



## **Relação entre contagens de células somáticas do tanque e parâmetros de qualidade do leite de cabra serrana**

Samora Machel Alberto Pinho

Dissertação apresentada a Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Agricultura Tropical

Orientado por:

Professor Doutor Hélder Miranda Pires Quintas

Bragança 2017



# **Relação entre contagens de células somáticas do tanque e parâmetros de qualidade do leite de cabra serrana**

Samora Machel Alberto Pinho

Dissertação apresentada a Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Agricultura Tropical

Orientado por

Professor Doutor Hélder Miranda Pires Quintas

Bragança 2017

## **Agradecimentos**

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando a crescer, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los. E quando damos conta, já é tarde demais para os agradecer.

Ao orientador Hélder Quintas, e ao professor Carlos Aguiar.

Aos professores Raimundo Maurício, Ramiro Valentim e a Ceu de Matos pela grande gentileza e prontidão com que sempre profissionalmente se dispuseram em todo momento, pela amizade, pela compreensão e competência, como no âmbito geral da vida.

À Leicras S.A. pelo fornecimento dos dados que possibilitaram a realização deste trabalho e ao Professor João Simões pelo apoio prestado.

Aos Professores Doutores Manuel Octávio Isaac Spínola e Albino Bento agradeço a sua disponibilidade e por terem feito de tudo para que mais um grau fosse alcançado.

Ao Instituto Superior Politécnico do Cuanza Sul e ao Instituto Politécnico de Bragança, Governo Angolano por conceder e financiar a formação.

À minha família em geral, que sempre me apoiou em especial Ricardo Pinho e Esperança Alberto Pinho pela educação.

Finalmente aos familiares, amigos, colegas e a todos aqueles que, embora não tenham sido aqui citados e acompanharam direta ou indiretamente o meu percurso ao longo da formação com companheirismo, motivação, irmandade e compreensão.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.” Cora Coralina

## Dedico

Aos meus pais Ricardo Pinho e Esperança Alberto Pinho, irmãos e irmãs.

Aos meus filhos (Ernesto, Florinda e Adjainara).

Finalmente a Laurinda Frangueira Manuel.

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre as contagens de células somáticas no leite do tanque em efetivos de cabras de raça Serrana com os parâmetros gordura, proteína, lactose e contagens bacterianas totais. Entre Outubro de 2014 e Setembro de 2015, foram colhidas pela Leicras S.A. (Mirandela-Portugal) 1.294 amostras de leite do tanque de 46 explorações no âmbito da realização dos contrastes leiteiros. Posteriormente no laboratório da Associação Interprofissional do Leite e Lactínios foram feitas as Contagens de Células Somáticas (FC Fossomatic™, Foss Instruments, Hillerød, Dinamarca) e a análise do teor de gordura (%), proteína total (%), lactose (%) e contagens bacterianas totais (MilkoScan 6000; Foss Instruments, Hillerød, Dinamarca). Na análise descritiva foi utilizada a distribuição de CCS e contagens bacterianas totais e uma correlação múltipla entre log (CCS) e os restantes parâmetros. Para demonstrar associações entre os parâmetros das amostras utilizou-se a prova do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e, para analisar diferenças entre variáveis contínuas, recorreu-se à análise de variância. A média geométrica de CCS foi de  $2.495 \times 10^3$  células por ml. Os percentis 10%, 25%, 50%, 75% de CCS foram, respetivamente, 1.191, 1.770, 2611 e  $3.560 \times 10^3$  células por ml. Por sua vez, a média geométrica das contagens bacterianas totais foi de  $281 \times 10^3$  células por ml e os percentis 10%, 25%, 50%, 75% foram 43, 92, 246 e  $824 \times 10^3$  células por ml. A equação de regressão múltipla ( $r = 0,47$ ;  $R^2 = 0,22$ ;  $P < 0,001$ ) encontrada foi  $\log(\text{CCS}) = 10,23 - (0,15 \times \text{"teor de gordura"}) + (0,83 \times \text{"proteína total"}) + (0,96 \times \text{lactose}) + 0,27 \times \text{contagens bacterianas totais}$ . O teor de gordura ( $R^2 = 0,012$ ;  $r = 0,11$ ;  $p < 0,001$ ) e a lactose ( $R^2 = 0,094$ ;  $r = 0,31$ ;  $p < 0,001$ ) estão correlacionadas negativamente com o log (CCS) e foi observada uma correlação positiva entre log (CCS) e a proteína total ( $R^2 = 0,03$ ;  $r = 0,17$ ;  $p < 0,001$ ). Não foi encontrada correlação entre log (CCS) e as contagens bacterianas totais ( $p > 0,05$ ). O "fator exploração" explicou 28,9% da variância das contagens bacterianas totais e 38,6% da variância das CCS. Estes dados salientam a importância de se compreender a dinâmica das CCS no leite de tanque nas cabras de raça Serrana. É por isso necessário em trabalhos futuros investigar os factores infecciosos e não infecciosos responsáveis pela variação das contagens nesta raça com a finalidade de melhorar os programas de boas práticas de ordenha e de controlo das mastites, e, conseqüentemente, a qualidade do leite e do queijo, bem como o rendimento dos produtores.

**Palavras-chave:** contagem de células somáticas; teor de gordura; proteína total; lactose; contagens bacterianas totais; qualidade do Leite.

