somáticas (CMCS) e tempo de redução do azul de metileno (TRAM), em amostras de leite pasteurizado, tipo "Especial", de três diferentes marcas..	67
VI	Resultado das contagens microbiológicas (CPP e CM), de células somáticas (CMCS) e tempo de redução do azul de metileno (TRAM), em amostras de leite pasteurizado tipo "B".....	68

RESUMO

Partindo-se da importância do controle microbiológico do leite recebido na plataforma das indústrias de laticínios, a pesquisa de provas específicas que ofereçam resultados rápidos e compatíveis com a perecibilidade do produto, tem sido o objetivo do serviço de inspeção sanitária. Nesse aspecto, não encontramos, sendo utilizado em nosso meio, um teste que ofereça resultados que permitam o controle efetivo da matéria prima antes que esta entre na linha de processamento.

No presente trabalho foi, então, estudado o método de contagem microscópica de microrganismos, com a intenção de comprovar a sua aplicabilidade como método rápido para o controle microbiológico do leite ao chegar à plataforma. Os resultados alcançados permitiram concluir que esse método se correlacionou muito bem com a contagem padrão em placas, tendo se comportado, também, de forma semelhante ao método de redução do azul de metileno.

A aplicação do método microscópico na avaliação da qualidade microbiológica de 319 amostras de leite cru, incluindo leite tipo "B", apresentou resultados que permitiram recomendá-lo como teste rápido para o controle de qualidade a nível de plataforma das indústrias de laticínios. Mostrou-se útil, também, no fornecimento de informações adicionais importantes, como por exemplo na detecção de leite mastítico. Ressalta-se, ainda, que sua aplicação a leite pasteurizado permitiu uma indicação da qualidade microbiológica do leite antes de ser submetido ao tratamento térmico.

SUMMARY

The microbiological quality is the starting point for the milk quality control in the receiving platform of the dairy industry, therefore the search for specific rapid tests has been the aim of researchers involved in milk quality inspection. In Brazil we have not found a microbiological test being used which could effectively evaluate the raw milk quality before it enters the processing line.

In the present research work it was studied the direct microscopic count method to show its applications as a rapid test for controlling the milk quality in our Brazilian industries. The results indicated a very good correlation between the microscopic count and the standard plate count. As a quality control test the microscopic method was equivalent to the methylene blue reduction test.

In assessing the microbiological quality of 319 samples of raw milk, including also type B milk, the microscopic count method proved to be a very good rapid test for controlling the raw milk quality in the dairy industry. This method also gave additional informations regarding the milk quality, like for instance the indication of mastitic milk. It could also be pointed that the microscopic count when applied to pasteurized milk gives a good idea of the microbiological quality of this milk right before it's pasteurization.

INTRODUÇÃO

O leite "in natura", tal como é produzido pelas glândulas mamárias, é um produto naturalmente elaborado com a finalidade de servir de alimento e, como tal, está pronto para ser consumido, independentemente de qualquer conceito de qualidade. Entretanto, devido à intervenção do homem na exploração econômica das espécies leiteiras domésticas, desde a obtenção até a distribuição para o consumo humano, e também pelas próprias características naturais do produto como alimento, nenhum outro aspecto assume tanta importância quanto a qualidade microbiológica.

A partir do conhecimento de que a presença de microrganismos no leite poderia, além de afetar a saúde do consumidor, causar a sua deterioração, tornou-se evidente a importância, do ponto de vista de saúde pública e industrial, do exame bacteriológico do leite, de forma regular e rotineira.

Atualmente, no Brasil, através do "Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal"¹¹, todos os estabelecimentos de laticínios são obrigados a controlar as condições do leite que recebem, mediante a realização de provas específicas. A nível de plataforma de recepção, além das análises para a determinação da acidez, que conferem uma estimativa indireta da carga de germes, está prevista a toma

da de amostras individuais, por produtor, visando a determinação do padrão bacteriológico.

Com exceção da redução rápida da resazurina, que não é amplamente difundida em nosso meio, as demais análises microbiológicas adotadas são excessivamente demoradas, contrastando com a perecibilidade do produto e com os objetivos de sua realização, retirando o caráter preventivo e passando a funcionar com características punitivas.

O método de contagem microscópica de microrganismos, desenvolvido por R. S. BREED, alia as vantagens da obtenção rápida dos resultados à confiabilidade científica destes, além de ser pouco dispendioso, de fácil execução, requerendo apenas prática e sensibilidade, para que haja a devida precisão. Essa precisão, bem como a reprodutibilidade dos resultados, dependem do treinamento efetivo de pessoal qualificado na "performance" e no uso da técnica e, nessas condições, amostras individuais podem ser examinadas em tempo inferior a quinze minutos.

O propósito na execução deste trabalho foi, além de verificar as possíveis correlações entre as análises microbiológicas realizadas em nosso meio com a contagem microscópica, explorar as várias possibilidades de aplicação desse método. Assim, objetivou-se, principalmente, verificar sua "performance" e aplicabilidade para o controle microbiológico antecipado, a nível de plataforma de recepção das indústrias de laticínios, de forma rotineira, tomando como referência, para comparações, o teste de redução do azul de metileno e a contagem padrão em placas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Qualidade Microbiológica do Leite Cru

Muitos são os aspectos pelos quais a qualidade microbiológica do leite poderia ser analisada. Entretanto, a sua aceitação como alimento saudável e nutritivo faz ressaltar a importância de dois aspectos a ela relacionados: o de saúde pública e o tecnológico. Quando se utilizam procedimentos de produção que procuram manter a população total de germes a níveis mínimos, não se assegura definitivamente a ausência de organismos patogênicos, mas assegura-se a possibilidade de contar com características organolépticas mais próximas às originais²⁹.

Exceção feita a algumas enfermidades animais e a processos patológicos localizados na glândula mamária, o leite produzido por fêmeas em lactação é estéril⁴⁷. No entanto, sua contaminação se inicia no próprio animal, geralmente por microrganismos saprófitas que têm acesso aos tetos e canais lactíferos, todavia revestindo-se de escassa importância, tanto quantitativamente como pelo fato de não se desenvolverem bem no leite^{47 81}.

Os microrganismos presentes, desse modo, dependem quase exclusivamente das fontes de contaminação, enquanto uma variedade de outros fatores regulam o seu desenvolvimento. Imediatamente após a sua obtenção, o leite apresenta uma resistência natural, da qual vantagens podem ser obtidas. Sabe-se que a maioria dos microrganismos não se multiplica após a contaminação do leite, havendo uma fase de latência (lag-phase), na qual a taxa de reprodução é insignificante e, conseqüentemente, não há produção de metabólitos do desenvolvimento. A duração dessa fase, geralmente de três a quatro horas, é função quase que exclusiva da temperatura em que o leite é mantido, sendo mais longa em baixas temperaturas. Entretanto, mesmo sob essa condição, a duração pode ser abreviada quando os microrganismos com acesso ao leite tenham se desenvolvido anteriormente nesse meio, como por exemplo, em utensílios mal higienizados^{29, 32}.

A marcante influência da temperatura de estocagem sobre o desenvolvimento de microrganismos no leite é bem conhecida, sendo atribuída a responsabilidade pela acidificação do leite cru a organismos ácido-produtores, que se desenvolvem rapidamente em temperaturas superiores a 15°C. Esse grupo apresenta temperatura ótima de crescimento ao redor de 30°C e evidencia pouco ou nenhum desenvolvimento em temperaturas inferiores a 10°C. As Figs. 1 e 2 ilustram as relações existentes entre a temperatura e o desenvolvimento de bactérias no leite, sendo a primeira em função da temperatura e do tempo de estocagem, enquanto a segunda procura evidenciar as diferentes reações dos microrganismos para uma dada temperatura, segundo GEHRIGER³².

Ainda, de acordo com os dados levantados pelo mesmo autor³², com temperatura entre 2 e 4°C, concluiu-se que existe um tempo crítico de estocagem do leite de misturas, situado entre 60 e 72 horas. Para esse tipo de estocagem, verificou-se que o

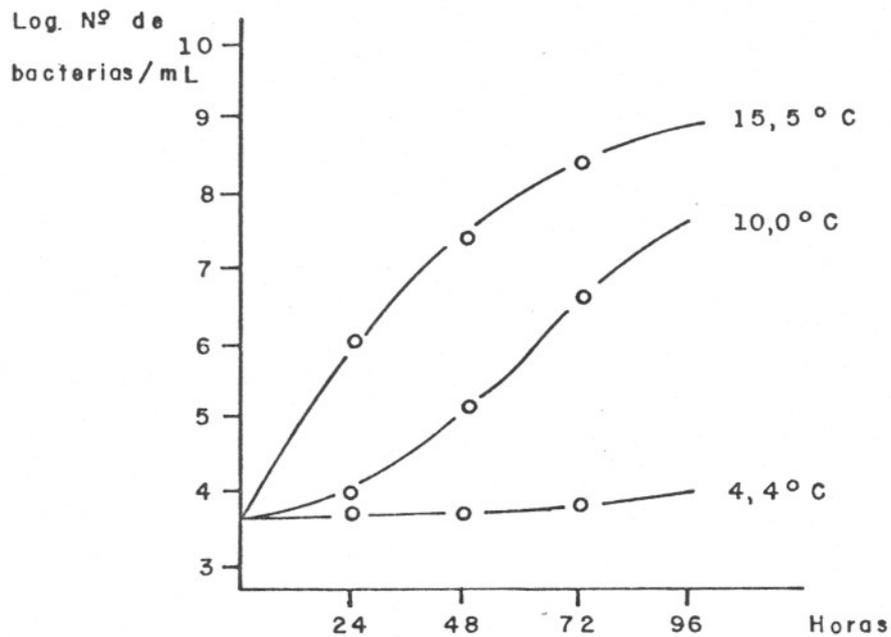


Figura 1. Desenvolvimento de bactérias no leite em função da temperatura. (Segundo GEHRIGER³⁴).

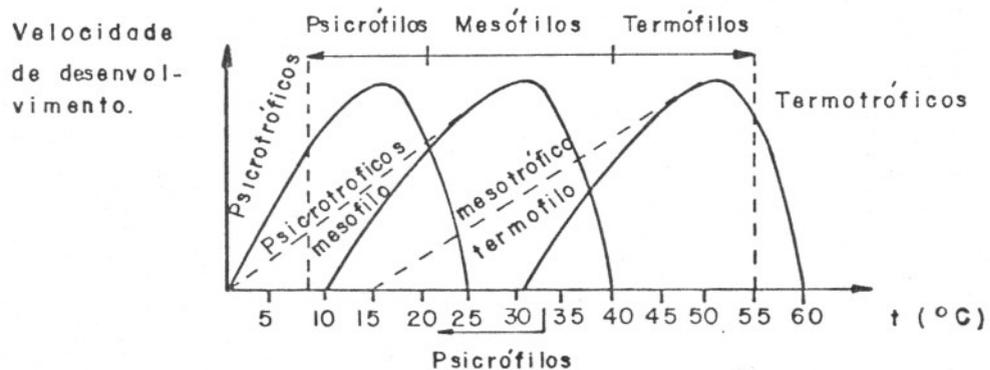


Figura 2. Classificação das bactérias de acordo com o desenvolvimento máximo e o limite de temperatura. (Segundo GEHRIGER³²).

grupo de microrganismos denominados psicrotróficos apareceu em níveis baixos, entre 1 e 10% da flora total ao final do primeiro dia, porém tornou-se completamente dominante após 2 a 3 dias de estocagem, evidenciando ainda que menos de 1% da flora total se compunha de organismos do grupo coliforme. Entretanto, um fator muito importante apresenta grande influência na estocagem de leite nessas condições e mesmo na qualidade do leite cru e dos sub-produtos elaborados a partir deste, que é o nível de contaminação inicial. Nesse aspecto, dos resultados levantados por vários autores, é possível concluir-se que o nível inicial de contaminação é particularmente dependente dos cuidados tomados durante a produção, do nível de higienização dos utensílios e equipamentos, bem como do grau de limpeza do animal, do ordenhador e do local da ordenha^{32, 37, 40, 41, 47, 63, 75, 79, 99}.

Dessa importante observação, pode-se concluir também que a utilização de refrigeração em nenhum momento pode ser entendida como substituto das práticas de limpeza e desinfecção. Para ilustração, é muito claro que um leite de qualidade ruim, mesmo mantido em temperaturas inferiores a 5°C, continuará sendo de qualidade insatisfatória, ao mesmo tempo que evidenciará, precocemente, alterações substanciais, sendo suas possibilidades de estocagem sem deterioração muito reduzidas. Por outro lado, experimentos realizados com o propósito de prolongar a estocagem do leite cru mostraram ser perfeitamente possível a estocagem do produto de até quatorze ordenhas diferentes em um único tanque, quando a temperatura foi mantida entre 1,5 e 2°C e partindo-se de leite de boa qualidade, ou seja, com nível de contaminação inicial muito baixo. Para essas condições foi possível se obter, mesmo após sete dias, contagem total variando entre 2.600 e 13.000/ml, na qual o número de psicrotróficos variou de 0 a 2.400/ml. Entretanto, quando as condições foram insatisfatórias,

já na mistura do leite da segunda ordenha, contagens superiores a 100.000 /ml puderam ser observadas³².

As alterações observadas no leite, decorrentes da ação dos microrganismos são muito variáveis, dependendo principalmente do tipo de organismos presentes. De modo geral, do desenvolvimento da flora microbiana presente, a partir dos princípios nutritivos do meio, um ou mais componentes vão sendo decompostos, evidenciando alterações de odor, sabor, aspecto físico, etc..., que continuarão sendo percebidas mesmo após o tratamento térmico, promovendo alterações significativas nos seus subprodutos, e mesmo ao ponto de torná-lo inaproveitável ao consumo humano⁷⁵.

De acordo com as condições brasileiras, ou seja, fatores climáticos, diferentes graus de obtenção higiênica e de utilização de refrigeração e das práticas industriais em vigor, a maneira mais fácil e objetiva de se classificar ou agrupar a flora do leite é a sua divisão em três grupos principais: mesófilos, psicrotróficos e termófilos/termodúricos. Ao grupo dos organismos mesófilos pode-se imputar a maior importância, tanto pelo fato de nele estar incluída a maioria dos contaminantes do leite e, entre estes, aqueles que apresentam um desenvolvimento acentuado, também chamados de culturas ou fermentos lácticos, geralmente ácido-produtores e responsáveis pela acidificação precoce do leite cru, como também pelo fato de apresentarem temperatura ótima de crescimento ao redor de 32°C. Apresentam, portanto, um desenvolvimento exuberante em nossas condições ambientais, podendo, todavia, se desenvolver entre 10 e 45°C⁷⁵.

Com o advento da pasteurização do leite, através da qual as células vegetativas dos organismos patogênicos são destruídas, e de diversos programas de controle e erradicação de enfermidades animais, aqueles patogênicos causadores de

zoonoses apresentam, em função desses aspectos, diferentes níveis de importância para diferentes países. A Organização Mundial de Saúde (OMS)⁹⁹ apresenta uma lista de quatorze agentes de zoonoses que podem ser transmitidos através do leite; entretanto, independentemente das práticas sanitárias adotadas nos vários países, organismos como *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* e *Coxiella burnetti*, entre outros, permanecem com grande evidência⁹⁹.

O acesso de agentes patogênicos ao leite está basicamente condicionado a dois fatores essenciais: a sua eliminação através do leite quando da existência de enfermidade animal, e através do próprio homem, durante a manipulação. Por outro lado, convém ressaltar que as mesmas condições que favorecem a entrada e a multiplicação de grande número de microrganismos podem também favorecer a entrada e multiplicação de tipos patogênicos⁵⁰

Atualmente, tanto em formas clínicas como sub-clínicas, as mastites constituem uma das principais causas da baixa qualidade microbiológica do leite, principalmente no Brasil^{5, 54, 72}.

Segundo TOLLE⁹⁹, aproximadamente 90% dos casos sub-clínicos de mastite são devidos a: *Staphylococcus aureus*, dos quais aproximadamente 10% são produtores de enterotoxinas, *Streptococcus agalactiae*, *Str. dysagalactiae* e *Str. uberis*. No Brasil, essa mesma gama de agentes foi responsável por 71% dos casos de mastite sub-clínica estudados por NADER FILHO⁷³. Esse dado é muito semelhante aos descritos por vários autores para diferentes regiões brasileiras, ao mesmo tempo que reitera o que vem ocorrendo em diversos países.^{27, 28, 34, 73, 93, 99}.

Do exposto, quando se trata de avaliar a qualidade microbiológica do leite, verifica-se a necessidade de um programa de controle de qualidade através da realização de exames bacteriológicos. Contudo, estes não são, por si sô, suficientes, considerando-se essencial a inspeção sanitária regular dos animais e dos

locais de produção, podendo inclusive se traduzir em maior eficiência que um programa de controle bacteriológico isolado. Todavia, ambos se complementam e são indispensáveis⁵⁰. Por outro lado, qualquer programa de controle microbiológico necessita, para satisfação dos objetivos, de análises uniformizadas e padrões de referência estabelecidos. Assim, do Serviço de Saúde Pública dos USA - 1965, obtém-se a seguinte recomendação: para leite cru de grau A, não mais de 100.000/ml antes da mistura com leites de outras procedências, e não mais que 300000 após a mistura e antes da pasteurização. Outra associação americana, a "Medical Milk Commissions, Inc", estabelece para leite certificado a ser consumido cru, contagem em placas inferior a 10.000 colônias/ml, sendo que os coliformes não devem ultrapassar a 10/ml. Já o Departamento de Agricultura do mesmo país recomendava, em 1955, basicamente duas classes para o leite cru: uma inferior a 200.000/ml e outra superior a esta cifra e inferior a 3.000.000/ml³⁰. Em 1967, o mesmo Departamento estabeleceu uma classificação mais completa, com uniformização de interpretação para os quatro métodos de avaliação mais usados, contagem em placas, contagem microscópica, redução do azul de metileno e resazurina. Nesse caso, para a classificação do leite recebido estabeleceu três classes: 1.- inferior a 500.000/ml; 2.- inferior a 3.000.000; e 3.- superior a 3.000.000/ml²².

O RIISPOA¹¹ Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, MA-Brasil, estabelece a classificação do leite em três tipos básicos: 1. tipo A, com até 10.000/ml antes da pasteurização e até 500 depois desta; 2. tipo B, com até 500.000 antes e 40.000 depois da pasteurização; e 3. outros tipos com até 150.000, atualmente 100.000/ml, após a pasteurização. Ainda, através da prova de redução do azul de metileno estabelece: tempo de redução superior a 5 horas para o tipo A, superior a 3h e 30 min. para o B e superior a 2h e 30 min. para os demais.

Pelas próprias características brasileiras: climáticas, de extensão geográfica, de diferentes níveis de desenvolvimento e de uso da tecnologia disponível, além de outras, pode-se afirmar que, com raras exceções a qualidade do leite produzido é altamente insatisfatória. Para tanto, basta verificar-se que, a nível de comércio, o leite oferecido para consumo se enquadra, na quase totalidade, em "outros tipos", enquanto o tipo B perfaz uma pequena porcentagem, e o tipo A constitui uma raridade, que, quando produzido, é tão somente mérito do ímpeto de algum empresário. Pode-se concluir, portanto, que através do regulamento em vigor, está-se classificando o que deveria ser "exceção", uma vez que a "regra" não existe. Conseqüentemente, além da baixa qualidade do leite oferecido ao consumidor, que apresenta período de conservação irrisório em comparação com países mais desenvolvidos, o nível de perdas é considerável^{15, 63, 75, 100}.

Principais Métodos para Exame e Classificação do Leite

A descoberta de LOUIS PASTEUR, em 1857, de que a fermentação ácida do leite era determinada pela atividade de certos germes específicos, certamente motivou o trabalho de JOSEPH LISTER, que, em 1873, isolou e descreveu os organismos que promoviam tal alteração, aos quais conferiu o nome de *Bacterium lactis*, que conhecemos atualmente como *Streptococcus lactis*⁹⁵.

Como anteriormente mencionado, o interesse em se verificar a qualidade microbiológica do leite foi motivada pelo conhecimento de que a presença de bactérias poderia provocar o aparecimento de doenças no homem e a deterioração do leite⁵⁰. Aparen

temente, a primeira investigação bacteriológica de uma remessa de leite foi realizada por SEDGEWICK & BATCHELDER, em Boston, em 1892^{50,95}, embora o trabalho de PARK (1901), sobre a qualidade higiênica do leite de abastecimento de Nova Iorque tenha recebido maior divulgação, uma vez que foi publicado no primeiro número do periódico "Journal of Hygiene"⁹⁵.

A origem dos métodos para avaliação da qualidade microbiológica do leite datam dessa mesma época. Assim, por volta de 1880, a equipe de ROBERT KOCH descreveu um método para o isolamento e a identificação, também útil para a enumeração de bactérias através de placas com meio de cultura sólido, tendo sido aperfeiçoado por PETRI, em 1887. Os primeiros livros - textos sobre bacteriologia de laticínios, contendo o detalhamento das técnicas usadas para o exame do leite, datam de 1894 e 1895. Do mesmo modo, data de 1911 o clássico trabalho de R. S. BREED, que deu origem ao método microscópico^{4,50,95}.

A primeira observação da redução de certos corantes adicionados ao leite com o intuito de verificar o grau de higiene deste, foi feita por DUCLAUX, em 1887, usando o "indigo carmine". Entretanto, NEISSER & WECHSBERG, em 1900, é que recomendaram a utilização do azul de metileno, enquanto que somente em 1929, PESCH & SIMMERT sugeriram o uso da redução da resazurina como indicador da qualidade higiênica do leite^{19,25,94}.

Do pioneirismo de alguns pesquisadores, a literatura mundial foi rapidamente enriquecida com uma grande quantidade de trabalhos e publicações que levaram a Associação Americana de Saúde Pública (APHA) a compor uma comissão encarregada de estudar a padronização dos métodos em 1905, sendo que, em 1910, esse trabalho resultou na primeira edição do atual "Standard Methods for the Examination of Dairy Products, atualmente na 14ª edição^{4,50,95}.

Contagem Padrão em Placas

Sem dúvida, o método de Contagem Padrão em Placas (CPP) foi o primeiro desenvolvido e de utilidade reconhecida, através do qual se pode avaliar a qualidade bacteriológica do leite, e obter uma indicação das condições sanitárias decorrentes da produção e manuseio do mesmo^{4, 35, 50, 51, 96}. A par das qualidades mundialmente reconhecidas, suas limitações são decorrentes da própria padronização do método. Entre essas, a principal é a diferente capacidade dos diversos tipos de bactérias de se desenvolverem num único meio de cultura com incubação a uma dada temperatura e curto espaço de tempo. Historicamente, essa deficiência já preocupava os pioneiros no uso do método, visto que, entre 1895 e 1910, a incubação recomendada era por 3 a 4 dias, a 20°C em gelatina nutriente, ou ágar nutriente incubado a 37°C por 2 dias. Posteriormente, em decorrência dos resultados levantados pela comissão encarregada da padronização, em 1910, a incubação das placas a 20°C por 5 dias, foi preferida em detrimento da incubação a 37°C/2 dias, enquanto o uso desta, a 30°C, foi também muito discutido. Entretanto, a disposição de 37°C/48 horas foi muito mais difundida e aceita, prevalecendo na maioria dos países até 1948, havendo remanescentes até mesmo na atualidade.^{11, 12, 13, 14, 50, 96} Como parte dessa celeuma, a incubação opcional a 32 ou a 35°C foi estabelecida em 1948, sendo que, atualmente, a recomendada é 32°C/48 horas para produtos de laticínios, e 35°C pelo mesmo tempo, para outros produtos^{3, 4, 50}.

Entretanto, principalmente em função da disseminação da refrigeração, a discussão continua com inúmeras sugestões de modificações, tanto da temperatura quanto do tempo de incubação, observando-se a tendência da diminuição da temperatura e de uma ampliação do tempo. Para maiores detalhes, THOMAS⁹⁶ relaciona,

numa tabela, as principais modificações sugeridas por uma série de autores, para a determinação da contagem total de colônias em leite resfriado ^{6, 96}.

Outras limitações do método se referem principalmente à composição do meio de cultivo utilizado, visto que nenhum meio pode ser considerado plenamente satisfatório para o desenvolvimento de todas as espécies de microrganismos presentes no leite. Além da variação na necessidade de oxigênio, há ainda a ocorrência de células únicas e grupamentos de até centenas, dando origem a uma única colônia e, portanto, sendo reportadas como um único elemento, havendo também a competição entre as espécies presentes, sobressaindo-se as que encontram condições mais favoráveis. Todas essas observações servem como argumento aos críticos do método, ao mesmo tempo que funcionam como alerta a pesquisadores menos experimentados ^{35, 50, 51, 55, 96, 102, 103}.

As mais sérias críticas a esse método foram feitas por WILSON, em 1935 ¹⁰², e republicadas em 1950 ¹⁰³. Nelas o autor faz uma extensa análise de todos os problemas concernentes à aplicação da técnica concluindo, entre outras coisas, que a margem de diferença pode ser de até 90% quando se comparam resultados de contagem em uma única placa, caindo para 64 ou 52% quando duas ou três placas são contadas, respectivamente, assumindo-se que uma técnica padronizada seja utilizada, uma vez que a interpretação dos resultados torna-se praticamente impossível se esta não for padronizada. Entre os aspectos analisados pelo autor estão a tomada de amostras, os diluentes utilizados, os métodos de diluição, a escolha do meio de cultura, o plaquamento e a quantidade de meio por placa, a agitação destas placas, a incubação, o método de contagem e o número de colônias por placa.

Várias modificações têm sido propostas para o método de placas, sendo as mais importantes aceitas através de uma sé

rie de emendas e correções ao método original, na tentativa de se obter a máxima eficiência. Entretanto, algumas importantes limitações ainda persistem, tais como demora na obtenção dos resultados, alto custo do teste para sua aplicação rotineira, e o fato da contagem não ser uma medida precisa do número de bactérias presentes na amostra e sim uma estimativa dos organismos viáveis ^{4, 35, 51, 55}.

A gradativa seleção de microrganismos psicrotróficos se traduz num dos mais recentes incômodos à aplicação dos diversos métodos na avaliação da qualidade higiênica do leite. Assim, sabe-se que esses organismos apresentam capacidade redutora muito baixa, tornando os métodos de redução insuficientes para tanto, enquanto também apresentam a característica da ocorrência em grupos, responsável por erros, tanto na contagem em placas, quanto na microscópica. Por outro lado, afeta ainda mais o método de placas quando, por definição, sabe-se de suas preferências quanto à temperatura de desenvolvimento, constatando-se que a 32°C, não se consegue a enumeração de todos os organismos desse grupo. ^{22, 35, 51, 53, 66, 75, 76, 84, 85, 86, 96}.

Vários outros aspectos da técnica têm merecido a atenção de inúmeros pesquisadores ^{6, 24, 31, 38, 39, 83}. Entre esses, HUHTANEN ³⁹, confirmando evidências já aventadas, constatou uma significativa diminuição nos resultados estimados pela CPP, quando se utiliza ágar a temperatura de 50°C, discutindo uma possível injúria irreversível a organismos psicrotróficos, quando comparados com resultados obtidos com a utilização de ágar a 45°C.

Métodos de Redução

Quando ainda no úbere, o leite apresenta capacidade redutora. Porém, em função da captação de oxigênio na ordenha,

essa é anulada, sendo que um leite normal apresenta um potencial redox entre + 350 e + 400 mVolt que, entretanto, não interfere significativamente nas provas de redução. Principalmente através da atividade dos microrganismos presentes no leite, o oxigênio é consumido, ao mesmo tempo que são formadas substâncias redutoras evidenciando, assim, um decréscimo do potencial redox até uns -185 mVolt^{5,6}.

As substâncias empregadas para os testes de redução são corantes que funcionam como indicadores de redução (receptores de hidrogênio), resultando em mudança de cor. Assim, o azul de metileno, por redução, se torna incolor, porém de maneira reversível, enquanto a resazurina evidencia uma redução parcialmente irreversível, passando a resofurina, e desta a dihidro-resofurina de forma reversível, passando por várias mudanças de cor ou matizes, até a forma incolor^{4, 25, 56, 102, 104}.

Esses métodos promovem uma estimação indireta do conteúdo de microrganismos presentes no leite, uma vez que medem a capacidade destes de, pelo desenvolvimento durante a incubação, baixar o potencial redox da mistura que se verifica através das mudanças de cor dos indicadores. A classificação do leite, em termos de qualidade higiênica, se faz por intervalos de tempo requeridos para provocar tais mudanças, sendo que o tempo é inversamente proporcional ao conteúdo de germes. Entretanto, suas maiores limitações decorrem desses fatos^{4, 8, 25, 48, 94, 104}.

Azul de Metileno

Com o objetivo de controlar a qualidade higiênica do leite a ser consumido, o teste de redução do azul de metileno foi inicialmente introduzido na Suíça e Dinamarca, em 1912 e, a partir daí, ganhou popularidade mundial, sendo um dos testes

bacteriológicos mais extensivamente usados em todo o mundo, o mesmo acontecendo no Brasil^{19, 25, 50, 65, 90}.

Suas maiores vantagens são: a simplicidade, a economia, a reprodutibilidade e a rápida detecção de leites de qualidade ruim. Além de não necessitar de pessoal especializado para a sua realização, muitas amostras podem ser analisadas ao mesmo tempo⁵⁰.

Embora se saiba que o leite possui, independentemente da presença de bactérias, um sistema redutor natural constituído por enzimas, lactose e gordura, muitos pesquisadores procuraram estimar o seu valor concluindo que, nas condições em que se realiza o teste, e com a modificação introduzida, da inversão dos tubos a cada 30 minutos para redispersão dos glóbulos de gordura e do conteúdo microbiano, sua interferência no sistema de redução é mínima, não evidenciando mudanças significativas na leitura do teste^{50, 104}.

Outra hipótese aventada é a de que grande quantidade de leucócitos no leite poderia ser responsável pela diminuição do tempo de redução. Contudo, a maioria dos autores não confirmou este fato, tendo inclusive, como resultado de pesquisas específicas, concluído por pouco ou nenhum efeito do número de leucócitos sobre o tempo de redução, não havendo, portanto, significância^{19, 62, 104}. Por outro lado, a velocidade de redução está diretamente relacionada, ou melhor, é totalmente dependente das taxas de atividade metabólica dos vários microrganismos presentes nas condições em que se realiza o teste, ao mesmo tempo que é amplamente conhecido que a capacidade de redução de diferentes organismos varia consideravelmente para um mesmo equivalente populacional, independentemente de sua atividade metabólica^{35, 104}.

Mais recentemente, vários outros fatores têm contribuído para as divergências entre o tempo de redução e a quantidade de microrganismos presentes na amostra-teste. Entre esses, os

principais estudados são: o aumento da proporção de organismos tanto psicrotróficos como termodúricos, que apresentam, respectivamente, pequena atividade a 35-37°C e baixa capacidade redutora; a estocagem refrigerada do leite, que provoca um estado de dormência na maioria da flora presente, resultando num prolongamento da fase de latência; a presença de resíduos no leite, principalmente de antibióticos, promovendo uma queda do poder de redução; e, nos países que apresentam estações do ano bem definidas, com acentuadas modificações das condições climáticas, vários autores têm confirmado sua influência sobre o teste ^{1,7,26,33,34,48,49,50,51,52,104}. Entretanto, BARKWORTH⁸ concluiu que o teste de redução do azul de metileno, com leituras realizadas a cada cinco minutos, foi estatisticamente mais sensível que a contagem padrão em placas, e ainda que o mesmo teste de redução com leituras a cada trinta minutos.

Resazurina

O método de redução da resazurina é muito semelhante ao do azul de metileno, apenas utilizando um outro indicador de oxido-redução. Logo após sua descrição em 1929, teve grande desenvolvimento e aplicação na própria Alemanha, sendo introduzido no Canadá e USA em 1935. Sua realização oferece, como principal vantagem, a obtenção dos resultados, em uma ou três horas, dependendo da maneira com que é realizado, em comparação com a demora para obtenção dos mesmos resultados através do teste do azul de metileno. Essa peculiaridade motivou o grande interesse dos pesquisadores em vários países, sendo inclusive usado em substituição ao azul de metileno em vários laboratórios. O mesmo não ocorreu no Brasil, onde o teste não foi muito difundido, havendo poucas referências ao seu uso ^{4,29,35,50,62,89,94}.

A leitura, no método inicialmente descrito era realizada após uma hora de incubação, posteriormente, um teste de tríplice leitura, com três horas de incubação, foi sugerido e geralmente adotado. Aliando as demais vantagens descritas para o teste do azul de metileno à necessidade de curto período de incubação, ao método foram atribuídas outras vantagens e, entre estas, a de detectar leites fisiologicamente anormais e organismos de fraco poder reductor. Sua relação com a detecção de leites anormais deriva do fato da marcante influência da presença de número excessivo de leucócitos sobre o tempo de redução, constatada por inúmeros autores. Entretanto, esse fato é ainda controverso, necessitando-se de maiores estudos, uma vez que é contestado por outros autores ^{4, 25, 35, 50, 94}.

Em decorrência do interesse despertado e da grande quantidade de trabalhos desenvolvidos, muitas modificações e adaptações foram sugeridas aos vários aspectos da realização e interpretação da técnica. Porém, a necessidade de um teste rápido para a aceitação/rejeição do leite a nível de plataforma de recepção, fez com que o teste de rejeição dos dez minutos, utilizando a resazurina, em 1941, recebesse imediata aceitação para a rejeição de leites de péssima qualidade higiênica, oriundos de produtores individuais, referidos com contagem em placas superior a 10^9 /ml a 37°C. Entretanto, a literatura padronizada prevê apenas duas formas para a realização do teste: aquela com uma hora de incubação e a de tríplice leitura; todavia muitos países ainda usam o teste de rejeição dos dez minutos. ^{4, 25, 50, 94}.

Suas limitações são muito semelhantes às descritas para o teste do azul de metileno, embora seja menos afetado que este, pela presença de resíduos de antibióticos no leite. Todavia, o aumento do uso adequado de refrigeração nos dias atuais se traduz numa crescente objeção à realização de simples testes de redução para programas de controle de qualidade do leite. ^{4, 35, 50, 94}.

Contagem Microscópica

O método de Contagem Microscópica, do inglês "Direct Microscopic Clump Count (DMCC)", desenvolvido por R. S. BREED em 1911, baseia-se na estimativa total dos microrganismos presentes numa amostra de leite, independentemente de sua viabilidade ou atividade, enumerados com auxílio de um microscópio que providencia um aumento mínimo de 900 vezes. Para tanto, é realizado um esfregaço de leite sobre uma lâmina de microscopia com uma área de 1 cm^2 previamente demarcada, na qual 0,01 ml da amostra é espalhada, seca, fixada, desengordurada e corada, estando assim apta ao exame sob o microscópio. Através das relações matemáticas entre a quantidade da amostra, a área do esfregaço e a área do campo visual, determina-se o "fator-microscópico", o qual permite chegar a uma estimativa do número de microrganismos por ml da amostra, conforme técnica minuciosamente descrita no "Standard Methods" ⁴.

A partir de sua descrição, de 1911 a 1929, seu autor, juntamente com uma equipe de colaboradores, realizou uma série de estudos referentes aos objetivos e aplicação do método, resultando na publicação de artigos originais, notas breves, e de dois boletins específicos ilustrados com microfotografias procurando salientar as características dos vários leites examinados, tanto normais quanto anormais. Surgiu também daí a evidência da utilização deste para a contagem de células somáticas do leite, embora, com esse propósito, a técnica já tivesse sido descrita por PRESCOTT & BREED em 1910 ^{80,97}.

Em consequência dos resultados evidenciados nessas publicações, em 1921 a Associação Americana de Saúde Pública (APHA) concedeu sua aprovação oficial ao método para o exame de leite cru, incluindo-o na terceira edição do "Standard Methods" ⁹⁷. Essa

publicação, na sua 9^a edição², enumerava os seguintes objetivos para sua aplicação: a) exame rápido de amostras visando à sua organização em certos graus ou classes; b) enumeração dos organismos existentes, em contagens de células individuais ou de aglomerados bacterianos; e c) reconhecimento, através dos tipos de bactérias e células somáticas presentes, das causas prováveis de leites de qualidade inferior. Além disso, discutia ainda sua aplicação ao leite e creme a serem pasteurizados, ao leite parteurizado, e a leites de alta qualidade microbiológica^{80,92}.

Sua utilização ao longo do tempo mostrou ser um meio indispensável para o rápido domínio da qualidade do leite a ser industrializado, bem como, em virtude do aperfeiçoamento e simplificação da técnica para a classificação do leite recebido, a nível de plataforma⁷⁴.

Aparentemente, SUPPLEE & ASHBAUGH (1922), citados por HEI³⁶NEMANN, foram os primeiros a propor a contagem em microscópio para a classificação e padronização do leite em pó desnatado. Entretanto, o Departamento de Agricultura dos USA veio a reconhecer a sua utilidade somente em 1956, sendo que, em 1960, o método foi definitivamente incluído, entre outros, para avaliar a qualidade microbiológica desse tipo de leite⁸¹.

Visando a um ou mais objetivos enumerados, aplicados isoladamente ou em conjunto com outros métodos, a técnica é grandemente difundida e utilizada em todo o mundo⁴².

Mais recentemente, em consequência de inúmeros estudos, do conhecimento de que a grande maioria dos microrganismos no leite ocorre em grupos ou aglomerados, e visando a uma maior precisão e a uma melhor correlação com outros métodos, a contagem de células bacterianas individuais foi desaconselhada, recomendando-se a contagem de grupamentos. Para tanto, conta-se, como grupos separados, qualquer célula ou grupamento desta, aparentemente do mesmo tipo, que se apresentem separados por uma distân

cia igual ou superior a duas vezes o menor diâmetro de duas células próximas. Entretanto, para células diferentes, a contagem é individual, independentemente da proximidade, princípio que também se aplica à contagem de células somáticas, isto é, contagem individual.⁴

Atualmente o método é recomendado para a estimação do conteúdo bacteriano, uma vez que nenhum método é suficientemente capaz de precisar o número total de organismos presentes, aplicado a amostras de leite cru e creme, tanto individuais como de conjunto, ou mesmo de tanques de estocagem. Pode ser aplicado ainda a leite e creme pasteurizado, independentemente da viabilidade ou tipos de organismos, como auxiliar no estabelecimento de condições indesejáveis, bem como ao leite em pó, objetivando a avaliação de sua qualidade prégressa e para programas de controle de qualidade. Ressalta-se ainda, que a disposição e a morfologia das células bacterianas podem sugerir uma possível causa para altas contagens, e que um número excessivo de células somáticas evidencia condições anormais do úbere, principalmente mastites. Para a orientação de programas sanitários nos locais de produção, nesse último aspecto, tem sido extensivamente usado na maioria dos países de tradição leiteira, nos programas de controle de mastites, recebendo inclusive a recomendação oficial da "Federação Internacional de Laticínios"^{4, 44, 9.7}.

Sua aplicação encontra respaldo mesmo quando da utilização simultânea com outros métodos, inclusive a contagem em placas, pois passam a se compensar convenientemente, proporcionando melhores informações que tendem a se complementar⁸⁸.

Dentre os benefícios da aplicação do método microscópico citam-se: 1) a obtenção, em apenas alguns minutos, dos re

sultados das análises, permitindo uma rápida classificação, ou mesmo, quando for o caso, a quase imediata rejeição de uma partícula ou remessa; 2) sua aplicação minuciosa, com a contagem de suficiente número de campos, permite uma estimativa numérica da qualidade microbiológica da amostra, de modo a orientar a adoção de medidas sanitárias legais, com a vantagem de que os resultados podem ser preservados, permitindo reexames nos casos de contestação; 3) a interpretação dos resultados por técnico experimentado permite, através de detalhada análise da morfologia e disposição e do número de organismos e células somáticas presentes, o reconhecimento ou pelo menos a suposição das condições que lhe deram origem; 4) pode efetivamente auxiliar na detecção de problemas decorrentes da industrialização, principalmente a recontaminação de leite pasteurizado ou em pó, ou ao menos, estabelecer sua vida pregressa; 5) além de ser um método econômico, necessita de poucos materiais e equipamentos, e baixo custo de reposição^{4, 50, 55, 97}.