## Abstract

This study aimed to evaluate the relationship between milk somatic cells count (MSCC) from bulk tank of Serrana goat flocks and other traits as fat (%), protein (%) and lactose (%) contents, and total bacterial counts. Between October 2014 and September 2015, 1,294 milk samples from bulk tank were weekly collected in 46 herds by Leicras S.A. (Mirandela-Portugal) during period official controls. MSCC (FC Fossomatic™; Foss Instruments, Hillerød, Denmark) and fat (%), protein (%) and lactose (%) contents, and total bacterial counts (MilkoScan 6000; Foss Instruments, Hillerød, Denmark) of milk were analysed in Inter-professional Association of Milk and Milk laboratory. Descriptive analyse was used for MSCC distribution and a multiple correlation between log (MSCC) and remaining parameters was made. Previously Pearson correlation between MSCC and each parameter were tested. The geometric mean of MSCC was  $2,495 \times 10^3$  cells per ml. The percentiles 10%, 25%, 50%, 75% of MSCC were 1,191, 1,770, 2,611 and  $3,560 \times 10^3$  cells per ml. The average of total bacterial counts was  $281 \times 10^3$  cells per ml and the percentiles 10%, 25%, 50%, 75% were 43, 92, 246 and  $824 \times 10^3$  cells per ml. The multiple regression equation ( $r = 0.47$ ;  $R^2 = 0.22$ ;  $P < 0.001$ ) was  $\log(\text{MSCC}) = 10,23 - (0.15 \times \text{“fat”}) + (0.83 \times \text{“protein”}) - (0.96 \times \text{lactose}) - (0,27 \times \text{total bacterial counts})$ . The percentage of fat content ( $R^2=0,012$ ;  $r=0,11$ ;  $p<0,001$ ) and lactose ( $R^2=0,094$ ;  $r=0,31$ ;  $p<0,001$ ) are negatively correlated with log (MSCC) and it was observed a positive correlation between log (MSCC) and the protein content ( $R^2=0,03$ ;  $r=0,17$ ;  $p<0,001$ ). No correlation was found between log (MSCC) and total bacterial counts. The “farm” factor explained 28.9% of the variation of the total bacterial counts and 38.6% of the variation of the log (MSCC). These data highlight the importance of understanding the dynamics of SCC in bulk tank in Serrana goats. It is therefore necessary in future works to investigate the infectious and non-infectious factors responsible for the variation of the counts in this breed in order to improve the milking practices and mastitis control programs, and consequently the milk/cheese quality and best incomes to the farmers.

**Keywords:** Somatic Cell Count; fat; protein; lactose; total bacterial counts; Quality of Milk.

## Índice Geral

Agradecimentos .....	i
Dedico .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract .....	v
Índice Geral .....	ivi
Índice de Figuras .....	viii
Índice de Quadros.....	ix
Índice de Tabelas .....	x
Lista de abreviaturas, siglas, símbolos ou acrónimos.....	xi

### Parte I

#### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Os Caprinos da Raça Serrana .....	1
1.1. Características da produção de leite.....	2
2. O leite de Cabra.....	2
2.1. Anatomia e fisiologia da glândula mamária.....	3
2.2. Particularidades da secreção do leite .....	5
2.3. Composição do leite de cabra .....	6
3. Mastites em caprinos .....	8
3.1. Etiologia das mastites caprinas .....	9
3.2. Importância das mastites caprinas.....	12
3.2.1. Produção de leite.....	12
3.2.2. Alterações qualitativas.....	14
3.2.3. Produção animal.....	15
3.2.4. Saúde pública.....	15
3.2.5. Requisitos legais .....	16
3.2.6. Perdas económicas .....	17
3.3. Diagnóstico das mastites.....	18
3.3.1. Sinais clínicos.....	18
3.3.2. Diagnóstico microbiológico .....	19
3.3.3. Contagem automática.....	19
3.3.4. Contagem de células somáticas (CCS) .....	20
3.3.4.1. Métodos de medição das CCS .....	21
3.3.4.2. Factores de variação das contagens de células somáticas.....	22
3.3.4.3. CCS no leite de tanque.....	24
<b>Parte II.....</b>	<b>26</b>
<b>TRABALHO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>26</b>
4. Objetivos.....	27

5. Matérias e Métodos .....	27
5.1. Análise estatística.....	27
<b>6. Resultado e Discussão .....</b>	<b>29</b>
6.1. Distribuição da CCS do leite de tanque .....	29
6.2. Relação linear entre Proteínas Totais (TP) (%) e CCS .....	32
6.3. Relação entre percentagem do Teor de gordura (TG) e CCS.....	33
6.4. Relação entre Lactose (%) e CCS .....	34
6.5. Relação entre contagens bacterianas totais (CBT) e CCS .....	35
6.6. Equação de regressão linear múltipla.....	38
<b>7. Conclusões .....</b>	<b>39</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>40</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Efetivo de raça Serrana da ESA – IPB .....	1
<b>Figura 2</b> – Secção medial da glândula mamária da cabra. ....	3
<b>Figura 3</b> – Organização anatómica da glândula mamária da caprina. ....	4
<b>Figura 4</b> – Distribuição das contagens de células somáticas.....	29
<b>Figura 5</b> – Contagens de células somáticas por exploração.....	31
<b>Figura 6</b> – Relação entre Proteína Total (%) e CCS.....	32
<b>Figura 7</b> – Relação entre Teor de Gordura (%) e CCS.....	33
<b>Figura 8</b> – Relação entre Lactose (%) e CCS.....	34
<b>Figura 9</b> – Relação entre contagens bacterianas totais e CCS .....	35
<b>Figura 10</b> – Distribuição contagens bacterianas totais .....	37
<b>Figura 11</b> – Contagens bacterianas totais por exploração.....	37