Um outro aspecto a ser considerado favoravelmente ao método é a possibilidade de preservação das amostras pela adição de formaldeído, estudada por CLAIBORNE²⁰. Essa alternativa possibilita, entre outras várias condições ou necessidades, o exame da mesma amostra por outros laboratórios ou técnicos, desde que examinadas dentro de um prazo de até três (3) dias. Os autores concluíram que a adição de 0,08% de formaldeído a amostras de 10 ml de leite permite preservá-las pelo prazo citado, sem a ocorrência de modificações significativas no número de microrganismos.²⁰

Apesar de seus atributos e das conclusões que podem advir da sua utilização, o método não fornece informações sobre a viabilidade ou atividade da flora que detecta. Uma outra limitação se refere à fadiga causada pelo exame de grande quantidade

de amostras⁵⁰. Nesse aspecto, van ROSSEN, citado por THOMAS⁹⁷, concluiu que, em virtude do cansaço ocular provocado, uma pessoa pode examinar apenas até oitenta amostras por dia.

Uma outra condição que impõe determinadas limitações ou maiores dificuldades à aplicação da técnica de modo rotineiro, resulta da própria qualidade microbiológica do leite. Isso porque amostras de baixa contagem de bactérias, por exibirem baixa densidade de organismos por campo, e mesmo a ausência destes em muitos campos, torna necessário o exame de uma quantidade muito grande de campos por amostra, evidenciando, também, um coeficiente de variação muito amplo nas repetições, tornando duvidosa sua utilidade para a classificação de leite que apresente contagem inferior a 200.000/ml^{61,88,102}. Por outro lado, ao se objetivar a simples classificação do leite, deve-se ordenar as estimações numéricas em apenas duas ou três classes, de modo que possam representar diferenças significativas de qualidade sanitárias, isto é, com limites reais bem afastados^{4,70,71,92}.

O conhecimento exato do conteúdo bacteriano do leite é ainda impossível; logo, os resultados de qualquer método representam apenas estimativas. Por outro lado, a repetibilidade do método microscópico pode evidenciar variações das estimativas, tendo como fatores responsáveis por tais variações a imprecisão na medida da amostra, a preparação e coloração defeituosa das lâminas, a possível deficiência das bactérias em se corar, a pequena quantidade de leite examinada, a microscopia inadequada, a contagem de número insuficiente de campos, a secagem do esfregão sobre superfície em desnível, entre outros⁴.

Segundo CASSEL¹⁷, toda técnica de contagem microscópica apresenta erros de dois tipos gerais: a) erros sistemáticos que produzem resultados que são consistentemente muito altos ou muito baixos, e b) erros ao acaso, que introduzem grande variação aos

resultados. Os do primeiro tipo controlam a exatidão, ou seja, uma qualidade que se refere à habilidade do teste em conferir uma medida correta do item que está sendo mensurado, enquanto que os do segundo controlam a precisão, que diz respeito à habilidade do teste em dar resultados consistentes em repetidas provas, também chamada de repetibilidade ou replicabilidade, sendo muito afetada pela habilidade do executor^{17,98}. Nesse contexto, CASSEL¹⁷ desenvolveu um método gráfico objetivando estimar a precisão dos resultados de contagens microscópicas para intervalos de confiança de 90, 95 e 99%. Com seu uso, elimina-se o tempo gasto para cálculos, enquanto permite ao pesquisador determinar rapidamente o número de campos que necessitam ser contados para manter um certo nível de precisão.

MALLMANN⁶⁴, em análise do método microscópico aplicado a leite cru, teceu uma série de sugestões e, entre elas, a adoção de um nível de 25% de precisão para o exame de amostras que se refiram a produtores individuais. Nessas condições, para uma média de até um organismo por campo, a contagem de dez (10) campos da amostra é suficiente, enquanto que, se nenhuma célula bacteriana for encontrada nestes, pelo menos cinquenta campos necessitam ser contados. Por outro lado, justificou que a inexistência de organismos em cinquenta campos decorre de leite com conteúdo inferior a 5.000/ml, e que exames adicionais resultam em pouca significância.

Uma das principais causas de erro na execução da técnica, ainda hoje mencionada, tem sido a dificuldade de se medir e despejar sobre a lâmina, a pequena quantidade de 0,01 ml de leite a ser analisado. Embora existissem pipetas graduadas para tanto, seu uso eficiente demandava cuidados e tempo excessivos, incompatíveis com a rapidez pretendida para a técnica. Aproximadamente em 1947, SMITH idealizou, desenvolveu, patenteou e colocou

cou no mercado Norte Americano um instrumento que chamou de pipe ta mecânica, com a finalidade de medir, despejar e espalhar a exata quantidade de 0,01 ml de leite sobre as lâminas. Na realidade, tal instrumento operava com princípio semelhante às serin gas hipodérmicas, com as vantagens de estar calibrado para 0,01 ml de leite e de ser semi-automatizado, tendo-se tornado conhecido como a seringa de 0,01 ml de SMITH. Seu uso rotineiro evidenciou um revolucionário aumento na exatidão e precisão da técni ca, abreviando em muito o tempo gasto para sua execução^{61, 74}.

Desde sua descrição até aproximadamente 1926-27, a téc nica esbarrava num outro empecilho, o da confecção e coloração dos esfregaços, que até então era imperfeito e demorado, uma vez que as operações de "fixar, desengordurar e corar" eram realiza das individualmente. Com a introdução de uma única solução que combina numa só as três operações descritas, novamente a técnica foi beneficiada, principalmente quanto à sua rapidez e eficiên cia para a classificação do leite na plataforma de recepção⁷⁴.

A solução proposta foi quase imediatamente adotada pe la comissão encarregada da padronização do método, embora muitos outros autores tivessem tido a mesma preocupação e feito suges tões para tanto, entre estes, os trabalhos de LEVINE & BLACK^{57, 58}; LEVINE⁵⁹; OLSON JR. & BLACK⁷⁸ e CHARLETT¹⁸. Entretanto, a solução descrita por LEVOWITZ & WEBER⁶⁰, derivada de modificações da so lução de NEWMAN nº 2, combinando as características desejadas, foi a aconselhada pela metodologia padrão, permanecendo em uso até os dias atuais^{4, 60}.

BRYAN, em 1938, descreveu uma simplificação do método microscópico direto, pelo uso de uma alça de platina calibrada com 4 mm de diâmetro exterior para a tomada de 0,01 ml de amos tra de leite, sugerindo que a extensão do esfregaço fosse reali zada sobre uma lâmina comum com um retângulo demarcado de 4 por

8 mm de superfície. Dessa maneira, os fatores de conversão permanecem os mesmos, ao mesmo tempo que propicia a utilização do método em locais desprovidos das condições necessárias, por exemplo, em estábulos^{64, 88}.

É evidente que a técnica é muito dependente do método de coloração usado e da capacidade das bactérias de se corarem. Qualquer corante usado necessita tingir nitidamente todos os organismos presentes, de modo que possam ser perfeitamente identificados e, no caso do leite, essa nitidez seria dada pela intensa coloração das bactérias em contraste com uma coloração mínima da película de leite. Todavia, é muito conhecido o fato de que, como efeito da temperatura usada na pasteurização ou processamento, as bactérias perdem a capacidade de se corarem em variados graus, em função do grau de plasmólise determinado pela intensidade de aquecimento^{68, 69}.

Nesse aspecto, MOATS⁶⁸ fez uma excelente revisão sobre a coloração das bactérias no leite para o exame microscópico direto. Ressaltou que o método de coloração em vigor (LEVOWITZ-WEBER) era, na realidade, um corante dos ácidos nucleicos das bactérias, portanto, relativamente eficiente para leite cru, mas não para leite submetido a tratamento térmico. Por outro lado, considera que a maioria das bactérias é também constituída de outros polifosfatos, e ainda, que as Gram-positivas apresentam uma grande quantidade de polissacarídeos na parede celular, tornando possível, portanto, a coloração seletiva das bactérias em relação à película de leite, composta basicamente de proteínas. Dessas considerações, o mesmo autor estudou e desenvolveu um corante de polissacarídeos, baseado na reação de ácido periódico-bissulfito e corantes; entre estes, os mais satisfatórios foram o azul de toluidina e o "azure A". Ao cabo de uma série de estudos, concluiu que a solução com azul de toluidina, tamponada a

pH 4,0, mostrou-se eficiente para a coloração tanto de ácidos nucleicos como de polissacarídeos, sendo, portanto, indicada para o exame de leite submetido a tratamento térmico. Nesses casos, não evidencia decréscimo nas contagens realizadas antes e após o tratamento térmico, e outros resultados do mesmo autor, até 1972, confirmam essa conclusão.^{6,9}

Os estudos comparativos ou associações sempre se constituíram numa preocupação para inúmeros pesquisadores, objetivando o grau de equivalência entre os métodos. Desse modo, ao longo do tempo, inúmeras correlações foram obtidas, e suas variações explicadas. Dentre estas, algumas serviram para a definição de alguns parâmetros comparativos importantes. Assim, ficou evidenciado que a contagem microscópica, quando enumera grupos ou aglomerados de microrganismos, se correlaciona bem melhor com a contagem em placas, uma vez que, tanto uma célula quanto um grupo, dão origem, respectivamente, a uma única colônia no método de placas^{10, 16, 21, 45, 46}.

Por outro lado a contagem microscópica tende a suplantar os resultados da contagem em placas para leite de ótima qualidade microbiológica, isto é, com contagens inferiores a 200.000/ml. Essa observação decorre do fato de que, nessas condições, a maioria das bactérias presentes no leite se encontram como células isoladas ou em pares, enquanto muito poucos grupos são encontrados. Para valores variando entre 200.000 e 600.000/ml, a correlação verificada entre as técnicas é muito maior, sendo as diferenças negligenciáveis e possivelmente devidas à inabilidade na execução. Já para leites com contagens superiores a 500-600.000/ml ou com o aumento do número de bactérias no leite, muito maior número de grupamentos bacterianos são observados. Nesses casos, a partir das cifras mencionadas, começa a aparecer uma relação inversa entre os dois métodos, isto

é, a contagem em placas começa a suplantá-la a contagem microscópica de grupos, muito provavelmente devido à quebra ou divisão das cadeias ou grupos durante as diluições e plaqueamento das amostras^{45,88}.

A literatura específica brasileira é totalmente carente de qualquer tipo de estudo relativo à contagem microscópica de bactérias. Assim, apenas vagas citações ao emprego do método são obtidas dos trabalhos de STEPHAN⁹⁰ e MARTINS⁶⁵, enquanto ROGICK⁸⁷ concluiu pela inexistência de diferenças significativas no número de microrganismos entre leite integral e padronizado, tanto cru quanto pasteurizado, utilizando os métodos de contagem microscópica e em placas.

Resultados muito interessantes são observados no trabalho de DABBAH²², pela comparação de vários métodos de classificação do leite destinado à industrialização; dentre estes, os coeficientes de correlação obtidos. Respectivamente, as correlações observadas para a contagem em placas versus a microscópica, azul de metileno e resazurina, foram: 0,78; -0,82 e -0,79. A comparação da contagem microscópica com o azul de metileno e resazurina mostrou, respectivamente, $r = 0,75$ e $0,68$; enquanto a comparação do azul de metileno com a resazurina mostrou $r = 0,86$.

A correlação de diversos testes com as condições de higiene na produção, e mesmo com o trabalho de inspeção sanitária a nível de campo, mostrou graus de associação muito baixos, geralmente ao redor de 0,2. Tais resultados sugerem que os testes bacteriológicos e a inspeção a nível de campo sejam utilizados concomitantemente, uma vez que parecem avaliar diferentes fatores sanitários da qualidade de produção.^{23,51} Por outro lado, correlação significativa com as condições de produção foi observada apenas para a contagem de psicotróficos e, curiosamente, entre a contagem de leucócitos e as condições de produção ($r = 0,64$), su

gerindo que a ignorância dos preceitos de higiene e sanificação na produção se traduzam em dificuldades na manutenção da saúde do rebanho ^{85,97}.

Nesse aspecto, sabe-se que os leucócitos se encontram presentes em grande número no leite, quando da existência de infecção do úbere ou no colostro e, excetuando-se essas condições, as células presentes são predominantemente epiteliais ^{9,67,101}.

Esses fatos assumem importância pelo conhecimento de que o conteúdo de células somáticas parece estar relacionado com dois diferentes aspectos da qualidade bacteriológica do leite. Primeiro que o alto conteúdo celular significa uma maior probabilidade da ocorrência de organismos patogênicos e, segundo, que a grande quantidade de células retarda o desenvolvimento de culturas lácticas ⁴³. No desenvolvimento de mastites, a sugestão da seqüência de eventos é: 1) a presença do agente causal, 2) o aumento do número de leucócitos, 3) aumento na porcentagem de cloretos, e 4) aumento da alcalinidade do leite. Portanto, de acordo com esses, o aumento do número de leucócitos poder ser a primeira indicação de uma condição anormal e, por conseguinte, passível de ser prematuramente detectada pelo método microscópico ^{43,67}. Entretanto, embora muitos países incluam a contagem de células somáticas para a avaliação da qualidade do leite produzido, a técnica não é ainda internacionalmente aceita como padrão para a classificação ⁴³.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Leite Cru - Dependendo da existência de um ou mais latões, as amostras foram tomadas individualmente ou de um "pool" dos latões de um produtor, objetivando representar a produção de uma determinada propriedade. Para tanto, as amostras foram colhidas assepticamente em frascos previamente esterilizados, providos de tampa hermética, com capacidade média de 250 ml, perfeitamente identificados e acondicionados em embalagem isotérmica com gelo, para transporte até o laboratório.

Numa fase preliminar, objetivando principalmente o comportamento do método microscópico, foram examinadas 100 amostras de leite coletadas junto ao estábulo leiteiro da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal-UNESP. Nesse caso, visando a diferentes níveis de qualidade microbiológica, parte das amostras foram examinadas imediatamente após a coleta, representando leite recém-ordenhado; parte foi examinada após 3 a 4 horas de permanência em temperatura ambiente; e parte foi examinada, em média, 18 horas após a obtenção, representando leite resfriado da ordenha vespertina do dia anterior.

As demais amostras, leite tipo "Especial - 3,2% de Gordura" e tipo "B" , foram colhidas diretamente dos latões dos produtores a nível de plataforma de recepção, respectivamente de Posto de resfriamento e Indústria de laticínios da região.

Transportadas até o laboratório, mantidas sob refrigeração, as amostras foram prontamente examinadas, sendo que o tempo transcorrido, desde a coleta até a realização dos exames, em nenhum momento foi superior a noventa minutos.

Leite Pasteurizado - Tais amostras foram adquiridas periodicamente no comércio local (Jaboticabal), provenientes de estabelecimentos variados e de três marcas distintas (A,B e C) para o tipo "Especial" e uma única marca (A) para o leite tipo "B". Do primeiro tipo, de um total de trinta (30) amostras adquiridas, doze (12) corresponderam à marca A, doze (12) à marca B e seis (6) à C; sendo as sub-amostras coletadas diretamente da embalagem original , após vigorosa agitação. Trinta (30) foi também o total de amostras analisadas para o tipo "B", perfazendo, no total, sessenta (60) amostras de leite pasteurizado.

Contagem Microscópica (CM)

Essa técnica foi desenvolvida e aplicada de acordo com o método descrito no "The Standard Methods for the Examination of Dairy Products -1978" ⁴ . Para tanto, os seguintes materiais ou equipamentos foram utilizados:

a) pipeta especial (Breed) com capacidade para medir e transferir exatamente 0,01 ml de leite a 20°C (W-Germany);

b) lâmina microscópica especial, de vidro, medindo 2,6 x 7,6 cm, com cinco áreas circulares demarcadas de 1 cm² cada e espaço marginal suficiente para a identificação;

c) lâmina micrométrica Zeiss - 1 mm/0,01;

d) microscópio binocular composto, da marca Zeiss, com iluminação própria, dotado de condensador de Abbè, objetiva de imersão (100x) e oculares (10x);

e) óleo de imersão de n_d a 20°C = 1,515; e

f) caixa de luz, em nível, como fonte de calor controlado (40-45°C) para a secagem rápida dos esfregaços.

Com o auxílio da lâmina micrométrica, previamente foi determinado o "fator-microscópico" (318.000), utilizado no decorrer de todo o trabalho. Baseado neste e nas especificações do "Standatd Methods" ⁴, e dado o desconhecimento prévio da qualidade microbiológica do leite a ser examinado, fixou-se em 32 o número de campos para exame de cada amostra. A média da contagem destes, multiplicada pelo "fator-microscópico" determinado, proporcionou a estimativa do número de microrganismos por mililitro de cada amostra, reportadas no máximo, com três algarismos significativos.

Procedeu-se, em todas as amostras, à contagem de agrupamentos ou aglomerados ("clumps") de microorganismos, isto é, considerou-se como grupos distintos, qualquer célula ou grupamento desta, aparentemente do mesmo tipo, separados por distância igual ou superior a duas vezes o menor diâmetro de duas células próximas. Para células de tipos diferentes, a contagem realizada foi individual, independentemente da proximidade.

Contagem Padrão em Placas (CPP)

Esse método foi realizado seguindo-se estritamente as especificações do "Standard Methods-1978" ⁴. Utilizou-se o meio desidratado "Bacto Plate Count Agar", da DIFCO, preparado de acordo com as instruções do fabricante. Realizou-se

plaqueamento em duplicatas e a incubação a $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 3 horas. A leitura e a interpretação dos resultados foram também baseadas nas recomendações da literatura padronizada.

Teste de Redução do Azul de Metileno (TRAM)

Para o preparo das soluções do indicador, utilizou-se o reagente azul de metileno em pó, puro, da MERCK. ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - CI nº 52015).

Como método de referência para comparações, seguiu-se a metodologia preconizada pelo "Standard Methods-1978"⁴, com incubação em banho-maria a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em duplicatas, realizando-se leituras a cada 30 minutos, com suave inversão de todos os tubos que não apresentavam início de redução, a cada leitura, até a completa redução.

Uma vez que a solução preconizada pela metodologia promove uma concentração final de 1:250.000, isto é, uma parte do indicador para 250.000 partes de leite e que, em nosso meio, é uso corrente uma solução que proporciona, respectivamente, uma concentração de 1:200.000, paralelamente realizou-se uma dupla prova de redução em cem (100) amostras de leite.

Em todos os casos, as soluções de uso foram renovadas semanalmente.

Contagem de Células Somáticas (CMCS)

Paralelamente à contagem microscópica de microrganismos, utilizando-se o mesmo material e procedimento, realizou-se a contagem de células somáticas de todas as amostras de leite (379).

Independentemente da proximidade, aglomeração ou tipo, promoveu-se a contagem individual das células presentes no

esfregação, reportando-as genericamente de "células somáticas" , uma vez que a contagem diferencial não foi praticada.

Análise Estatística

Todos os dados do presente trabalho foram estatisticamente analisados com auxílio de computador (Edisa-ED-300) da Unidade de Processamento de Dados da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal-UNESP.

O principal método estatístico utilizado foi o de análise de correlações, através do qual foram obtidos os coeficientes de correlação linear, bem como, pelas análises de regressão, as equações das retas⁹¹.

Nos casos de tipos de leite diferentes, com a obtenção de diferentes retas de regressão, realizou-se o teste de coincidência e/ou paralelismo de retas, verificando-se o grau de significância dessas diferenças⁹¹.

Para a comparação da dupla prova de redução do azul de metileno com concentrações diferentes, além da análise de correlações, realizou-se um teste(t) de comparação de médias com dados pareados⁹¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Adaptação do Método

Ao se pretender correlacionar o método microscópico com outros métodos de contagem ou classificação do leite de uso corrente, bem como avaliar suas possibilidades de aplicação rotineira, tornou-se necessário utilizá-lo de acordo com técnica mais semelhante possível à internacionalmente padronizada, para que a confiabilidade científica fosse mantida. Para tanto, algumas dificuldades iniciais tiveram que ser superadas, principalmente devido ao fato do método ser praticamente desconhecido e muito raramente utilizado em nosso meio. Nesse aspecto, a principal dificuldade diz respeito à aquisição de material indispensável, não encontrado no comércio especializado e com obstáculos à sua importação.