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1</b> - Parâmetros produtivos da raça caprina Serrana .....	1
<b>Quadro 2</b> - Concentrações médias dos nutrientes básicos, minerais e vitaminas no leite de cabra (100g) comparado com o leite de vaca e o humano. ....	7
<b>Quadro 3</b> - Tipos de mastite em caprinos.....	9
<b>Quadro 4</b> - Complexo etiológico das mastites caprina.....	10
<b>Quadro 5</b> - Fontes de infecção e tipos de transmissão em mastites caprinas segundo o agente patogénico. ....	11
<b>Quadro 6</b> - Impacto das mastites subclínicas por SCN na produção e qualidade do leite em caprinos.....	13
<b>Quadro 7</b> - Modificações físico-químicas do leite causadas por mastites .....	14
<b>Quadro 8</b> - Perdas diretas associadas às mastites caprinas .....	17
<b>Quadro 9</b> - Perdas indiretas associadas às mastites caprinas.....	18
<b>Quadro 10</b> - Pontuação do TCM correspondente à reação visível .....	21
<b>Quadro 11</b> - Factores que influenciam as contagens de células somáticas no leite de cabra .....	23

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Distribuição das contagens de células somáticas .....	29
<b>Tabela 2</b> - Distribuição das contagens de células somáticas .....	30
<b>Tabela 3</b> - Distribuição das contagens bacterianas totais .....	37
<b>Tabela 4</b> - Distribuição das contagens de células somáticas .....	37

## Lista de abreviaturas, siglas, símbolos ou acrónicos

® - Marca registada.

°C - Graus Celsius.

% – Percentagem.

β - Beta.

μg - Microgramas.

α - Alpha

β - Beta.

μg - Microgramas.

ADN - Ácido desoxirribonucleico.

ALIP - Associação Interprofissional do Leite e Lactínios.

CAEV - Vírus da artrite-encefalite caprina.

CBT - Contagem bacterianas totais.

CCS - Contagem de células somáticas.

CCSi - Contagem de células somáticas individual.

CCSt - Contagem de células somáticas totais.

CE - Condutividade eléctrica.

*et al.* - *et alii* (e outros), *et aliae* (e outras) e *et alia* (e outros, neutro plural).

EUA - Estados Unidos da América.

ex. - Exemplo.

FDA - Food Agriculture Organization.

i.e - *id est*, “isto é”, “ou seja”.

ICAR - (International Committee for Animal Recording)

IIM - Infecção intramamária.

ISO - International Organization for

Kg - Kilogramas.

Log<sub>10</sub> - Logaritmo de base 10.

mg - Miligrama.

MG - Quantidade de gordura no leite.

ml - Mililitro.

MP - Material Proteico.

n - tamanho da amostra.

PCA - *Plate Count Agar*.

PCR - *polymerase chain reaction*”

pH - Potencial de Hidrogénio.

PT - Proteína Total

S - *Staphylococcus*.

SCN - *Staphylococcus* coagulase negatives.

SPCt - Standard Plate Count no leite do tanque.

*spp* - Espécies

t - Valor do teste t de Student.

TB - Teor butiroso.

TBCt - Contagens bacterianas totais no leite do Tanque.

TCM - Teste Californiano de Mastites.

TG - Teor de Gordura.

TP - Teor de proteína.

U.I. - Unidades Internacionais.

UE - União Europeia.

UFC - Unidades formadoras de colónias.

$\chi^2$  - Valor do teste qui quadrado.

**Parte I**

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. Os Caprinos da Raça Serrana

A cabra Serrana (Figura 1) é ascendente a *Capra pyrenaica* antecessora das raças caprinas da península ibérica e actualmente é aceite que a sua origem tenha sido na Serra da Estrela (Fonseca, 1988). Em Portugal é considerada como a mais representativa nas raças caprinas (DGP, 1987; Pereira, 2012).



**Figura 1-** Efetivo de raça Serrana da ESA – IPB (Foto: Hélder Quintas).

A caracterização genética, morfológica e produtiva tem como base ou padrão descrito no Regulamento do Registo Zootécnico Português da raça caprina Serrana (artigo 6º).

As suas capacidades produtivas são dependentes de vários factores genéticos e não genéticos ou ambientais (alimentação, instalações, estação do ano entre outros), tipo de exploração da aptidão leite ou leite/carne variando de acordo com as necessidades do mercado nacional.

Relativamente à produção de leite, a variação é enorme que reflete por um lado, a variabilidade genética da raça (Quadro 1) e por outro, o sistema de produção tradicional, dependente obviamente da região da exploração (Almendra, 1990).

**Quadro 1 -** Parâmetros produtivos da raça caprina Serrana.

	Raça serrana – Ecótipo:		
	Transmontano	Ribatejano	Jarmelista
Produção média de leite aos 150 dias de lactação	103,1 l	223,1 l	87,7 l
Produção média total de leite	123 l	250,8 l	96,9 l
Produção média diária de leite	0,68 l	1,41 l	0,58 l
Duração média da lactação	181 dias	178 dias	167 dias
Teor em gordura	3,5 %	4,1 %	----
Teor em proteína	3,3 %	3,4 %	----

Fonte: SPOC (acedido a 15 de Janeiro de 2017).

### **1.1. Características da produção de leite**

Os caprinos de raça Serrana são animais rústicos adaptados completamente ao meio, com uma produção de leite bastante variável em dependência do sistema de produção, manejo dos produtores e das condições climáticas em que são exploradas. Existem registos de cabras que produzem cerca de 600 litros de leite, em alguns casos mais, em 210 dias de lactação.

Na região de Trás-os-Montes, a ordenha é feita manualmente maioritariamente, diferente da região sul onde já se observa a utilização da ordenha mecanizada (Almendra, 1990).

Em Trás-os-Montes os rebanhos são explorados principalmente em regime extensivo, num sistema de pastoreio de percurso, os efetivos de pequena dimensão com um predomínio de cabradas de 70 a 80 cabeças. A maioria das explorações não efetuam qualquer suplementação ou complemento ao pastoreio, pelo que em épocas de reduzida disponibilidade alimentar há uma acentuada redução da produção de leite.

As explorações de maior dimensão estão localizadas na região Centro, Ribatejo e Oeste onde a produção de leite em regime de produção semi-intensivo é mais frequente (Pereira, 2012).

O manejo tradicional, sem controlo reprodutivo, e a ausência de sazonalidade reprodutiva conduz à produção de cabritos ao longo do ano. Apesar disso ocorre uma maior incidência dos partos nos meses de Outubro a Abril, o que conduz a épocas de venda com preços mais elevados (i.e. Natal e Páscoa).

A taxa de fertilidade da raça varia entre os 90 a 95% e a taxa de fecundidade de 150 a 160%. O índice de prolificidade é de cerca de 170 a 180%. O cabrito, regra geral, é vendido aos 30-40 dias de idade, com o peso vivo de 6 a 8 kg (SPOC online, acedido a 15 de Janeiro de 2017).

## **2. O leite de Cabra**

Desde os tempos da domesticação, há 8000-11000 anos, até aos dias de hoje que o leite de cabra é consumido devido à sua fácil disponibilidade e valor nutritivo. Representa um papel importante e bastante significativo em todos os países do mundo, sendo nas regiões mais pobres umas das principais fontes de subsistência garantindo a nutrição básica como fonte de alimentação diária (Park e Haenlein, 2007).

O leite de cabra tem um papel essencial como: (a) fonte de proteína de alta qualidade e cálcio, especialmente importante para pessoas de baixa rendimento ou mal nutridas nas regiões áridas sem acesso a outras fontes baratas de proteína

(Haenlein, 2004); (b) interesse no mercado transformador, constituindo um valor acrescentado, com vários produtos derivados como queijos, iogurte, manteiga, quefir, doces, produtos em pó e condensados e inclusivamente, cosméticos; (c) apresenta uma boa digestibilidade, o que faz que o leite de cabra seja recomendado para o consumo humano e indicado como um substituto ideal para pacientes que sofrem de alergias ao leite de vaca (Haenlein, 2004; Macedo *et. al.*, 2003).

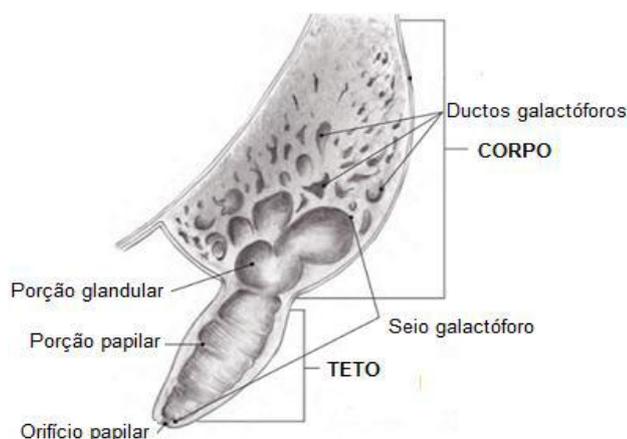
Além do mais, a produção de leite em cabras em regiões com boas condições climáticas e de manejo adequado tem grande eficiência produtiva comparando com qualquer outro ruminante domesticado (Gonzalo, 2014).

Neste contexto, nos países onde o mercado do leite de cabra tem grande importância económica, o controlo da qualidade do leite é fundamental, quer para a indústria dos lacticínios e seus derivados, quer para o consumidor (Park e Haenlein de 2007).

## 2.1. Anatomia e fisiologia da glândula mamária

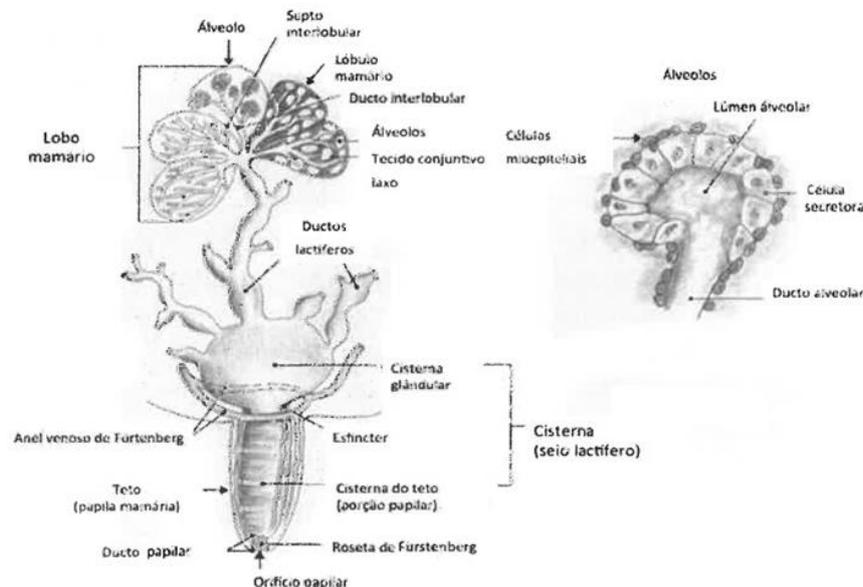
Nos caprinos o úbere (Figura 2) é constituído por duas glândulas independentes, situadas na região inguinal e suportadas por um ligamento suspensor medial comum e cada uma por um ligamento suspensor lateral (Plummer e Plummer. 2012).