As lâminas microscópicas, com áreas circulares de 1 cm^2 ($d=11,28 \text{ mm}$) previamente demarcadas, se constituíram na principal dificuldade a ser superada, uma vez que a utilização de cartão-guia, que possui áreas demarcadas e é colocado sob lâminas comuns, é prática não recomendável. A indústria nacional especializada no assunto não demonstrou interesse na sua confecção, tornando-se necessárias, portanto, algumas adaptações. Dessa maneira

ra, a melhor adaptação conseguida, que atendeu aos requisitos técnicos, foi a gravação em lâminas comuns de microscopia pelo processo de "silk-screen". Embora por tal processo as lâminas tenham atendido satisfatoriamente à necessidade, a provável falta de habilidade no processo de gravação, na grande maioria dos casos limitou o seu uso a apenas uma vez, em virtude da perda parcial ou total da gravação durante o uso, ou na limpeza posterior.

Outro aspecto a ser contornado, foi quanto ao instrumento adequado à medição e transferência da amostra de 0,01 ml de leite, inicialmente solucionado pela aquisição de pipetas importadas e, posteriormente, pelo teste e aplicação de seringas metálicas nacionais, semi-automatizadas e similares à de SMITH^{7 4}, com capacidade para 10 μ l (0,01 ml) a 20°C.

A preparação da solução corante de NEWMAN-LAMPERT, de acordo com a modificação de LEVOWITZ-WEBER, conforme preconiza a metodologia⁴, por envolver a utilização de reagente importado, esteve sujeita às mesmas dificuldades já aventadas. Até a aquisição do reagente específico, modificações da solução foram testadas, embora os resultados do presente trabalho tenham sido aproveitados somente após a satisfação de todos os aspectos envolvidos pela metodologia padronizada. Embasados na própria literatura^{6 8} de que a solução recomendada baseia-se em princípio totalmente empírico, procedeu-se à substituição simples, por volume, do reagente tetracloreto (C₂H₂Cl₄) em questão, cuja finalidade é desengordurar o esfregaço, por outro de classe semelhante, o clorofórmio (CHCl₃). Aliado ao fato de ser menos tóxico e facilmente encontrado, a solução preparada com este, embora pareça não promover uma ação desengordurante tão efetiva quanto o primeiro, revelou-se perfeitamente viável, uma vez que não se evidenciou qualquer alteração significativa tanto nas características do esfregaço corado, quanto no nível das contagens realizadas.

Por fim, cabe ressaltar ainda a necessidade de inclusão da lâmina micrométrica (1 mm/0,01) dentre as dificuldades iniciais à implantação do método, uma vez que, aliado ao fato de ser indispensável à medição do campo visual para cálculo do "fator -microscópico", trata-se de um acessório que normalmente não acompanha a maioria dos microscópios que podem ser utilizados.

Aplicação do Método

Visando ao comportamento sistemático do método em nossas condições, inicialmente realizou-se uma série de contagens de amostras provenientes do estábulo leiteiro da própria Universidade (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal UNESP). Objetivando-se a aplicação dos métodos a leites com diferentes níveis de contagem, procurou-se obter três grupos distintos de amostras. Assim, parte destas foram examinadas imediatamente após a coleta, com leite recém-ordenhado, parte após permanecerem 3 a 4 horas em temperatura ambiente, e parte, de leite resfriado, da ordenha vespertina do dia anterior, tendo em média 18 horas de estocagem, sendo que, no conjunto, foram analisadas 100 amostras. (Apêndice).

Uma sinópsese desses resultados pode ser avaliada no Quadro I, que procura mostrar o comportamento da contagem microscópica (CM) frente a amostras de leite com níveis de contagem variados, isto é, de baixa, média e alta, selecionados entre os demais resultados, tendo como referência classes delimitadas pela contagem padrão em placas (CPP).

Conforme se verifica, a contagem microscópica promoveu uma super-estimativa dos resultados em relação à contagem padrão em placas para leites com nível de contagem baixa, isto é, inferior

Quadro I - Comportamento da contagem microscópica frente a amostras de baixa, média e alta contagem, tendo como referência a contagem padrão em placas.

Nº	Baixa Contagem		Média Contagem		Alta Contagem	
	CPP <200000/ml		CPP <600000/ml		CPP >1000000/ml	
	CPP	CM	CPP	CM	CPP	CM
1	28000	57000	212000	229000	1210000	912000
2	37000	67000	278000	298000	1210000	1020000
3	73000	206000	315000	407000	1660000	1890000
4	76000	120000	340000	420000	1820000	1180000
5	88000	108000	380000	432000	2230000	1260000
6	89000	146000	390000	391000	2780000	3190000
7	93000	121000	390000	435000	3000000	3740000
8	93000	175000	410000	525000	3350000	2100000
9	98000	146000	420000	445000	4100000	2660000
10	112000	175000	460000	477000	4150000	3940000
11	146000	305000	480000	464000	5600000	5440000
12	174000	276000	480000	458000	6150000	8210000
13	193000	200000	480000	521000	12200000	11500000
14	193000	187000	510000	566000	13200000	10200000
15	198000	203000	580000	594000	14800000	13100000
Média	113000	166000	408000	444000	5160000	4690000

CPP = Contagem Padrão em Placas. CM = Contagem Microscópica.

a 200.000/ml , sendo as diferenças praticamente anuladas para contagens médias, e promovendo uma inversão nos casos de contagens altas. Esse comportamento, embora aqui demonstrado com base na média de apenas quinze resultados para cada classe, é típico e praticamente invariável (conforme pode ser comprovado adiante, pela análise da Fig. 15), estando também de acordo com a literatura compulsada^{45, 88}.

A par de algumas variações individuais inexplicáveis, segundo JENSKINS⁴⁵ e SCHONHERR⁸⁸, as diferenças evidenciadas em baixas contagens resultariam, provavelmente, das variações inerentes a cada método; variações muito amplas para amostras com nível médio diriam respeito à inabilidade de execução, enquanto a inversão que ocorre para altas contagens encontra explicação na fragmentação de grupos ou aglomerados de microrganismos durante as diluições e plaqueamento para o método da contagem em placas. Entretanto, cientes de que a contagem microscópica realiza a estimativa total dos microrganismos presentes na amostra, independentemente de sua viabilidade, tais variações podem ser destituídas de qualquer valor prático, principalmente se faixas de classificação adequadas forem adotadas, onde as diferenças sejam abrangidas e, portanto, anuladas. Por outro lado, na avaliação do nível higiênico da produção, por não distinguir viabilidade, a contagem microscópica pode refletir melhor tais condições.

Após a devida familiarização necessária à aplicação de qualquer técnica, o método mostrou-se plenamente satisfatório no atendimento aos objetivos pretendidos. Assim, sua utilização rotineira é realmente simples e rápida, sendo necessário um mínimo de materiais e equipamentos, sem sofisticação técnica, de baixo custo e, principalmente, se traduzindo em informação confiável em tempo recorde, características essas já enfatizadas por vários autores^{4, 50, 55, 97}. Dessas qualidades resulta a possibilida

de de uma classificação prévia e rápida do leite recebido pelas indústrias de laticínios, que atende não só as necessidades tecnológicas como principalmente o aspecto sanitário, uma vez que uma remessa problema pode ser quase imediatamente detectada e preventivamente desviada do consumo humano, o que efetivamente não ocorre na atualidade. Por outro lado, nesses casos, um exame mais detalhado pode sugerir providências a serem adotadas prontamente, a nível de produção

Conforme enfatizam alguns autcores^{50,97}, o uso da técnica pode ser cansativo devido à fadiga ocular provocada pelo exame de grande quantidade de amostras. Entretanto, pela experiência adquirida, pode-se imputar muito pouco significado a esse fato quando se objetiva a simples classificação do leite recebido. Concorda-se, por outro lado, que alguma fadiga pode sobrevir nos casos de uma análise minuciosa de grande quantidade de amostras com reportagem numérica das estimativas das contagens para altos intervalos de confiança, geralmente acima de 90 a 95%, quando então um grande e variável número de campos, por amostra, necessita ser examinado, fato que, todavia, não é muito diferente daquele provocado pela execução detalhada e trabalhosa da contagem em placas.

A exemplo, para a simples classificação do leite recebido na plataforma, seja para consumo ou uso industrial, e com um "fator-microscópico" de aproximadamente 300.000, o exame de uma amostra que evidencie em média um microrganismo ou grupamento por campo ou menos, sugere uma contagem inferior a 300.000/ml; uma amostra que apresente até quatro microrganismos ou grupamentos por campo sugere um leite de qualidade média, com contagem inferior a 1200.000/ml ; amostras com mais de quatro e menos que cinquenta por campo sugerem um leite de qualidade regular , com contagem oscilando entre 1200.000 e 15.000.000 /ml. Qual

quer cifra superior a cinquenta microrganismos por campo efetivamente diz respeito a um leite de qualidade ruim, muitas vezes não necessitando de qualquer contagem numérica e sim a simples verificação da distribuição homogênea destes no esfregaço corado. Dessa maneira, a contagem de alguns campos, como por exemplo dez, conforme sugeriu MALLMANN ⁶⁴, e posteriormente a simples e rápida varredura visual do esfregaço seria suficiente para a comprovação de classes de qualidade e mesmo para a detecção de alguns problemas sanitários sendo, desse modo, um exame rápido, confiável e em nada cansativo, aplicável a qualquer nível de qualidade.

A seqüência de fotografias, Figs. 3 a 10 procura justamente evidenciar os aspectos aqui discutidos, com amostras enquadradas dentro das respectivas classes; ao mesmo tempo que sugere ao técnico não familiarizado com o método, a aparência de vários campos microscópicos da forma como são examinados, isto é, através da distribuição dos organismos e/ou grupamentos no esfregaço, mantendo-se a ampliação usada para a contagem, isto é, 1.000 vezes. Embora tais fotografias sejam em branco e preto, pode-se verificar o bom contraste entre os microrganismos, fortemente corados, e a película de leite que se cora debilmente. Assim, a Fig. 3 mostra um campo que representa uma amostra de excelente qualidade; a Fig. 4 mostra um leite de boa qualidade onde dois grupamentos são facilmente visualizados; as Figs. 5 e 6 sugerem a aparência de um leite de qualidade regular, com vários microrganismos e/ou grupamentos espalhados pelo campo, praticamente representando o melhor leite a nível de plataforma de recepção do tipo "Especial"; enquanto que as Figs. 7 a 10 sugerem diferentes aspectos de leites de qualidade ruim, que podem ser instantaneamente detectados, evidenciando contaminações maciças. As Figs. 9 e 10 se referem a uma mesma amostra de leite de péssima qualidade; enquanto a primeira mostra a aparência de um campo incontável

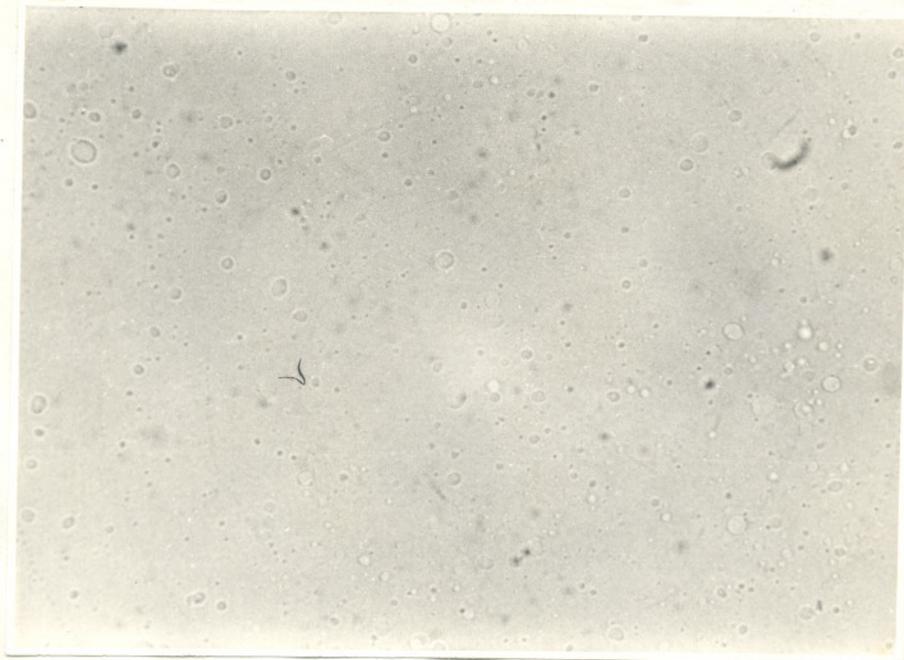


Figura 3. Leite de excelente qualidade, contagem nula. (Representação 1000X).



Figura 4. Leite de boa qualidade.

(1000 X)

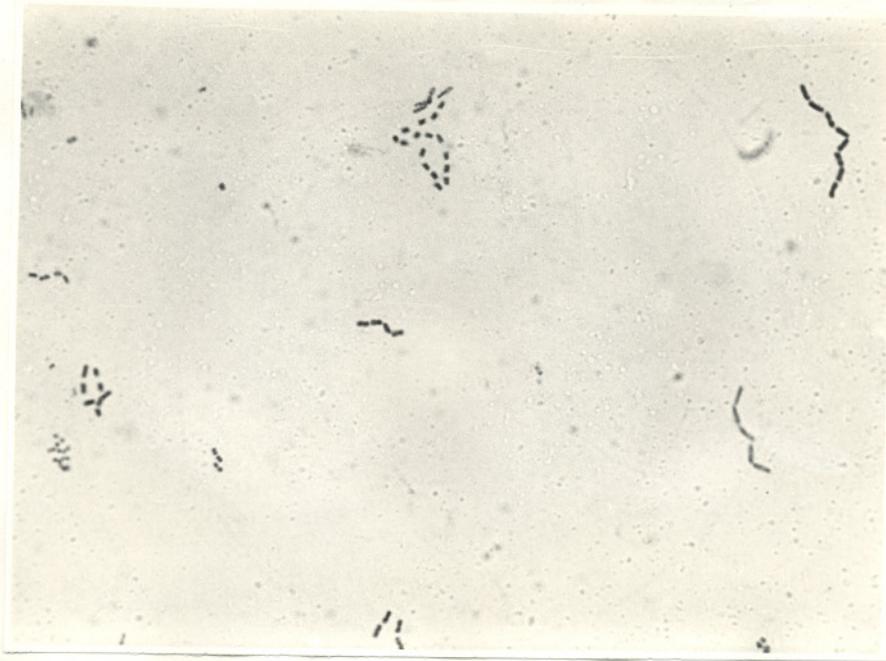


Figura 5. Leite de qualidade regular.

(1000 X)

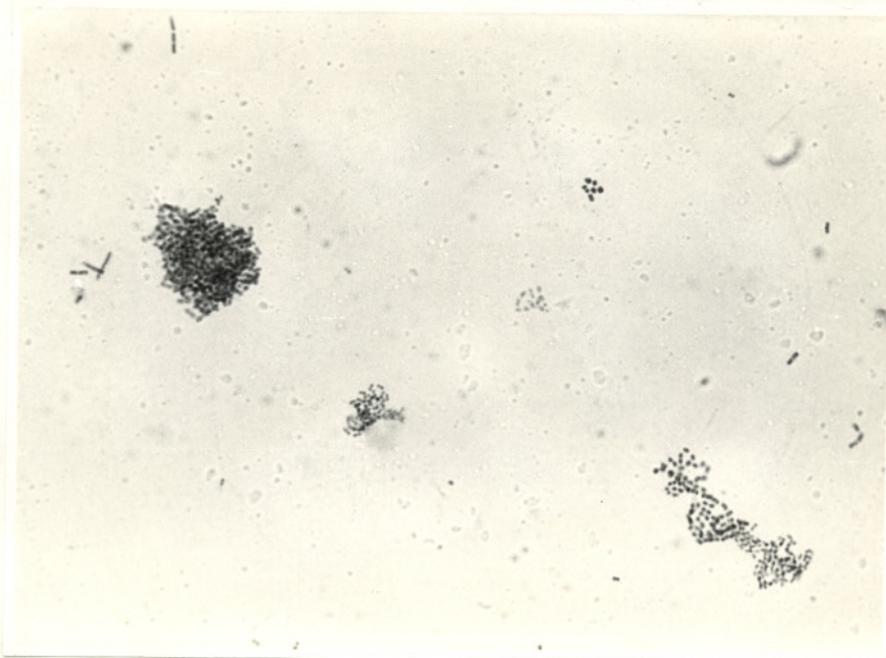


Figura 6. Leite de qualidade regular

(1000 X)



Figura 7. Leite de qualidade ruim.

(1000 X)

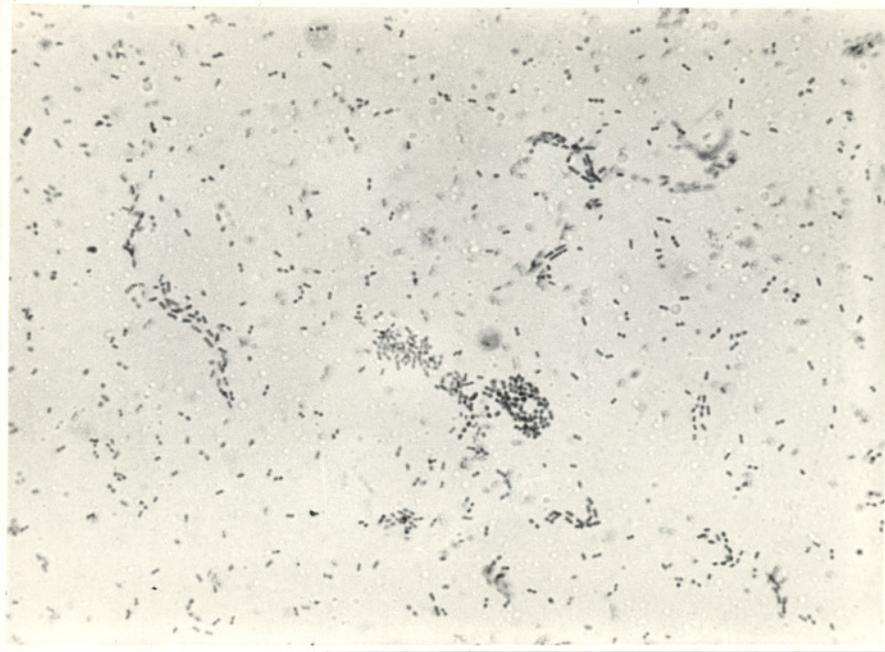


Figura 8. Leite de qualidade ruim.

(1000 X)

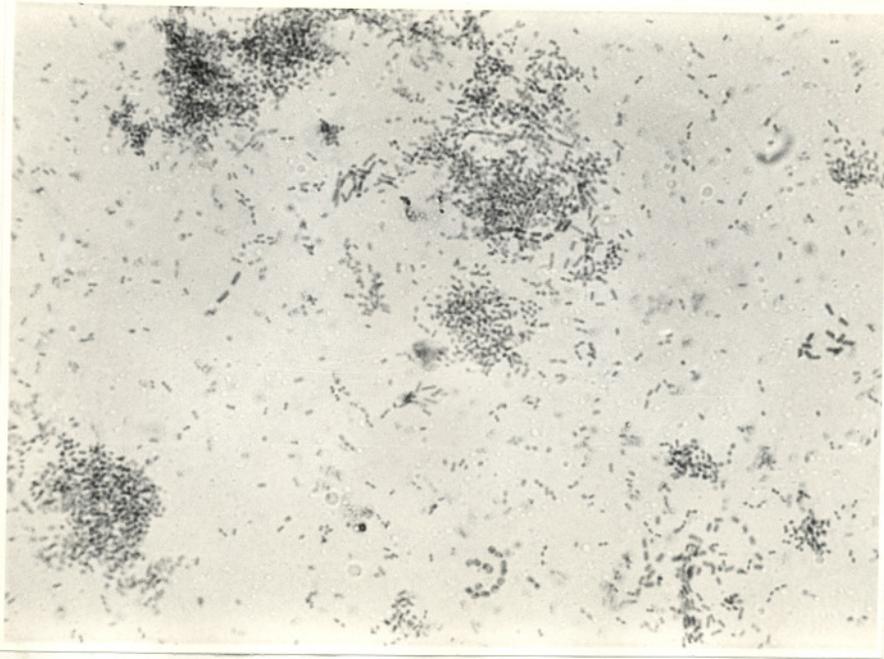


Figura 9. Leite de péssima qualidade.