São anatomicamente classificadas como glândulas sudoríparas, modificadas e histologicamente como túbulo-alveolar compostas (Sisson & Grossman, 1986). Em cada glândula o leite produzido é drenado para o teto respetivo (Constantinescu, 2010). O úbere caprino possui um formato globular, achatado do lado septal, por sua vez os tetos têm formato variável, podendo ser pequenos e curtos ou grandes e afunilados (Sisson & Grossman, 1986; Constantinescu, 2010).



**Figura 2** – Secção medial da glândula mamária da cabra (Constantinescu, 2010).

O úbere é formado por parênquima glandular (Figura 3) subdividido em lobos, e estes por sua vez constituídos por lóbulos (Bragulha *et al.*, 2012). Os lóbulos são formados por diversas estruturas côncavas, os alvéolos, rodeadas por células mioepiteliais (Cunningham e Klein, 2008 Constantinescu, 2010). A unidade funcional básica dos alvéolos são as células secretoras, responsáveis pela síntese do leite (Constantinescu, 2010). Por acção da oxitocina ocorre a contracção das células mioepiteliais e consequente descida do leite que se encontra armazenado nos alvéolos para os ductos alveolares (Cunningham e Klein, 2008; Blowey, 1999; Constantinescu, 2010; Park and Haenlein, 2010). A partir destes, o leite é drenado por um sistema de ductos convergentes progressivamente de maior calibre: ductos intralobulares, interlobulares e lactíferos que convergem formando o seio lactífero, também designado por cisterna (Cunningham e Klein, 2008; Constantinescu, 2010).



**Figura 3** – Organização anatómica da glândula mamária da caprina (Constantinescu, 2010).

O seio lactífero divide-se em cisterna glandular e em cisterna do teto (Constantinescu, 2010). Na separação entre as duas cisternas encontra-se o anel venoso de Fürtenberg (Bragulla *et al.*, 2012). O teto é constituído por um canal que termina no orifício papilar que possui um esfíncter. (Haenlein, 1992; Constantinescu, 2010). A parte distal do teto tem o nome de ducto papilar ou canal do teto. Na união entre a cisterna papilar e o ducto papilar encontra-se a roseta de Fürtenberg (Constantinescu, 2010).

## 2.2. Particularidades da secreção do leite

Desde o ponto de vista biológico os caprinos apresentam a particularidade de que a secreção de leite ser apócrina. Partículas citoplasmáticas são excretadas fisiologicamente para o leite desde a porção apical das células secretoras (Wooding *et al.*, 1970; Wooding *et al.*, 1977). As partículas citoplasmáticas são semelhantes em tamanho às células somáticas do leite. A concentração média é de  $150 \times 10^3$  células/ml, em comparação com as de ovelhas onde a média é de  $15 \times 10^3$  células/ml (Paape *et al.*, 2001). As baixas concentrações no leite de ovelha e a quase ausência delas no leite de vaca estão relacionadas a secreção merócrina que ocorre nestas espécies (Dulin *et al.*, 1983).

Esta particularidade é importante no diagnóstico das mastites porque a presença destas partículas citoplasmáticas desprovidas de ADN (e de outras resultantes da involução espontânea do parênquima) no leite de cabra não tem nenhum significado patológico, mas contribui para um aumento aparente das contagens celulares (Foschino *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 1995; Zeng e Escobar, 1996). Isto é especialmente quando se utilizam métodos não específicos de ADN como é o caso dos contadores automáticos (Marnet 1998). Apesar de muitas dessas partículas serem anucleadas, algumas possuem fragmentos nucleares e podem contribuir para um ligeiro aumento das contagens celulares totais mesmo com a utilização de métodos específicos de ADN (Paape *et al.*, 1997).

Inclusivamente, o método de microscopia de referência, que é baseado em procedimentos de coloração, não dá resultados satisfatórios na maioria dos laboratórios, quando usado em leite de cabra (EFSA, 2005)

Após a secreção do leite ele fica armazenado na cisterna do teto que tem grande capacidade de armazenamento nos caprinos: no início da ordenha 70% do leite é cisternal e 20% é alveolar. Nos bovinos, por exemplo, esta última fração representa 85%, e assim a própria preparação do úbere para a ordenha promove a descarga de oxitocina, que aumenta o fluxo de leite e leva a uma redução do tempo de ordenha. Este fenómeno não se observa nos caprinos (Salama, 2005).

O leite de cabra pode ser obtido em várias fracções durante a ordenha. A primeira fracção é obtida com a máquina de ordenha e corresponde ao leite da cisterna e dos alvéolos. A segunda fracção obtém-se se antes da remoção das tetinas se fizer uma vigorosa massagem do úbere. A terceira fracção pode ser extraída manualmente porque após a remoção das tetinas ainda permanece algum leite no úbere; e o restante corresponde ao leite residual, o qual só pode ser removido com a administração de oxitocina (Jiménez-Granado *et al.*, 2014).