(1000 X)

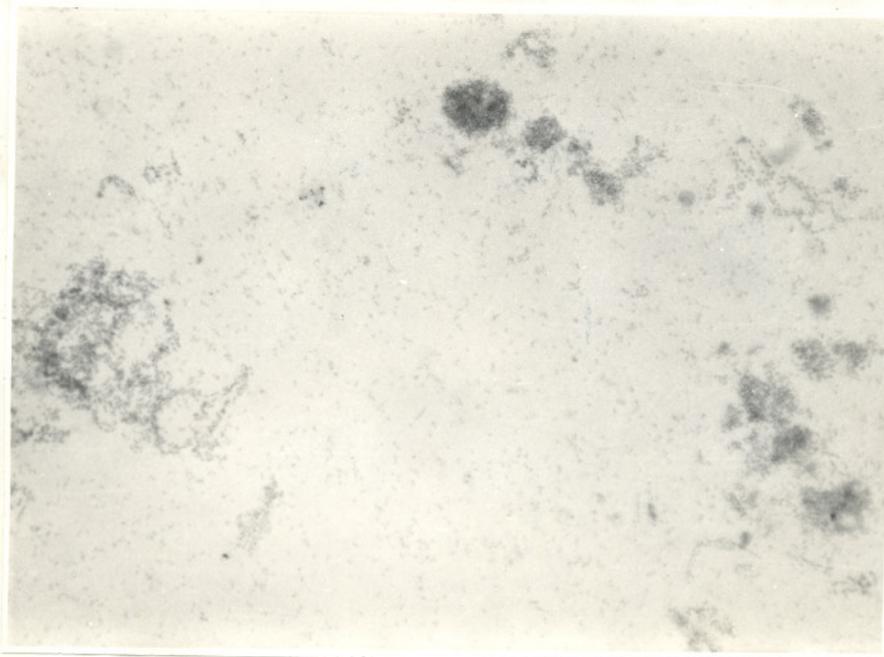


Figura 10. Representação da Fig. 9 no aumento de 400X.

com aumento de 1.000 vezes, a segunda procura mostrar a distri
buição praticamente homogênea dos microrganismos na amostra, com
o campo ampliado, isto é, um aumento microscópico menor, de 400
vezes.

Do mesmo modo, outros problemas sanitários podem ser
diagnosticados por técnico experimentado ou, pelo menos, efetivar
a suspeita de um leite anormal, conforme mostram as Figs. 11
e 12. Assim, a Fig. 11 evidencia um campo visual com uma quantida
de anormal de células somáticas, o que sugere ao menos um trans
torno secretório. A fig. 12, além de grande número de células
somáticas, mostra longas cadeias de estreptococos indicando, com
enorme probabilidade, a existência de mastite estreptocócica nos
animais de produção. Deve-se observar que tais leites se referem
a amostras de latões tomadas a nível de plataforma de recepção,
representando produtores individuais. Desse modo, torna-se extre
mamente fácil a identificação e a possível sugestão de medidas
adequadas à resolução dos problemas evidenciados, como também
a partir de sua detecção, mantê-lo sob vigilância mais estreita,
inclusive com a realização de exames detalhados.

Como as fotos até aqui apresentadas são em branco e pre
to, dificultando a imaginação de um esfregaço corado, incluíram-
-se nas Figs. 13 e 14, duas fotos coloridas, com o propósito de
mostrar mais fidedigamente, esfregaços corados como são realmente
vistos ao microscópio. Assim, a Fig. 13, apesar de alguma defici
ência de iluminação, mostra um leite de excelente qualidade, onde
nem microrganismos nem células somáticas são visualizados no cam
po; enquanto a Fig. 14, embora se trate de um leite efetivamente
anormal, mostra os vários contrastes entre os microrganismos, as
células somáticas e a película de leite, promovidos pela colora
ção empregada no método.

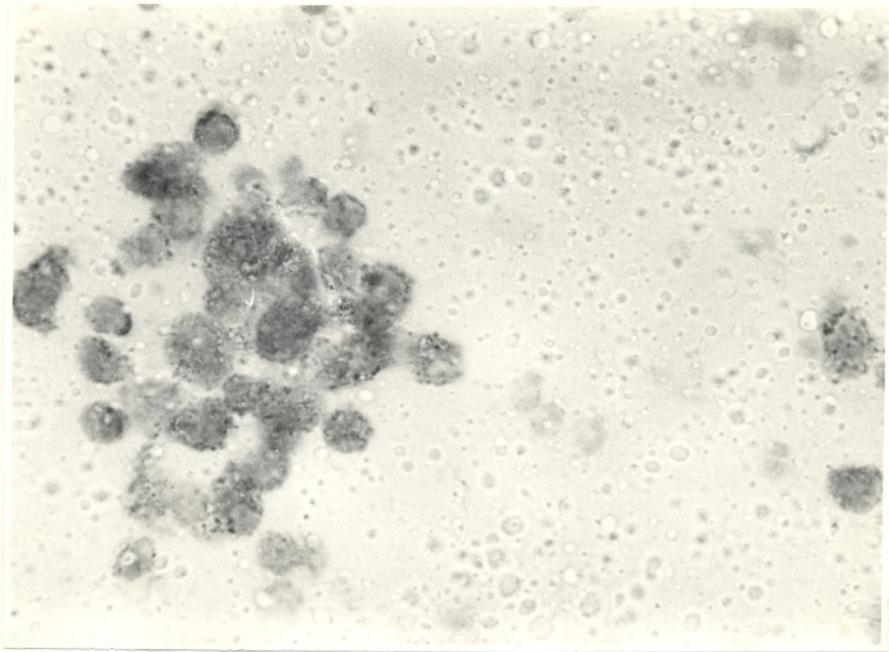


Figura 11. Leite anormal, excesso de células somáticas. (1000X)



Figura 12. Leite anormal, evidência de mastite estreptocócica. (1000 X).



Figura 13. Campo visual típico de uma película corada, sem a presença de células. (1000 X)



Figura 14. Contrastes entre microrganismos, células somáticas e película de leite. (1000 X)

Comparação do Método Microscópico com a Contagem em Placas

Com o objetivo de se verificar os níveis de afinidade entre as técnicas, 215 amostras de leite cru, respectivamente 100 do tipo "Especial 3,2% G". e 115 do tipo "B", foram analisadas através da contagem microscópica e em placas.

O resultado gráfico mostrado na Fig. 15, visa a sintetizar as inter-relações observadas na aplicação de ambas as técnicas. Pode-se verificar, como foi discutido anteriormente, que as maiores diferenças entre as técnicas ocorreram para contagens inferiores a 200000/ml. Nesse aspecto, a observação detalhada mostra que, a par do bom coeficiente de correlação encontrado ($r= 0,89$), a reta de regressão determinada pelos pontos apresenta uma nítida diferença de inclinação quando comparada a um segmento de reta traçado no ângulo de 45° que representaria, hipoteticamente, perfeita identidade entre os métodos. O segmento de terminado mostra claramente, em comparação, o que se poderia chamar um "desvio superior" para leites de baixa contagem e um "desvio inferior" para leites de contagens muito altas, justamente como sugerem os dados de JENSKINS⁴⁵ e SCHONHERR⁸⁸, com ponto de inflexão próximo a contagens de 1000000/ml.

A análise estatística comparativa, independentemente do tipo de leite, mostrou um coeficiente de correlação linear entre as técnicas de $r= 0,89$, configurando que aproximadamente 79% (r^2) dos resultados perfazem fielmente o segmento de reta determinado, para intervalo de confiança de 95%.

Os mesmos resultados, agora levando em conta o tipo de leite, evidenciam algumas pequenas diferenças. Assim, o coeficiente de correlação determinado para o leite tipo "Especial" foi

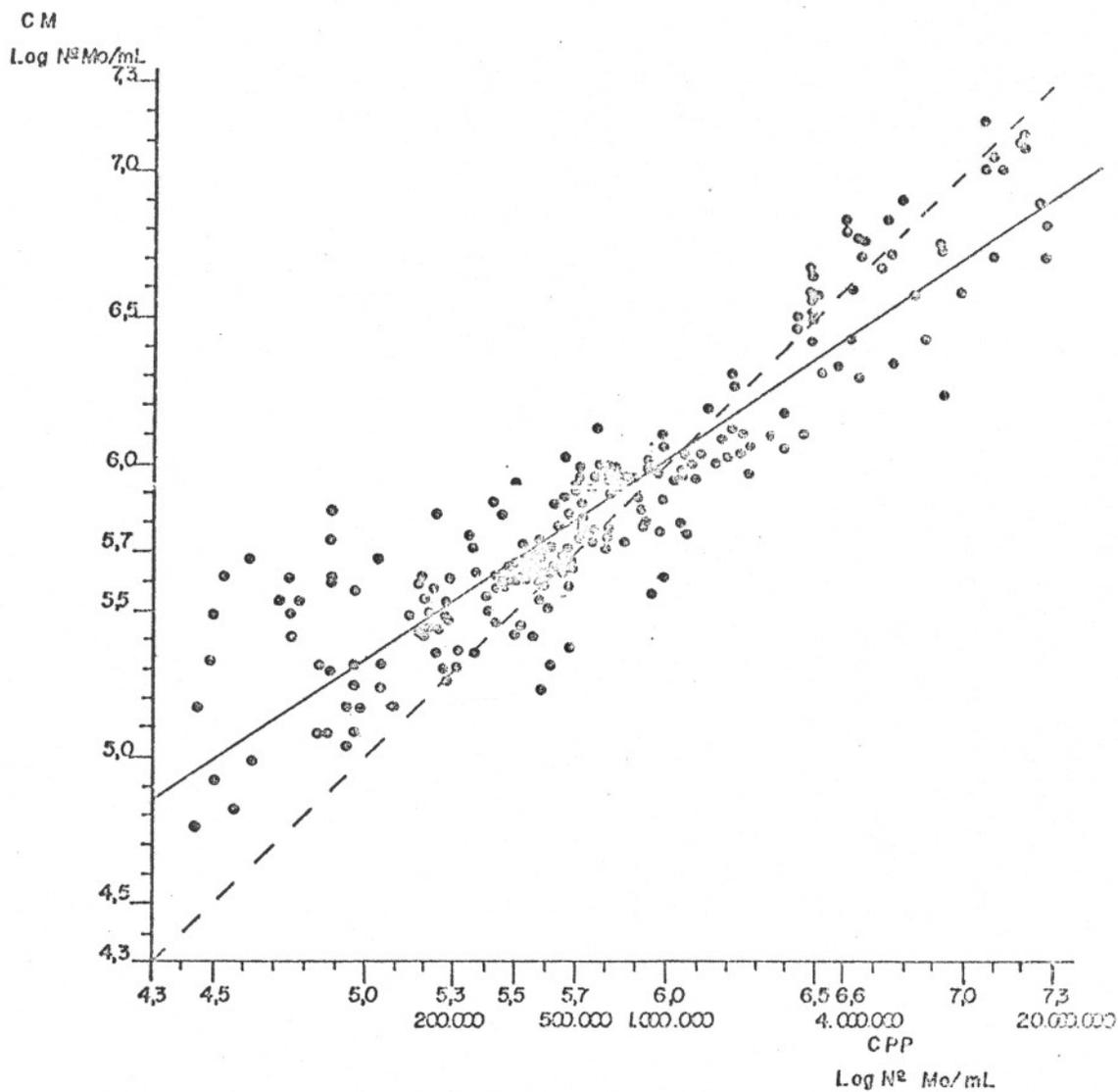


Figura 15. Comparação gráfica dos resultados da contagem microscópica com a contagem padrão em placas, em 215 amostras de leite cru.

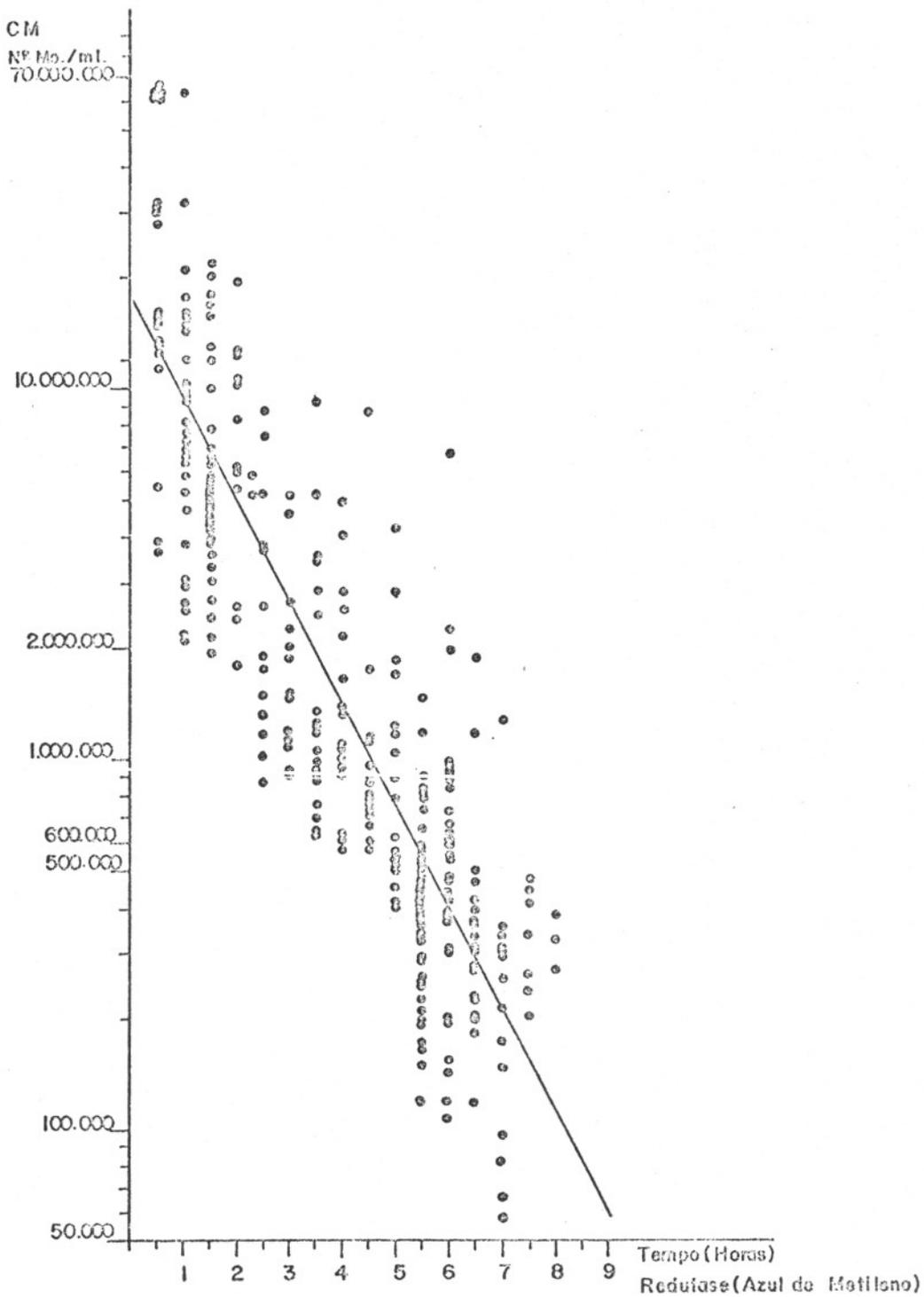
de $r=0,91$, enquanto para o leite tipo "B" foi $r=0,86$. Mais uma vez, aqui, os resultados configuram que as maiores diferenças ocorrem para leites de melhor qualidade.

A correlação linear encontrada nos resultados acima, independentemente do tipo de leite, foi sensivelmente melhor que a citada por DABBAH²², muito provavelmente em função das diferentes condições de trabalho e da qualidade dos leites analisados.

A observação de correlação tão significativa aliada à exequibilidade ímpar, sugere que o método microscópico seria um dos mais indicados, dada as nossas condições, para a classificação do leite recebido nas indústrias de laticínios, independentemente do seu tipo, configurando-se ainda numa alternativa viável que supre uma necessidade atual para a classificação do leite tipo "B". Além desses fatos, como o órgão encarregado da fiscalização a nível dos laticínios é o mesmo que fiscaliza as condições de produção, sua eficiência poderia ser melhorada, uma vez que a contagem microscópica oferece informações adicionais importantes, fato que não acontece com os demais métodos.

Comparação do Método Microscópico com o Teste da Redutase

Objetivando-se verificar as correlações entre a contagem microscópica e o teste de redução do azul de metileno, foram analisadas 319 amostras de leite cru, sendo respectivamente 204 de leite tipo "Especial" e 115 do tipo "B". Os resultados foram representados graficamente, Fig. 16. O coeficiente de correlação linear de $r=0,86$ foi muito bom, semelhante ao encontrado entre a contagem microscópica e a padrão em placas no presente trabalho, e ao citado por DABBAH²².



ra 16. Comparação gráica dos resultados da contagem micros-
cópica com o teste de reduase, em 319 amostras de le-
te cru.

Nessa comparação, o tipo de leite apresentou menor influência, uma vez que os coeficientes determinados foram, respectivamente, -0,84 e -0,86 para o leite "Especial" e o "B". Foi interessante verificar que houve uma inversão dos valores da correlação, uma vez que, nesse caso, o leite tipo "B" mostrou uma melhor correlação.

Através do traçado da reta que representa a regressão determinada, verifica-se que nenhuma associação satisfatória existe entre contagens ao redor de 500000/ml e tempo de redução de 3:30 horas, padrão até pouco tempo adotado pelo Ministério da Agricultura¹² visando à classificação do leite "B" produzido. Nesse aspecto, se não a ideal, uma melhor identidade é oferecida entre contagens de 500000/ml e tempo de redução de 5h e 30 min. Essas afirmativas são também consubstanciadas pela análise da Fig. 17, que correlaciona os resultados da contagem padrão em placas com o tempo de redução do método do azul de metileno, onde interpretação semelhante é observada, inclusive com coeficiente de correlação muito próximo ao determinado para a contagem microscópica, ou seja, $r=0,88$. A análise conjunta das Figs. 16 e 17, além desta, oferece outras interpretações, como por exemplo, pelo traçado quase idêntico das regressões, verifica-se as interrelações entre os métodos, oferecendo subsídios para a identidade em quaisquer níveis de contagens, fatos que exprimem a necessidade de seu estudo para a elaboração de padrões.

Tendo em vista que, normalmente, a solução de azul de metileno utilizada em nosso meio para a realização do teste proporciona uma concentração final de aproximadamente 1:200000 partes, respectivamente de azul de metileno e leite, enquanto a metodologia preconizada internacionalmente⁴ prevê uma concentração de 1:250000 partes, paralelamente, foi objeto de comparações, também, a concentração de azul de metileno na solução em

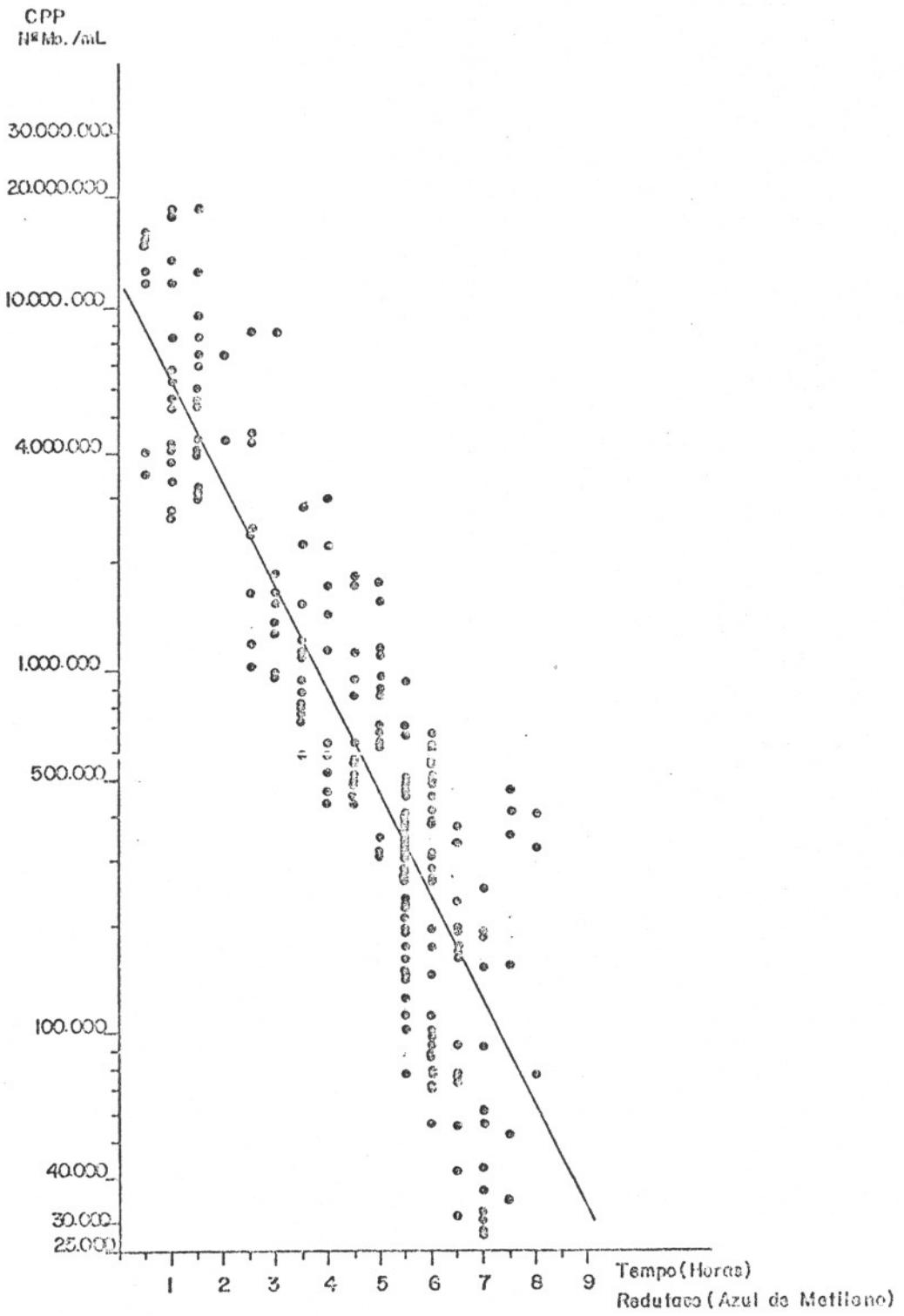


Figura 17. Comparação gráfica dos resultados da contagem padrão em placas com o teste de redutase, em 215 amostras de leite cru.

pregada na realização dos testes de redução. Para tanto, com (100) amostras de leite foram submetidas a dupla prova de redução, nas respectivas concentrações citadas. Os resultados obtidos, embora evidenciem algumas diferenças individuais, principalmente em casos de pequeno tempo de redução uma vez que uma concentração maior (1:200000) exige mais tempo para evidenciar alterações de cor, não mostraram, entretanto, diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidades no teste de comparação de dados pareados, confirmado também pelo excelente coeficiente de correlação determinado, da ordem de $r=0,99$, conforme se verifica na Fig. 18.

Outras Comparações

Concomitantemente à contagem microscópica de microrganismos, realizou-se a contagem de células somáticas do leite, procurando verificar, principalmente, a correlação ou influência do número destas no tempo de redução do teste do azul de metileno e, aproveitando os dados disponíveis, foram avaliadas também possíveis associações entre a contagem de células somáticas e as demais provas microbiológicas realizadas, ou seja, contagem microscópica e contagem padrão em placas. Com relação à contagem de células somáticas verifica-se que os coeficientes encontrados foram muito baixos, variando de $-0,11$ a $0,24$, confirmando evidências de outros autores^{19,23,51,85,97,103,104}. Observa-se, ainda, que o menor coeficiente ($r=0,11$) ocorreu entre a contagem microscópica de células somáticas e o tempo de redução do azul de metileno. Nesse aspecto, a evidência de que nenhuma correlação significativa, a nível de plataforma, existe entre essas duas variáveis, pode ser também comprovada na Fig. 19, sendo esses resultados consoantes com as observações de CHARLETT¹⁹ e WILSON^{103,104}, ao

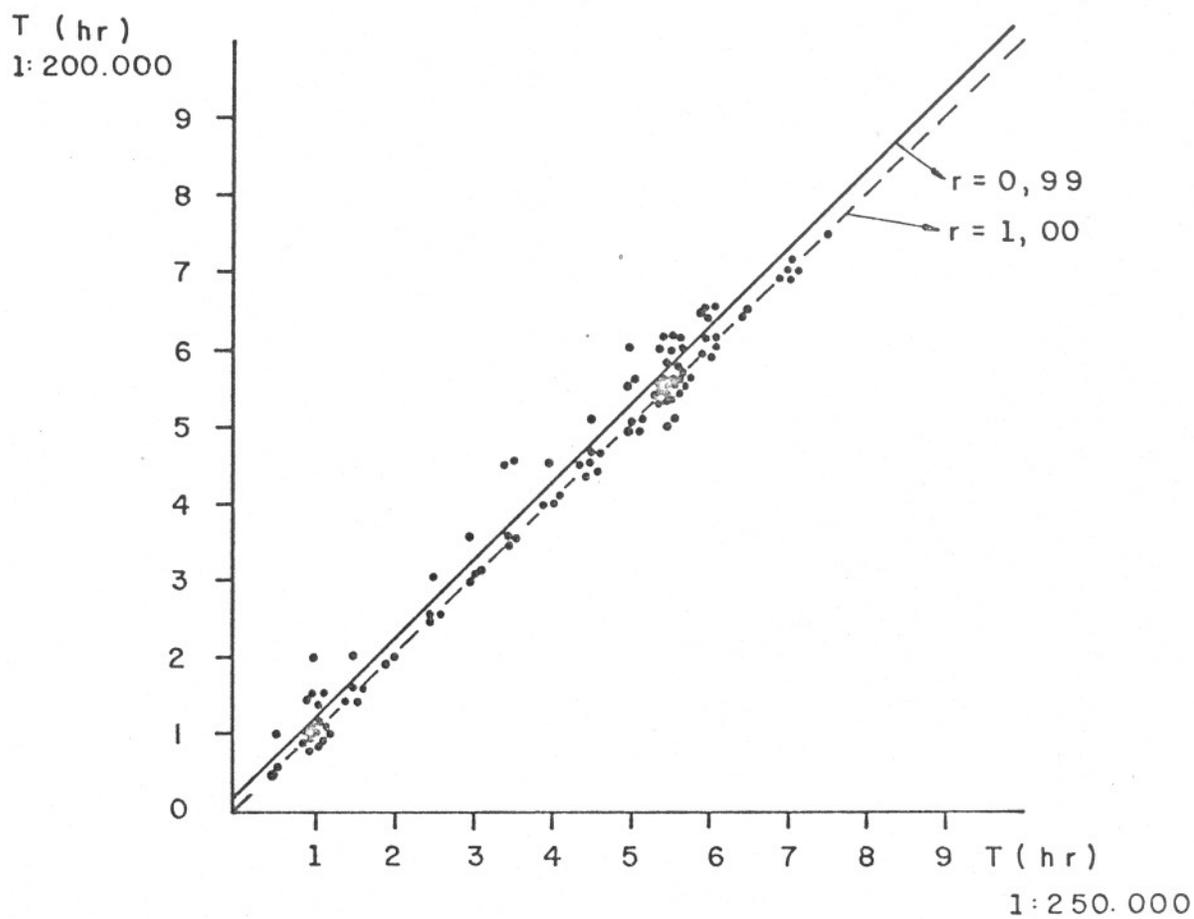


Figura 18. Correlação entre tempos de redução proporcionados por soluções de azul de metileno com concentrações finais de 1:200000 e 1:250000.

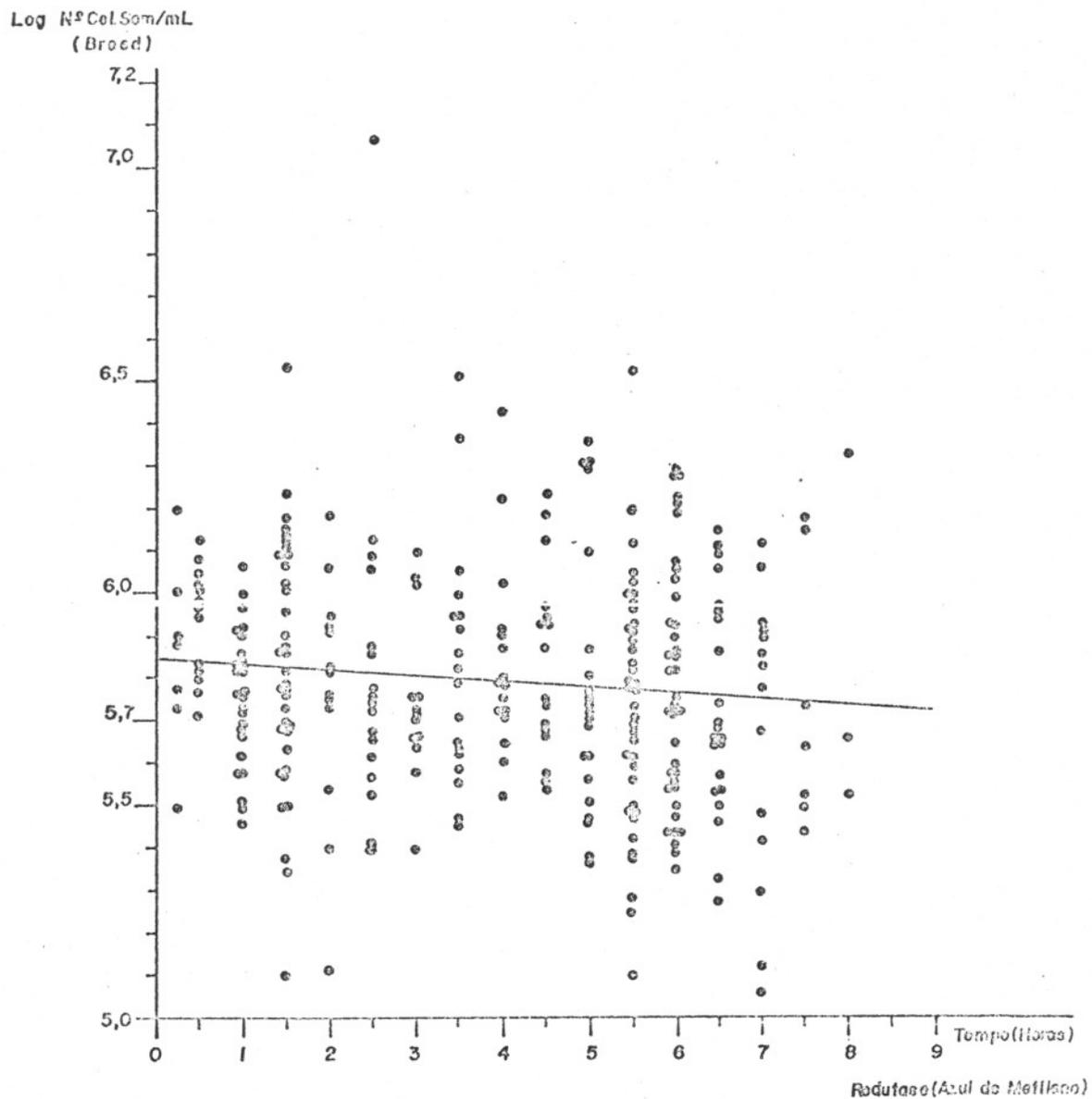


Figura 19. Comparação gráfica dos resultados da contagem microscópica de células somáticas com o teste de redutase, em 319 amostras de leite cru.

mesmo tempo que contradizem as observações de LOPES⁶² e NADER FILHO⁷², embora este último tenha trabalhado especificamente com leite mastítico.

Com a finalidade de sumarizar as informações discutidas no texto, bem como facilitar possíveis comparações com base nas inter-relações, todas as correlações estimadas no presente trabalho foram agrupadas no Quadro II, inicialmente subdivididas quanto ao tipo de leite e, no final, representadas pelos valores obtidos com base no total dos resultados, independentemente do tipo de leite.

Qualidade Microbiológica do Leite Cru

No total, foram examinadas 319 amostras de leite cru, sendo 204 do tipo "Especial" e 115 do tipo "B", pelos métodos descritos, o que, conseqüentemente, permitiu uma avaliação da qualidade microbiológica do leite ao chegar à plataforma de recepção das indústrias de laticínios. (Apêndice).

De um modo geral, pôde-se concluir que a qualidade microbiológica do leite tipo "Especial" recebido é muito variável, havendo contrastes absolutos. Nesse aspecto, ao lado de produtores que conseguem manter um nível aceitável de qualidade, verificou-se a existência de leites, tanto de ótima quanto de péssima qualidade. Contudo, pela inexistência de qualquer controle prático, e muito provavelmente em função dos desestímulos à produção, de um modo global, pôde-se concluir por uma qualidade microbiológica insatisfatória do leite recebido. Alguns fatos, entretanto, chamaram atenção. Observou-se que, normalmente, o leite recebido na plataforma até às 9h e 30 min. da manhã, tanto na entrega individual pelo próprio produtor quanto de "linhas"

Quadro II. Coeficientes de correlação linear (associações) estimados entre as técnicas, dos resultados referentes a leite tipo "Especial", tipo "B" e do total dos resultados, independentemente do tipo de leite.

Variáveis	CPP	TRAM	CMCS
<u>Leite tipo "Especial"</u>			
CM	0,9061	-0,8444	0,4389
CPP	-	-0,9321	0,6422
TRAM	-	-	-0,3347
<u>Leite tipo "B"</u>			
CM	0,8565	-0,8639	0,4062
CPP	-	-0,8284	0,2194
TRAM	-	-	-0,2294
<u>Total dos resultados</u>			
CM	0,8874	-0,8592	0,2218
CPP	-	-0,8788	0,2391
TRAM	-	-	-0,1071

CPP=Contagem padrão em placas. TRAM=Teste de redução do azul de metileno. CMCS=Contagem microscópica de células somáticas. CM = Contagem microscópica de microrganismos.

de coleta, apresentaram um nível de qualidade aceitável para as nossas condições de produção, sendo que excepcionalmente o leite de um produtor ultrapassou cifras de 10000000 de microrganismos / ml.

Essa condição, todavia, se inverte após esse horário, quando predomina a recepção de leite proveniente de "linhas" mais distantes, que geralmente congregam uma grande quantidade de pequenos produtores. Nessas condições, raramente se verificou a existência de leites com contagens microscópicas inferiores à cifra citada, sendo que, de modo geral, as contagens situaram-se em faixa superior a 15000000. Ao mesmo tempo que essas contaminações maciças são detectadas principalmente em leites de pequenos produtores, que muito provavelmente encontram maiores dificuldades tanto para o conhecimento quanto para a adoção de preceitos técnicos na produção e mesmo na manutenção do estado sanitário do rebanho, é muito comum a detecção de leites anormais, representados por grande quantidade de células somáticas no esfregaço corado, e mesmo pela presença destas associadas a microrganismos, sugerindo a existência de mastite nos animais da produção.

A nível de plataforma de recepção de leite tipo "B", outros fatores chamaram atenção. Observou-se, por exemplo, ser muito freqüente, em dados obtidos dos laboratórios de controle de qualidade das indústrias, as alterações de crioscopia, prova de cloretos positiva e baixa acidez, determinada por titulação. Foi possível comprovar, que embora o número de microrganismos estivesse dentro do normal, a contagem de células somáticas geralmente ultrapassava a 1500000/ml, sugerindo a existência de algum transtorno secretório, mesmo que sub-clínico. Outro aspecto verificado, e já enfatizado por outros autores^{63, 77, 100}, é a incapacidade da maioria dos produtores desse tipo de leite em manter seu produto dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos. Nesse

caso, pela legislação vigente, das amostras analisadas pela contagem microscópica, 49% estiveram acima do limite de 500000/ml, enquanto pela contagem padrão em placas, essa cifra caiu para 44%. Por outro lado, com a prova de redução do azul de metileno, tendo como referência para interpretação o tempo de 3h e 30 min. conseguiu-se detectar apenas 18% das amostras com contagem acima de 500000. No entanto, quando se aumentou o tempo para 5h e 30 min., essa técnica teve sua eficiência aumentada para 40%, praticamente se igualando à contagem em placas. Esses fatos são confirmados pela média global das contagens realizadas, que pela CPP se situou aproximadamente em 725000 e pela CM em 890000/ml.

Independentemente da legislação em vigor e do tipo de leite, pelo total dos resultados obtidos na execução dos três métodos para a classificação do leite, tentou-se ordená-los em cinco classes, Quadro III, cada uma correspondendo a um nível de qualidade, definidos pelos valores médios obtidos para cada método.

Pela análise da legislação específica ^{11, 12}, de alguma literatura referente às nossas condições ^{13, 14, 15, 63}, _{82, 100.}, e dos próprios resultados obtidos, verifica-se a total impropriedade dos padrões atuais, conforme salienta OLIVERIA & BORGES ⁷⁷, para a produção dos vários tipos de leite. Esse fato é agravado pela adoção de um único padrão para um país de características continentais e de contrastes absolutos, onde conceitos empíricos se misturam a padrões rígidos importados de países onde a tecnologia é bem mais avançada. Assim, nossa legislação estabelece um tipo de leite de ótima qualidade, denominado de "A", com o máximo 10000/ml antes da pasteurização e não mais que 500 depois desta; um leite tipo "B", com até 500000 antes e até 40000 após a pasteurização; e não estabelece qualquer cifra para o que denomina "outros tipos de leite", limitando-se a fixar em 100000 o número máximo de

Quadro III. Classes de qualidade definidas pelos valores médios obtidos dos resultados da contagem microscópica (CM), contagem padrão em placas (CPP) e teste de redução do azul de metileno (TRAM).

Classe	Qualidade	CM	CPP	TRAM
		Nº Mo./mL	Nº Mo./mL	Tempo (Min.)
I	Ótima	320000	200000	> 330
II	Boa	850000	650000	> 210
III	Regular	3400000	2300000	> 120
IV	Ruim	9000000	7500000	> 60
V	Péssima	20000000	-----	≤ 60

Mo.= Microrganismos.

microrganismos após a pasteurização, embora inexplicavelmente ou infelizmente dentro desse último tipo se situe a quase totalidade do leite consumido no país, mais de 75% do consumido no Estado de São Paulo ¹⁵.

Ao contrastarem-se as condições sócio-econômicas vigentes com as condições necessárias à produção de leite tipo "A", verifica-se a quase total impraticabilidade de tal iniciativa, que embora possa motivar algum empresário privilegiado, provavelmente não se sustenta no mercado pela falta de consumidores. Essa hipótese não é, todavia, uma suposição, uma vez que o próprio Boletim Estatístico 81-82 ¹⁵ relaciona três granjas leiteiras no Estado de São Paulo, sem entretanto estabelecer qualquer volume de produção desse tipo de leite. Por outro lado, o estabelecimento de um padrão tão rigoroso somente encontra paralelos nos antigos padrões internacionais que objetivaram um tipo de leite de ótima qualidade para ser consumido cru, em hospitais e estabelecimentos afins.

As mesmas restrições se aplicam ao leite tipo "B". Segundo o mesmo Boletim ¹⁵, sua produção está praticamente estabilizada desde 1977, em cerca de 300 milhões de litros anuais no Estado de São Paulo, representando aproximadamente 23% da produção total de leite do Estado, ao mesmo tempo que esta experimentou um decréscimo de mais de 200 milhões de litros de 1977 a 1982. Considerando-se que pelos dados de outros autores ^{63, 100}, mais de 50% do leite "B" produzido apresenta mais de 500000/ml, verifica-se que além da rigidez e inadequação dos padrões, essas condições depõem contra o próprio serviço encarregado de sua execução e fiscalização, gerando aparente ineficiência, descréditos e críticas de outros setores.

Diante de tal situação, e dispondo dos resultados do presente trabalho com base nos três principais métodos recomendados

para a classificação do leite, bem como de suas inter-relações determinadas estatisticamente, foi possível ser determinado, Quadro IV, com base nos dados obtidos, um sistema de classificação mais homogêneo, não com o objetivo de fixar novos padrões, mas de incentivar a sua discussão e de oferecer alguns subsídios a futuros estudos nesse sentido.