### 2.3. Composição do leite de cabra

O leite de cabra é um líquido branco-mate, limpo, sem grumos, de odor bastante neutro e sabor adocicado a ligeiramente salgado, agradável e característico. A cor um tanto mais branca deve-se à presença de pró-vitamina A e ausência de  $\beta$ -carotenos responsáveis pela tonalidade amarelada da gordura do leite de vaca (Belanger, 1990).

O leite de cabra tem 83 a 86% de conteúdo em água e um extrato seco de 14 a 17% (Guéguen, 1997). As proporções de cada uma dessas substâncias no leite de cabra são variáveis e dependem da influência complexa do polimorfismo genético e de alguns outros factores, tais como raça, estado nutritivo, fisiológico, sanitário e ambiental (Moioli *et al.*, 1998).

O leite é uma mistura homogênea de grande número de substâncias: hidratos de carbono (por exemplo, a lactose), glicérides, proteínas (caseína e outras), sais minerais, vitaminas e enzimas. Algumas dessas partículas estão em emulsão (a gordura e as substâncias associadas), outras em suspensão (as caseínas ligadas a sais minerais) e outras em solução (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, sais) (Ordóñez, 2005).

É um produto altamente delicado e perecível, possuindo características físicas, químicas e biológicas facilmente alteradas pela acção de microrganismos e pela manipulação a que é submetido (Dürr, 2004).

O leite de cabra tem uma composição diferente do leite de vaca, como um menor tamanho dos glóbulos de gordura, um menor conteúdo em lactose (Garcés *et al.*, 2004) e maior teor de Ca, P, K, Mg, Cl e Mn (Guéguen, 1997).

Contém, em média, cerca de 3,8% de gordura, 3,5% de proteína, 4,1% de lactose e 0,8% de minerais (Quadro 2). O tamanho dos glóbulos de gordura no leite de caprino é em média mais pequenos que os de leite de vaca. Esta característica tem uma grande importância nutricional, uma vez que glóbulos menores são mais facilmente absorvidos pela mucosa intestinal, o que faz com que seja recomendado a crianças e pessoas idosas (Garcés *et al.*, 2004).

O leite de cabra possui um conteúdo de lactose de cerca de 0,2 a 0,5% menor do que no leite de vaca (Chandan *et al.*, 1992). A lactose é considerada como o componente mais lábil perante da acção microbiana ao constituir um bom substrato para as bactérias, que a transformam em ácido láctico (Ordóñez, 2005).

A densidade e o peso específico do leite dependem da concentração de elementos em solução e da percentagem de gordura. O teste da densidade pode ser útil na deteção de adulteração do leite, uma vez que a adição de água causa diminuição da densidade, enquanto se a gordura for retirada a densidade aumenta

(Fonseca & Santos, 2007). A gordura é o constituinte que mais sofre variações em função de alimentação, raça, estação do ano e período de lactação, entre outros (Silva, 1997).

**Quadro 2** - Concentrações médias dos nutrientes básicos, minerais e vitaminas em 100g no leite de cabra comparado com o leite de vaca e o humano (Adaptado de Park e Haenlein, 2010).

<b>Constituintes</b>	<b>Cabra</b>	<b>Vaca</b>	<b>Mulher</b>
Gordura (g)	3,8	3,6	4,0
Proteína (g)	3,5	3,3	1,2
Lactose (g)	4,1	4,6	6,9
Minerais (Cinzas) (g)	0,8	0,7	0,2
Sólidos totais (g)	12,2	12,3	12,3
Calorias (cal)	70	69	68
<b>Minerais</b>			
Ca (mg)	134	122	33
P (mg)	141	119	43
Mg (mg)	16	12	4
K (mg)	181	152	55
Na (mg)	41	58	15
Cl (mg)	150	100	60
S (mg)	2,89		
Fe (mg)	0,07	0,08	0,2
Cu (mg)	0,05	0,06	0,06
Mn (mg)	0,032	0,02	0,07
Zn (mg)	0,56	0,53	0,38
I (mg)	0,022	0,021	0,007
Se (µg)	1,33	0,96	1,52
<b>Vitaminas</b>			
Vitamina A (U.I)	185	126	190
Vitamina D (U.I)	2,3	2	1,4
Tiamina (mg)	0,068	0,045	0,017
Riboflavina (mg)	0,21	0,16	0,02
Niacina (mg)	0,27	0,08	0,17
Ácido Pantoténico (mg)	0,31	0,32	0,20
<b>Vitamina B<sub>6</sub> (mg)</b>	0,046	0,042	0,011
Ácido Fólico (µg)	1	5	5,5
Biotina (µg)	1,5	2	0,4
<b>Vitamina B<sub>12</sub> (µg)</b>	0,065	0,357	0,03
Vitamina C (mg)	1,29	0,94	5

Segundo Haenlein (1992), a caseína do leite de cabra apresenta diferenças na composição de aminoácidos e é mais digestível que a caseína do leite de vaca.

Remeuf e Lenoir (1986) relataram que a proporção de relativa de aminoácidos na caseína do leite de cabra é significativamente diferente da do leite de vaca.