Uma vez que mais de 75% da população é abastecida com leite que praticamente não é controlado, acredita-se que a classificação proposta como subsídio não se traduz em retrocesso, e sim numa adequação à nossa realidade, mais especificamente a do Estado de São Paulo. Nada impede que, sem qualquer prejuízo e em qualquer época, padrões sejam reestudados e alterados, em função do estágio de desenvolvimento dos setores envolvidos.

Aplicação da Contagem Microscópica a Leite Pasteurizado

Os métodos foram também aplicados a 60 amostras de leite pasteurizado, sendo 30 amostras de leite tipo "Especial" com três marcas distintas: A (12), B (12) e C (6), e 30 de leite tipo "B", de uma única marca: A. Esse tipo de leite foi adquirido no comércio da cidade de Jaboticabal-SP, representando as marcas comercializadas, sendo estas procedentes de diferentes regiões do Estado de São Paulo. O objetivo maior dessa etapa foi o de comprovar o comportamento da contagem microscópica a esse tipo de leite.

Quanto ao aspecto técnico da execução da contagem microscópica, verificou-se que o leite pasteurizado dá origem a um esfregaço de qualidade excelente, provavelmente devido a alguma redução no tamanho dos glóbulos de gordura, durante o beneficiamento, notando-se também uma baixa incidência de grupamentos bacterianos, que talvez pelo mesmo fato, faz com que predomine a

Quadro IV. Sistema de classificação obtido com base nas inter-relações dos resultados da contagem microscópica (CM), contagem padrão em placas (CPP) e teste de redução do azul de metileno (TRAM).

Qualidade	CM	CPP	TRAM
	Nº Mo./mL	Nº Mo./mL	Tempo (Min.)
Ótima	\leq 300000	\leq 200000	> 360
Boa	\leq 1200000	\leq 1000000	> 210
Regular	\leq 6000000	\leq 6000000	> 120
Ruim	\leq 15000000	\leq 15000000	> 60
Péssima	> 15000000	> 15000000	\leq 60

Mo.= Microrganismos.

existência de microrganismos isolados. Evidenciou-se também, que em comparação ao leite cru, apresenta uma baixa quantidade de células somáticas por mililitro, também provavelmente devido às etapas tecnológicas a que é submetido, como a filtração e a padronização. De um modo geral a película cora-se bem, sendo que os microrganismos se coram em variados graus, o que torna necessário um constante reajuste do foco através do micrômetro, enquanto as células somáticas continuam se corando muito bem, inclusive parecendo aumentar seu poder de definição.

Conforme salienta a literatura ^{4, 68, 69}, o método de contagem microscópica utilizando a solução corante modificada por LEVOWITZ-WEBER, usada no presente trabalho, não encontra uma indicação plena para esse tipo de leite, uma vez que sendo basicamente um corante de ácido nucleicos, faz com que aquelas células lisadas pelo tratamento térmico não sejam detectadas. Já existe, entretanto, na literatura ^{68, 69}, descrição de método de coloração apropriado, que não mostra diferenças entre contagens realizadas antes ou após a pasteurização, fazendo com que o método possa ser utilizado para a estimativa da vida pregressa desse tipo de leite, quando já no mercado ou em qualquer tempo.

Os resultados de todas as análises executadas em leite pasteurizado foram tabulados nos Quadros V e VI, sendo as contagens reduzidas a uma única potência dentro de cada método, objetivando-se facilitar as comparações. Embora não dispondo da avaliação do mesmo leite quando cru, pode-se perfeitamente estimar sua vida pregressa, em termos de qualidade microbiológica, pela contagem microscópica. Esse aspecto pode ser melhor visualizado pela comparação com os resultados da CPP, que traduz os microrganismos viáveis remanescentes. Assim, baseando-se nesse princípio, ao se comparar os dois tipos de leite pasteurizados é possível ter uma retrospectiva através da CM da sua qualidade

Quadro V. Resultados das contagens microbiológicas (CPP e CM) , de células somáticas (CMCS) e tempo de redução do azul de metileno (TRAM), em amostras de leite pasteurizado, tipo "Especial", de três diferentes marcas.

Amostras	Marca	CPP Nº/mLx10 ³	CM Nº/mLx10 ⁵	CMCS Nº/mLx10 ⁴	TRAM Min.
1	A	80,0	84,0	14,0	390
2	A	85,0	83,0	13,0	390
3	A	130,0	98,0	7,0	420
4	A	150,0	98,0	11,0	450
5	A	180,0	91,0	4,1	420
6	A	220,0	104,0	14,0	390
7	A	240,0	67,0	8,9	390
8	A	280,0	68,0	8,9	390
9	A	480,0	94,0	3,2	480
10	A	570,0	102,0	11,0	450
11	A	580,0	101,0	6,0	510
12	A	590,0	100,0	5,7	510
(\bar{x})	A	(298,7)	(90,8)	(8,9)	(433)
13	B	23,0	26,0	5,4	450
14	B	24,0	31,0	9,8	390
15	B	24,0	31,0	7,3	390
16	B	25,0	37,0	5,7	420
17	B	26,0	30,0	5,7	450
18	B	26,0	51,0	8,9	480
19	B	27,0	32,0	12,0	450
20	B	27,0	43,0	12,0	420
21	B	28,0	50,0	6,4	480
22	B	30,0	34,0	7,0	450
23	B	110,0	32,0	5,1	240
24	B	130,0	30,0	11,0	240
(\bar{x})	B	(41,7)	(35,6)	(8,0)	(405)
25	C	19,0	71,0	9,8	480
26	C	20,0	56,0	14,0	480
27	C	21,0	63,0	10,0	450
28	C	22,0	55,0	3,8	480
29	C	22,0	44,0	4,0	450
30	C	23,0	45,0	4,1	450
(\bar{x})	C	(21,2)	(55,7)	(7,6)	(465)
Média		140,4	61,7	8,3	428

Quadro VI. Resultado das contagens microbiológicas (CPP e CM) , de células somáticas (CMCS) e tempo de redução (TRAM), em amostras de leite pasteurizado tipo "B".

Amostras	Marca	CPP Nº/mLx10 ³	CM Nº/mLx10 ⁵	CMCS Nº/mLx10 ⁴	TRAM Min.
1	A	3,2	10,0	8,9	540
2	A	4,3	6,9	7,0	540
3	A	4,5	11,0	11,0	540
4	A	4,7	20,0	30,0	540
5	A	4,9	8,7	14,0	540
6	A	5,2	24,0	29,0	540
7	A	5,2	23,0	28,0	540
8	A	5,4	6,5	5,7	540
9	A	7,3	23,0	29,0	540
10	A	19,0	8,7	28,0	480
11	A	20,0	8,6	18,0	510
12	A	22,0	8,6	12,0	510
13	A	23,0	10,0	33,0	450
14	A	26,0	9,5	34,0	450
15	A	28,0	9,7	38,0	450
16	A	29,0	6,4	28,0	450
17	A	29,0	7,4	34,0	450
18	A	30,0	10,0	30,0	420
19	A	30,0	7,8	25,0	420
20	A	94,0	18,0	27,0	420
21	A	120,0	20,0	33,0	420
22	A	120,0	21,0	21,0	390
23	A	120,0	19,0	34,0	390
24	A	150,0	14,0	27,0	420
25	A	180,0	17,0	23,0	420
26	A	210,0	24,0	27,0	390
27	A	230,0	24,0	23,0	390
28	A	240,0	22,0	21,0	390
29	A	240,0	22,0	30,0	360
30	A	250,0	23,0	25,0	360
\bar{x}	A	75,2	14,8	24,4	460

antes da pasteurização, verificando-se que o leite tipo "B" é sensivelmente melhor que o tipo "Especial", apresentando uma média de 1480000/mL contra 6170000/mL. Ao se visualizar a mesma comparação utilizando a contagem de microrganismos viáveis, embora em valores numéricos relativamente menores, 75000 e 140000 para o tipo "B" e "Especial", respectivamente, depara-se com a mesma diferença de qualidade em benefício do leite tipo "B". Pelas distintas marcas dentro do leite "Especial", referindo-se a diferentes regiões, verifica-se claramente que a qualidade microbiológica do leite recebido pelas indústrias B e C, é sensivelmente melhor que a do recebido pela A.

Ainda, pela contagem microscópica, agora com respeito ao número de células somáticas, observa-se também grande variação. Entretanto, sobressai a constatação de que o número médio destas para o leite "Especial" foi de 83000/mL, enquanto para o tipo "B" foi quase três vezes maior, de 244000/mL, fato esse difícil de ser explicado, a não ser pelas hipóteses de diferenças de manejo, a nível de produção e/ ou tecnológico.

O teste de redução do azul de metileno mostrou-se praticamente invariável para o leite pasteurizado em geral, promovendo a redução do indicador com tempo médio superior a 7 horas, oferecendo poucas informações.

CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente trabalho, aliada à nossa realidade nos setores de produção, industrialização e controle higiênico-sanitário do leite, possibilitou, pela avaliação do método de contagem microscópica, a obtenção das seguintes conclusões:

1.- O método de contagem microscópica correlacionou-se muito bem com a contagem padrão em placas ($r=0,89$) e com o teste de redução do azul de metileno ($r= -0,86$), quando aplicado a leite cru, independentemente do seu tipo;

2.- O método de contagem microscópica mostrou-se útil para a avaliação da qualidade microbiológica do leite cru, podendo, portanto, ser utilizado rotineiramente para esse tipo de controle, tanto isoladamente como em conjunto com outros métodos, aplicado a qualquer tipo de leite;

3.- A contagem microscópica revelou-se útil, também, no fornecimento de informações adicionais importantes, como por exemplo na detecção de leite mastítico;

4.- Aplicada a amostras de leite pasteurizado, a contagem microscópica, tal como foi realizada, promoveu uma indicação da qualidade microbiológica pregressa desse tipo de leite.

RECOMENDAÇÃO

Principalmente em função da atual realidade brasileira, e tendo em vista as qualidades do método de contagem microscópica, os resultados do presente trabalho permitem recomendar a sua adoção para um eficiente controle de qualidade, a nível de plataforma de recepção de leite nas indústrias, podendo-se utilizá-lo de modo preventivo, beneficiando, sobremaneira, a qualidade do produto comercializado nos aspectos tecnológico e de saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABELE, C.A. 1945. The Methylene Blue Reduction test as a means of estimating the bacterial content of milk, to determine its suitability for pasteurization or as a basis for grading. J. Milk Technol., 8: 67-79.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1948. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 9th. Edition. APHA e AOAC, New York e Washington, DC.
3. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1976. Compendium of Methods for the Microbiological Examination. Washington, DC.
4. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1978. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 14th Edition. Elmer H. Marth, PhD. Editor, NY.
5. ARANALDE, A.A. e cols. 1974. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase-positiva* no leite cru da bacia leiteira de Pelotas, RS. Rev. C. Ci. Rur. Sta Maria., 4 (2): 155-158.
6. BABEL, F. J. e cols. 1955. The Standard Plate Count of Milk as affected by the temperature of incubation. J. Dairy Science. 38: 499-503.
7. BARKWORTH, H. 1955. Relation between Methylene Blue and Plate Count and equivalent in keeping quality. Dairy Industries, February: 123-126.
8. BARKWORTH, H. 1959. Comparing two milk tests. Dairy Industries, May: 343-346.
9. BLACKBURN, P.S.; LAING, C.M. & MALCON, D.F. 1955. A comparison of the diagnostic value of the total and differential cell counts of bovine milk. J. Dairy Research, 22: 37-42.
10. BORTREE, A.L. & SPENCER, R.D. 1948. A combination of the resazurin and the microscopic count for the bacteriological examination of milk. J. Milk Food Technol., 11: 255-268.
11. BRASIL. 1962. RIISPOA. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal. DIPOA. M.A. (Aprovado pelo Decreto nº 30691 de 29/03/52 e alterado pelo Decreto nº 1255, de 25/06/62).

12. BRASIL. 1977. Normas para Produção de Leite tipo "B". DILEI - DIPOA. M.A. Publicada no D.O.U. de 02/02/77, fls. 1395 e 1399.
13. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, SNDA. 1979. Padronização de Técnicas de Análises Microbiológicas de Produtos de Origem Animal. Ante-projeto. Informativo LANARA.
14. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, SNDA. 1981. Métodos analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus ingredientes. I. Métodos Microbiológicos. Brasília, D.F.
15. BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Boletim Estatístico. 1981-1982. SERPA-SP. 1983. DFA-SP. Serviço de Inspeção de Produto Animal em São Paulo.
16. BREW, J.D. 1920. The comparative accuracy of the direct Microscopic and Agar Plate Count Methods in determining numbers of bacteria in milk. J. Dairy Science., 12: 304-319.
17. CASSEL, E.A. 1965. Rapid graphical method for estimating the Precision of Direct Microscopic Data. Applied Microbiology, 13 (3): 293-296.
18. CHARLETT, S.M. 1954. An improved staining method for the Direct Microscopical Counting of bacteria in milk. Dairy Industries. August: 652-653.
19. CHARLETT, S.M. 1955. The Methylene Blue Reduction Test. Dairy Industries. July: 576-579.
20. CLAIBORNE, F.B. & COX, K.E. 1951. The direct microscopic count on preserved milk samples: an effective measure for uniform State-Wide control. J. Milk Food Technol. 14: 105-108.
21. DABBAH, R. & MOATS, W.A. 1966. Correlation between Standard Plate Count and four Direct Microscopic Count procedures for milk. J. Milk Food Technol. 29: 366-371.
22. DABBAH, R.; TATINI, S.R. & OLSON JR., J.C. 1967. Comparison of methods for grading milk intended for manufacturing purposes. J. Milk Food Technol. 30: 71-76.
23. DABBAH, R.; MOATS, W.A. & OLSON JR., J.C. 1971. Evaluation of production conditions of manufacturing-grade raw milk by fieldmen ratings and by bacterial tests. J. Milk Food Technol. 34: 200-203.
24. DONNELLY, C.B.; HARRIS, E.K.; BLACK, L.A. & LEVIS, H.H. Statistical analysis of Standard Plate Counts of milk samples Split with State Laboratories. J. Milk Food Technol. 23: 315-319.
25. DYETT, E.J. 1976. Summary of dye reduction tests in the dairy industry. Dairy Industries. February: 49-51.
26. EGDELL, J.W. & BIRD, E.R. 1951. Bacteria in pasteurized milk. The effect of bacteria in pure culture on keeping quality and on reduction of Methylene blue dye. Dairy Industries. February: 143-156.

27. FERREIRO, L. 1978. Agentes etiológicos e terapêutica da mastite bovina no Brasil. Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 6: 77-88.
28. FERREIRO, L.; SANTOS, E.C. dos & SILVA, N. da. 1981. Ocorrência e Etiologia da Mastite Bovina na "Zona da Mata" do Estado de Minas. Arq. Esc. Vet. UFMG, Belo Horizonte, 33(1): 31-37.
29. FOSTER, E.M. e cols. 1965. Microbiologia de la Leche. México, Df, Ed. Herrero.
30. FRAZIER, W.C. 1972. Microbiologia de los Alimentos. Zaragoza. Editorial Acribia. (Espana).
31. FRUIN, J.T. & CLARK JR., W.S. 1977. Plate count accuracy: Analysts and Automatic Colony Counter versus a True Count. J. Food Protection. 40 (8): 552-554.
32. GEHRIGER, G. 1980. Multiplication of bacteria in milk during farm storage. In: Factors influencing the bacteriological quality of raw milk. IDF. Doc. n° 120. Chapter 5: 22-24.
33. HARRIS, E.K.; THOMAS, R.C. & BLACK, L.A. 1956. A statistical analysis of reduction times in relation to plate counts. J. Milk Food Technol. 19: 243-247.
34. HARROP, M.H.V.; PEREIRA, L.J.G.; BRITO, J.R.F. & MELLO, A. M. B. 1975. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da zona do agreste meridional de Pernambuco. Pesq. Agrop. Bras. Sér. Vet., 10: 65-67.
35. HARTLEY, J.C.; VEDAMUTHU, E.R. & REINBOLD, G.W. 1969. Bacteriological methods for evaluation of raw milk quality. A review. II. Bacterial tests used to measure milk quality. J. Milk Food Technol. 32: 4-15.
36. HEINEMANN, B. 1960. Factors affecting the Direct Microscopic Clump Count of Nonfat Dry Milk. J. Dairy Science. 43:317-328.
37. HÜHN, S. e cols. 1980. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha manual e mecânica e ao chegar à plataforma. Rev. do ILCT. Maio-Junho: 3-8.
38. HUHTANEN, C.N. e cols. 1972. A comparison of two and three days incubation for enumerating raw milk bacteria. J. Milk Food Technol. 35 (3): 136-140.
39. HUHTANEN, C.N. e cols. 1975. Temperature equilibration times of plate count agar and a comparison of 50 versus 45°C for recovery of raw milk bacteria. J. Milk Food Technol. 38(5): 319-322.
40. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (FIL-IDF). 1961. Annual Bulletin, Part III. IDF Seminar 1960. "Keeping quality of milk". Doc. n° 5.

41. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (FIL-IDF). 1964. Annual Report . (Annual Report). Bulk collection of milk (Report of a Semi nar held in Kiel).
42. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (FIL-IDF). 1964. Part. V. The cooling of milk on the farm (Doc. nº 20).
43. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (FIL-IDF). 1978. Somatic cells in milk. Their significance and recommended methods for counting. Doc. 114.
44. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. (FIL-IDF). 1981. Laboratory Methods for use in mastitis work. (Doc. nº 132).
45. JENSKINS, H. 1941. A comparison of Microscopic and 32º-T-G- M Agar Plate Counts on raw milk. J. Milk Technol. 4: 314-317.
46. JENNINSON, M.W. 1936. The relationship between the plate count and direct microscopic count of *E. coli* during logarithmic growth period at various temperatures. Thirty - seventh annual meeting. Dairy Science Abstr. G-14: 11-12.
47. JOERGENSEN, K. 1980. Bacteriological contamination from the surface of the teat & udder. In: Factors influencing the bacteriological quality of raw milk. IDF. Doc. nº 120. Chapter 3: 11-15.
48. JOHNS, C.K. 1945. Observations concerning the Methylene Blue Reduction Test. J. Milk Technol. 8: 80-82.
49. JOHNS, C.K. 1954. Relation between reduction times and plate counts of milk before and after pasteurization. J. Milk Food Technol. 17: 369-371.
50. JOHNS, C.K. 1959. Applications and limitations of quality tests for milk and milk products. A review. J. Dairy Science. 42 (10): 1625-1650.
51. JOHNS, C.K. 1971. Bacteriological testing of milk for regulatory purposes -Usefulness of current procedures and recommendations for change. II. Bacteriological testing of raw milk for regulatory purposes. J. Milk Food Technol. 34: 173-180.
52. LA GRANGE, W.S. & NELSON, F.E. 1961. Bacteriological evaluation of manufacturing-grade bulk tank milk. J. Dairy Science. 44: 1440-1445.
53. LA GRANGE, W.S. 1971. Manufacturing milk quality a re-evaluation. J. Milk Food Technol. 34: 249-255.
54. LANGENEGGER, J. e cols. 1970. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. Pesq. Agrop. Bras. 5: 437-440.
55. LECHE: PRODUCCION Y CONTROL. 1969. Wm. Clunie Harvey - Harry Hill. Editorial Academia. León. Españã.