O leite caprino apresenta, ainda, maiores quantidades de ácidos gordos de cadeia curta cápricos (10,0%), caprílico (2,7%), caproico (2,4%) e láurico (5,0 %) em relação ao leite de vaca (Alonso *et al.*, 1999; Goudjil *et al.*, 2004). Estes ácidos gordos são responsáveis pelo sabor e flavor do queijo de cabra. A quantificação destes ácidos gordos de cadeia curta são frequentemente usados para detectar misturas de leite de diferentes espécies (Park *et al.*, 2007).

Alguns autores demonstraram que a composição do leite de cabra varia ao longo lactação. Na parte final da lactação a gordura, proteína, sólidos e minerais tendem a aumentar e lactose a diminuir (Gou *et al.* 2001; Brozos, 1998; Haenlein, 2001 e 2004).

Por sua vez, Gomes *et al.* (2004) afirmam que os teores de sólidos totais, gordura, lactose diminuem ao longo da lactação, os teores de proteína permanecem semelhantes resultando de factores fisiológicos, a saúde da glândula mamária e qualidade do leite.

Em suma, comparado a vaca ou leite humano, o leite de cabra possui características únicas, como alta digestibilidade, alcalinidade diferente, alta capacidade de tamponamento, o que permite várias aplicações terapêuticas e na nutrição humana (Walker, 1965; Park, 1994).

### **3. Mastites em caprinos**

A mastite, ou mamite, é a inflamação da glândula mamária, de causa multifactorial, caracterizada por alterações fisiológicas, químicas e normalmente bacteriológicas no leite, acompanhadas de modificações patológicas no tecido glandular (Contreras *et al.*, 1997a; Matthews, 2009).

Com a presença de um agente patogénico na glândula mamária produz-se uma infecção com fenómenos inflamatórios associados. Segundo a sua severidade podem ocorrer mastites subclínicas ou clínicas (Quadro 3).

**Quadro 3 –** Tipos de mastite em caprinos (Contreras *et al.*, 1997b).

	Glândula Mamária saudável	Subclínica	Clínica			
			Subaguda	Aguda	Hiperaguda	Crónica
Microrganismos	-	+	+	+	+	+
Contagem células somáticas	-	+	+	+	+	+
Alterações bioquímicas do leite	-	+	+	+	+	+/-
Alteração macroscópica do leite	-	-	+	+	+	+/-
Alteração da glândula mamária	-	-	+/-	+	+	+
Alteração do estado geral	-	-	-	+/-	+	-

Num contexto sanitário adequado, a prevalência numa exploração de animais com mastite clínica não deve ser superior a 5% (Bergonier *et al.*, 1997; Contreras *et al.*, 2007).

A prevalência de animais com mastite subclínica varia em média entre 5 a 30% (Contreras *et al.*, 2007) embora alguns rebanhos apresentem valores mais elevados (Contreras *et al.*, 1999; Rovai *et al.*, 2014).

### 3.1. Etiologia das mastites caprinas

As mastites caprinas poderem ter origem mecânica, traumática (ex. feridas, golpes) ou serem causadas por toxinas bacterianas (Stheling *et al.*, 1986), mas na esmagadora maioria dos casos são provocadas por infecções de origem bacteriana, sem excluir, no entanto, os micoplasmas, os lentivírus e os fungos (Bergonier *et al.*, 1997, 2003).

Classicamente os microrganismos que causam mastite podem ser classificados como contagiosos, ambientais e oportunistas. O habitat principal dos contagiosos é a glândula mamária, de tal modo que o contágio ocorre normalmente durante as operações de ordenha. Neste grupo estão incluídos *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma spp.* e *Staphylococcus aureus*. Este último, é incluído neste grupo apesar de o seu habitat principal não ser o interior do úbere, mas o epitélio interno e externo do teto. Nos ambientais estão incluídos os estreptococos “não *agalactiae*” e os coliformes, e ainda algumas espécies de bacilos e os Gram (-) em geral. A contaminação por estes microrganismos não acontece durante a ordenha, mas sim com o contacto dos animais com materiais contaminados (Ex. solo, cama, água,

esterco, etc). Por último, os oportunistas que são sobretudo microrganismos do género *Staphylococcus*. São exemplos disso os estafilococos coagulase negativos (SCN) que constituem a principal causa de mastites subclínicas na maioria dos rebanhos de caprinos. O seu habitat natural é a pele dos animais e dos humanos (Corrales *et al.*, 1997a).

O Quadro 4 resume os principais microrganismos isolados em casos de mastites nos caprinos.

**Quadro 4** – Complexo etiológico das mastites caprina (Corrales *et al.*, 1997a).

<b>Bactérias Gram (+)</b>	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> , Estafilococos coagulase negativos (SCN)
	<i>Micrococcus spp.</i>	
	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> ; <i>Streptococcus</i> grupo C; <i>Streptococcus spp.</i>
	<i>Corynebacterium spp.</i>	<i>Corynebacterium bovis</i> ; <i>Corynebacterium spp.</i>
	<i>Trueperella spp.</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>
	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Bacillus cereus</i> ; <i>Bacillus spp.</i>
	<i>Clostridium spp.</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
	<i>Nocardia spp.</i>	<i>Nocardia asteroides</i> ; <i>Nocardia farcinica</i>
<b>Bactérias Gram (-)</b>	<i>Escherichia spp.</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Enterobactérias</b>	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Enterobacter spp.</i>	
	<i>Proteus spp.</i>	
	<i>Serratia spp.</i>	<i>Serratia marcescens</i> ; <i>Serratia spp.</i>
<b>Não Enterobactérias</b>	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Pseudomonas spp.</i>
	<i>Mannheimia spp.</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
	<i>Pasteurella spp.</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
<b>Micoplasmas</b>	<i>Mycoplasma spp.</i>	<i>Mycoplasma agalactiae</i> ; <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>Capri</i> ; <i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>Capricolum</i> ; <i>Mycoplasma putrefaciens</i> ; Other mycoplasmas
<b>Fungos</b>	<i>Acholeplasmas spp.</i>	<i>Acholeplasmas laidlawii</i> ; <i>Acholeplasmas modicum</i>
	<i>Candida spp.</i>	<i>Candida albicans</i> ; Other cândidas
	<i>Cryptococcus spp.</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<b>Vírus</b>		Lentivirus dos pequenos ruminantes