56. LERCHE, M. Inspecion Veterinária de la leche. 1969. Editorial Acribia, Zaragoza. (Espana).
57. LEVINE, B.S. & BLACK, L.A. 1948. A comparative study of commonly used staining procedures for the Direct Microscopic Examination of milk. J. Milk Food Technol. 11: 139-148.
58. LEVINE, B.S. & BLACK, L.A. 1949. Direct microscopic clump counts of pasteurized milk by carbolated, Newman-Lampert nº 2, and the acid-and-water free methylene blue staining procedures. J. Milk Food Technol. 12: 69-75.
59. LEVINE, B.S. 1950. Improving staining procedures in the direct microscopic examination of milk. J. Milk Food Technol. 13: 321-329.
60. LEVOWITZ, D. & WEBER, M. 1956. An effective "Single solution" stain. J. Milk Food Technol. 19: 121-128.
61. LEVOWITZ, D. 1957. An inquiry into the usefulness of the Standard Methods Direct Microscopic Count. J. Milk Food Technol. 20: 288-293.
62. LOPES, C.F.; SILVA FILHO, F.S. & PORTO, E. 1964. Contribuição para o estudo da redutase do leite, pelo emprego da resazurina e do azul de metileno. I., II., III. Bol. Ind. Animal. 22: 145-170.
63. MACHADO, E.S.V. 1975. Flora dominante do leite cru e pasteurizado. Tese de Mestrado. FEAA - UNICAMP.
64. MALMANN, W.L.; BRYAN, C.S. & BATEN, W.D. 1944. A study of methods for the microscopic examination of raw milk with suggested improvements. J. Milk Food Technol. 7: 315-321.
65. MARTINS, A.F. 1942. Sobre o padrão bacteriológico do leite em São Paulo. Leite de granjas. Rev. do Inst. Adolpho Lutz. II (2): 369-389.
66. MAXCY, R.B. 1971. Bacteriological testing of milk for regulatory purposes-Usefulness of current procedures and recommendations for change. IV. Quality at the point of consumption. J. Milk Food Technol. 34: 264-267.
67. MCKENZIE, D.A. 1961. A review of cell count and solids-not-fat content of milk. Dairy Industries. March: 184-186.
68. MOATS, W.A. 1964. Staining bacteria in milk for direct microscopic examination- A review. J. Milk Food Technol. 27:308-310.
69. MOATS, W.A. 1972. A comparison of three staining methods for direct microscopic counting of bacteria in milk. J. Milk Food Technol. 35 (8): 496-498.
70. MORGAN, M.E.; MAC LEOD, P. & ANDERSON, E.O. 1952. An improved procedure for microscopic grading of milk intended for pasteurization. J. Milk Food Technol. 15: 3-7.

71. MORGAN, M.E. & MAC LEOD, P. 1953. A more critical sequential procedure for microscopic grading of raw milk. J. Milk Food Technol. 16: 228-231.
72. NADER FILHO, A. 1983. Prevalência da Mastite Bovina: Estudo comparativo de métodos para sua detecção e do comportamento de vários agentes etiológicos frente a prova de redução do azul de metileno. Tese de Doutorado. FSP-USP.
73. NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P. & ROSSI JR., O. D. 1983. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite tipo B. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot. 35 (5): 621-630.
74. NEWMAN, R.W. 1952. The Smith 0,01 ml syringe in the microscopic grading of milk. J. Milk Food Technol. 15: 101-103.
75. OLIVEIRA, J.S. 1976. Qualidade microbiológica do leite. Rev. do ILCT. julho-agosto: 15-20.
76. OLIVEIRA, J.S. & PARMELEE, C.E. 1976. Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. J. Milk Food Technol. 39 (4): 269-272.
77. OLIVEIRA, J.S. & BORGES, S.F. 1983. Qualidade do leite pasteurizado. Higiene Alimentar. 2 (3): Set. 113-116.
78. OLSON JR., J.C. & BLACK, L.A. 1951. A comparative study of stains proposed for the direct microscopic examination of milk. J. Milk Food Technol. 14: 49-64.
79. PALMER, J. 1980. Contamination of milk from the milking environment. International Dairy Federation. Chapter 4: 16-21.
80. PEARSON, J.K.L.; WRIGHT, C.L. & GREER, D.O. 1970. A study of methods for estimating the cell content of bulk milk. J. Dairy Research. 37: 467-480.
81. PEDRAJA, R.C.R.; MENGELIS, A. & SMALL, E. 1963. Joint collaborative study of Direct Microscopic Clump Count Method in Dry Milks and its statistical considerations. J. Dairy Science. 46: 810-818.
82. Qualidade higiênico-sanitária do leite: medidas para melhorá-la. 1982. Considerações da Comissão Técnica instituída pela Delegacia Federal de Agricultura-SP. 24/03/80. Higiene Alimentar. 1 (1): abril. 48-50.
83. READ JR., R.B. e cols. 1969. Effect of freezing raw milk on Standard Plate Count. J. Dairy Science. 52: 1720-1723.
84. READ JR., R.B. 1971. Bacteriological testing of milk for regulatory purposes-Usefulness of current procedures and recommendations for change. I. The problem. J. Milk Food Technol. 34: 172.
85. REINBOLD, G.W. 1971. Bacteriological testing of milk for regulatory purposes-Usefulness of current procedures and recommendations for change. III. Raw milk quality-Were do we go from here. J. Milk Food Technol. 34: 260-263.

86. Report of the Committee on Applied Laboratory Methods. 1955. 1956. Relative merits of various tests for determining bacteriological quality of milk for pasteurization. J. Milk Food Technol. 19: 7-12.
87. ROGICK, F.A. & LOPES, C.F. 1968. Padronização do leite de consumo. B. Parte bacteriológica. 1. Contagem microscópica de bactérias. 2. Contagem de bactérias em placas. Bol. Ind. Animal. 25: 267-277.
88. SCHÖNHERR, W. 1959. Manual pratico de análises de leche. Ed. Acribia. 1959. Zaragoza (Espana).
89. SILVA, T.M.P. 1946. Redutase e emprego de resazurin nos exames de leite. Rev. do Inst. Adolfo Lutz. II (2): 228-234.
90. STEPHAN, O. & LEME, T.A. 1936. Pela produção do bom leite. Rev. de Ind. Animal. 3 (2): 49-90.
91. SNEDECOR, G.W. 1966. Métodos estatísticos: aplicados a la in vestigacion agricola e biologica. Comp. Editorial Continen tal. Mexico. 2ª ed. 626 p.
92. STRYNADKA, N.J. & THORNTON, H.R. 1937. The accuracy of the Direct Microscopic (Breed) Count of bacteria and leucocytes in milk. J. Dairy Science. 20 (11): 685-692.
93. THOMAS, S.B. 1974. The microflora of bulk collected milk. Dairy Industries. Part. 1. July: 237-240, Part. 2. August: 279-282.
94. THOMAS, S.B. & THOMAS, B.F. 1974. The development of dye reduction tests for the bacteriological grading of raw milk. Dairy Industries. Jan-Feb.: 31-34. March: 59-62, April: 113-116.
95. THOMAS, S.B. & THOMAS, B.F. 1975. The bacteriological grading of bulk collected milk. Historical Introduction. Dairy Industries, March: 84-85.
96. THOMAS, S.B. & THOMAS, B.F. 1975. The bacteriological grading of bulk collected milk. The total colony count. Dairy Industries, May: 176-179.
97. THOMAS, S.B. & THOMAS, B.F. 1975. The bacteriological grading of bulk collected milk. The direct microscopic count. Dairy Industries, August: 292-294.
98. THORNER, R.M. & REMEIN, Q.R. 1961. Principles and Procedures in the evaluation of screening for disease. Public Health Monograph n° 67. (publication n° 846) US, Governmente Printing Office 10.
99. TOLLE, A. 1980. The microflora of the Udder. In: Internatio nal Dairy Federation. Doc. 120. Chapter 2: 4-10.

100. VILLAFANE, H.H.M. 1975. Aplicação de um método rápido para contagem de microrganismos psicrotóxicos no leite. (Tese de Mestrado). FEAA-UNICAMP.
101. WAITE, R. & BLACKBURN, P.S. 1957. The chemical composition and the cell count of milk. J. Dairy Research. 24: 328-339.
102. WILSON, G.S. 1935. The bacteriological grading of milk. Med. Research Council, London (Special rept. nº 206) HMSO.
103. WILSON, G.S. 1950. The bacteriological grading of milk. The plate count. Dairy Industries. July: 729-730, August: 829-835, Sept: 926-927.
104. WILSON, G.S. 1950. The bacteriological grading of milk. Methylene blue reduction test. Dairy Industries. October: 1043-1044, November: 1166-1167.

APÊNDICE
 RESULTADOS INDIVIDUAIS DAS ANÁLISES REALIZADAS

1. Leite Procedente do Estábulo Leiteiro da FCAVJ/UNESP. (Especial)

Nº	Log. Nº Mo./ml CPP*	Log. Nº Mo./ml CM*	Log. Nº Cél. Som./ml CMCS*	T. de Redução (min) TRAM*
1	5,77	6,13	5,56	240
2	5,21	5,55	5,74	330
3	4,89	5,74	5,58	360
4	5,36	5,72	5,69	330
5	5,24	5,83	5,65	330
6	7,26	6,71	6,18	90
7	5,19	5,43	5,50	450
8	5,76	5,77	5,74	270
9	7,12	7,01	5,58	60
10	5,98	5,88	5,79	330
11	6,93	6,25	5,78	150
12	7,09	6,71	5,64	90
13	5,42	5,49	5,60	360
14	6,98	6,60	6,02	90
15	7,06	7,18	6,02	30
16	5,29	5,61	5,38	330
17	5,68	5,66	5,49	330
18	6,07	5,77	5,51	300
19	6,87	6,44	5,92	120
20	6,39	6,06	5,76	150
21	5,95	5,57	5,55	300
22	6,64	6,30	5,79	120
23	6,76	6,35	5,86	90
24	5,98	5,78	5,74	270
25	5,83	5,96	5,57	300
26	6,35	6,10	5,65	210
27	6,46	6,11	5,59	210
28	6,05	5,96	5,57	270
29	6,26	6,07	5,69	270
30	6,83	6,59	5,82	60
31	6,92	6,74	5,77	60
32	5,94	5,99	5,69	270
33	5,75	5,92	5,54	270
34	6,39	6,18	5,75	150
35	6,19	6,09	5,71	180
36	6,24	6,05	5,79	240
37	6,16	6,01	5,76	240
38	5,19	5,61	5,78	330
39	5,16	5,48	5,74	330
40	5,35	5,76	5,73	330
41	5,46	5,83	5,73	330
42	5,65	5,79	5,67	270
43	6,06	6,03	5,71	210
44	4,50	5,49	5,50	360
45	6,52	6,32	5,51	60
46	5,69	5,90	5,57	300
47	5,05	5,68	5,75	360
48	5,67	6,03	5,79	240
49	5,99	6,09	5,64	180
50	6,61	6,43	5,70	60
51	5,99	5,62	5,25	300
52	6,05	5,80	5,36	300

Continua...

Continuação...

53	5,59	5,23	5,29	330
54	5,81	5,75	5,47	300
55	5,06	5,31	5,56	330
56	4,86	5,08	5,44	360
57	5,10	5,17	5,41	330
58	4,94	5,03	5,44	360
59	7,26	6,82	5,83	60
60	7,24	6,90	5,82	60
61	4,76	5,41	5,54	330
62	4,86	5,31	5,48	360
63	4,95	5,16	5,35	360
64	4,97	5,08	5,44	330
65	5,05	5,24	5,47	330
66	4,89	5,29	5,54	360
67	4,57	4,82	5,49	420
68	4,45	4,76	5,30	420
69	6,92	6,86	5,70	60
70	7,06	7,01	5,68	60
71	6,79	6,91	5,38	60
72	6,63	6,78	5,68	60
73	7,09	7,06	5,77	30
74	7,17	7,12	5,82	30
75	4,51	4,92	5,12	420
76	4,63	4,99	5,42	420
77	5,52	5,67	5,49	330
78	5,61	5,72	5,62	330
79	5,28	5,30	5,39	330
80	5,33	5,36	5,43	330
81	4,99	5,16	5,33	360
82	4,88	5,08	5,46	390
83	6,11	6,04	5,66	180
84	6,22	5,12	5,66	150
85	6,58	5,34	5,74	60
86	6,62	6,60	5,77	60
87	5,58	5,73	5,38	330
88	5,50	5,43	5,10	330
89	5,89	5,96	5,47	210
90	5,54	5,68	5,60	330
91	6,05	5,97	5,63	210
92	5,49	5,65	5,39	330
93	5,99	6,06	5,72	180
94	6,14	6,19	5,66	180
95	4,97	5,24	5,06	420
96	5,23	5,57	5,28	390
97	6,49	6,57	5,75	90
98	6,72	6,68	5,83	60
99	6,75	6,73	5,90	90
100	6,74	6,84	5,69	60

2. Leite Procedente de Plataforma de Recepção de Posto de Resfriamento

1	-	6,83	6,21	360
2	-	7,51	5,76	60
3	-	6,74	6,20	15
4	-	7,80	5,73	150
5	-	6,96	6,51	210
6	-	6,89	5,88	150

Continua...

Continuação...

7	-	6,56	6,36	210
8	-	6,40	5,46	210
9	-	6,47	5,40	150
10	-	6,74	5,96	90
11	-	6,24	5,92	240
12	-	6,18	5,58	180
13	-	6,67	5,76	180
14	-	6,34	5,80	240
15	-	6,36	5,82	360
16	-	6,28	5,86	390
17	-	5,93	5,50	330
18	-	6,13	5,68	420
19	-	6,16	6,43	240
20	-	6,57	7,07	150
21	-	6,06	5,88	270
22	-	7,81	6,01	15
23	-	6,74	5,93	120
24	-	7,01	5,86	60
25	-	6,92	5,73	120
26	-	7,09	5,76	120
27	-	5,80	5,65	240
28	-	6,09	5,46	330
29	-	6,59	5,88	90
30	-	6,42	5,40	150
31	-	6,27	5,58	270
32	-	6,61	5,73	240
33	-	6,70	5,88	240
34	-	6,63	5,92	330
35	-	6,18	5,62	330
36	-	6,10	5,71	330
37	-	5,50	5,54	390
38	-	6,26	5,54	120
39	-	6,08	6,15	390
40	-	6,38	5,10	120
41	-	6,09	6,53	330
42	-	6,43	5,95	120
43	-	6,44	5,76	180
44	-	6,47	6,03	240
45	-	6,24	5,86	300
46	-	6,78	5,82	120
47	-	7,22	5,80	30
48	-	6,82	5,58	90
49	-	6,72	5,86	150
50	-	6,28	5,62	150
51	-	5,98	5,40	180
52	-	6,38	5,50	360
53	-	6,30	5,58	360
54	-	6,75	5,10	90
55	-	7,22	6,07	90
56	-	7,27	5,73	60
57	-	7,17	5,58	60
58	-	5,96	5,73	240
59	-	6,72	5,95	210
60	-	6,55	5,71	210
61	-	6,28	6,10	300
62	-	7,81	5,88	15
63	-	7,45	6,01	30

Continua...

Continuação...

64	-	7,49	5,73	15
65	-	6,90	6,13	90
66	-	6,88	5,90	60
67	-	6,34	6,01	90
68	-	6,68	5,35	90
69	-	6,63	5,76	90
70	-	6,72	6,14	90
71	-	6,44	6,07	60
72	-	7,20	5,84	60
73	-	6,39	6,54	90
74	-	7,81	5,95	30
75	-	6,37	6,10	180
76	-	7,00	5,50	60
77	-	7,51	5,50	15
78	-	6,75	5,86	90
79	-	6,57	6,06	150
80	-	7,81	5,90	15
81	-	7,32	5,46	60
82	-	6,71	5,73	180
83	-	6,46	5,71	300
84	-	7,81	6,05	30
85	-	7,26	5,78	90
86	-	7,00	5,73	90
87	-	6,97	5,92	60
88	-	6,78	6,19	120
89	-	6,95	6,24	270
90	-	7,00	5,40	120
91	-	7,23	5,82	90
92	-	7,01	6,06	120
93	-	7,31	5,58	90
94	-	7,20	5,62	60
95	-	7,80	5,71	30
96	-	7,12	5,50	90
97	-	7,08	5,78	90
98	-	7,20	5,92	60
99	-	7,81	5,84	30
100	-	7,48	5,78	15
101	-	7,34	5,50	90
102	-	6,95	5,68	150
103	-	7,10	5,68	90
104	-	7,29	5,58	90

3. Leite Tipo "B" procedente de Plat.de Recep.de Ind.de Lacticínios

1	5,81	5,99	6,23	240
2	5,81	5,90	6,13	270
3	5,81	5,95	6,19	270
4	4,89	5,59	6,33	480
5	4,89	5,84	6,28	360
6	4,89	5,61	6,12	330
7	4,97	5,31	5,66	390
8	4,97	5,57	5,68	390
9	5,22	5,44	5,69	390
10	5,22	5,50	5,66	390
11	6,22	6,28	6,04	180
12	6,22	6,31	6,03	180

Continua...

Continuação...

13	5,44	5,59	5,98	330
14	5,44	5,61	5,89	330
15	5,56	5,66	6,15	450
16	5,56	5,69	6,18	450
17	5,58	5,60	5,68	330
18	5,58	5,54	5,70	330
19	6,08	5,96	5,79	210
20	6,27	5,97	5,64	180
21	5,54	5,66	5,62	300
22	5,54	5,72	5,74	300
23	6,25	6,10	6,36	300
24	6,20	6,03	6,31	300
25	5,72	5,82	5,90	360
26	5,72	5,79	5,72	360
27	5,47	5,61	6,20	330
28	5,47	5,60	6,03	330
29	5,68	5,67	5,97	330
30	5,68	5,59	5,91	330
31	5,24	5,44	5,65	390
32	5,24	5,36	5,57	390
33	5,28	5,27	5,97	390
34	5,28	5,53	5,94	390
35	5,66	5,65	6,00	330
36	5,66	5,66	5,87	330
37	6,48	6,43	5,90	240
38	5,50	5,61	6,31	300
39	5,51	5,62	6,30	300
40	5,81	5,78	5,93	360
41	5,76	5,74	5,87	360
42	5,68	5,38	5,53	450
43	5,62	5,31	5,44	450
44	5,18	5,59	5,82	330
45	5,37	5,64	5,78	330
46	6,48	6,57	6,08	30
47	6,48	6,59	6,13	30
48	5,92	5,82	5,86	210
49	5,91	5,85	5,83	210
50	5,92	5,81	5,95	210
51	5,90	5,89	5,92	210
52	5,64	5,77	5,53	240
53	5,72	5,79	5,61	240
54	5,58	5,70	6,09	390
55	5,53	5,62	5,95	390
56	5,81	5,72	5,87	300
57	5,86	5,74	5,81	300
58	5,56	5,69	5,93	330
59	5,58	5,64	5,84	330
60	5,41	5,55	6,12	420
61	5,28	5,48	6,06	420
62	5,29	5,47	5,93	420
63	5,21	5,42	5,86	420
64	5,61	5,51	5,66	480
65	5,52	5,44	5,53	480
66	5,37	5,36	5,74	390
67	5,30	5,31	5,64	390
68	6,48	6,67	6,11	90

Continua...

Continuação...

69	6,48	6,65	6,09	90
70	5,62	5,65	5,75	360
71	5,59	5,59	5,72	360
72	5,44	5,46	5,92	330
73	5,56	5,42	5,79	330
74	6,60	6,84	6,10	90
75	6,60	6,80	6,09	90
76	6,60	6,76	6,09	150
77	6,60	6,71	6,13	150
78	4,54	5,62	5,74	450
79	4,72	5,53	5,64	450
80	4,62	5,68	6,11	390
81	4,75	5,61	6,06	390
82	5,94	6,01	6,05	210
83	5,97	5,97	6,00	210
84	6,44	6,50	6,00	60
85	6,43	6,47	5,97	60
86	5,70	5,92	5,95	270
87	5,67	5,88	5,93	270
88	5,69	5,84	5,97	270
89	5,72	5,87	5,93	270
90	5,76	5,96	6,27	360
91	5,78	6,00	6,29	360
92	4,78	5,53	5,91	420
93	4,75	5,49	5,89	420
94	4,49	5,33	5,83	420
95	4,45	5,17	5,78	420
96	5,83	5,98	5,86	360
97	5,80	5,97	5,82	360
98	5,50	5,66	6,07	360
99	5,46	5,60	5,99	360
100	5,66	5,68	5,93	360
101	5,59	5,64	5,85	360
102	6,48	6,50	6,24	90
103	6,50	6,53	6,15	90
104	6,02	5,95	5,53	150
105	6,08	6,01	5,57	150
106	5,72	5,99	6,06	360
107	5,71	5,96	6,03	360
108	5,50	5,94	6,22	360
109	5,43	5,87	6,19	360
110	5,85	5,96	6,05	330
111	5,83	5,92	6,00	330
112	7,00	7,13	5,98	30
113	7,00	7,10	5,97	30
114	5,68	5,72	5,66	330
115	5,71	5,75	5,62	330

Mo. = Microrganismos. *CPP = Contagem Padrão em Placas. *CM = Contagem Microscópica de Microrganismos. *CMCS = Contagem Microscópica de Células Somáticas. *TRAM = Teste de Redução do Azul de Metileno.