Genericamente, os estafilococos são os agentes patogénicos mais comuns nas mastites caprinas, podendo representar até 88,1% de todos os isolados bacterianos em infeções intramamárias (Baudry *et al.*, 2000). Os SCN são os agentes mais frequentemente isolados em mastites subclínicas (Contreras *et al.*, 1995, 2007; Moroni *et al.*, 2005a; Koop *et al.*, 2012a; Souza *et al.*, 2012). *S. aureus* é responsável pela maior parte dos casos de mastite clínica (Gilbert *et al.*, 2006).

Por sua vez, os estreptococos normalmente representam até 10% dos microrganismos isolados; nas bactérias Gram-negativas, as duas espécies mais frequentemente implicadas são *E. coli* e *Pseudomonas spp.* (Contreras *et al.*, 2003).

A existência de micoplasmas nas explorações pode alterar as proporções relativas dos agentes etiológicos de mastite clínica. Nas áreas endêmicas de agalaxia contagiosa, a prevalência de casos clínicos é geralmente baixa, mas pode aumentar drasticamente, especialmente nos rebanhos recém-infectados (Bergonier e Berthelot, 2008).

Os lentivírus dos pequenos ruminantes, como o vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV), têm tropismo para os monócitos/macrófagos e provocam uma infecção persistente ao longo de toda a vida do animal. As principais manifestações clínicas estão associadas ao úbere (endurecimento do tecido mamário - "úbere duro" - tetas assimétricas e uma diminuição na produção de leite), e atingem articulações, tecido nervoso e pulmões (Leboeuf e Berlangier, 2003; Smith e Sherman, 2009).

Dada a diferença entre critérios utilizados no diagnóstico de mastites nos vários estudos é difícil a comparação dos diferentes resultados de prevalência publicados; sendo que parece evidente que os resultados variam de exploração para exploração e segundo o sistema de manejo.

A glândula mamária e os tetos infectados (ex. infecção estafilocócica, ectima contagioso, lesões provocadas pela ordenha) são o principal reservatório dos agentes que podem causar mastite em caprinos (Quadro 5) (Bergonier *et al.*, 1997, 2003). Os equipamentos de ordenha têm um papel epidemiológico importante, bem como o pessoal de ordenha (Bergonier *et al.*, 1997) e outros equipamentos e instalações (Bergonier *et al.*, 2003).

**Quadro 5** - Fontes de infecção e tipos de transmissão em mastites caprinas segundo o agente patogénico (Bergonier *et al.*, 1998).

Agente patogénico	Fonte de infecção	Tipo de transmissão
<i>Staphylococcus aureus</i>	Glândula mamária	Galactófora, máquina de ordenha
<i>Staphylococcus coagulase negativos</i>	Glândula mamária	Galactófora, máquina de ordenha
<i>Streptococcus uberis</i>	Ambiente, glândula mamária	Galactófora, máquina de ordenha
<i>Streptococcus uberis</i>	Suínos, glândula mamária	Galactófora, máquina de ordenha, ambiental
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Água	Galactófora, máquina de ordenha
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Camas, feno mal conservado	Galactófora
<i>Mycoplasma spp.</i>	Animais portadores	Galactófora, respiratória, oral

## **3.2. Importância das mastites caprinas**

A importância das mastites pode ser destacada sob o ponto de vista: legal, higiénico e económico. A nível europeu a importância legal está plasmada no Regulamento (CE) Nº 853/2004 de 29 de Abril, que define os critérios da qualidade microbiológica do leite. Essa exigência visa salvaguardar a qualidade higiénica do leite minimizando o risco de infecção ou intoxicação dos consumidores por bactérias ou toxinas presentes no leite. Por sua vez, as perdas económicas provocadas pela mastite são muito elevadas nos caprinos, e incluem perdas na produção/qualidade de leite, sanidade/produção animal e segurança dos consumidores (Bergonier e Berthelot, 2003).

### **3.2.1. Produção de leite**

As mastites têm repercussões sobre a qualidade e quantidade do leite produzido.

Nas mastites clínicas a consequência directa é a diminuição da produção de leite, além de que, pelas alterações visíveis e pelo aumento substancial das contagens de células somáticas no tanque, o leite produzido não está apto para o consumo humano (Contreras *et al.*, 1997b). Por sua vez as mastites subclínicas, como são mais prevalentes, são consideradas por muitos autores como a causa mais importante de redução da produção leiteira (Leitner *et al.*, 2004a, Silanikove *et al.*, 2014) e têm maiores consequências negativas na produção que as mastites clínicas, porque passam facilmente despercebidas e têm carácter persistente (Contreras *et al.*, 1997a).

Foi encontrada uma correlação negativa entre a produção média de cada rebanho e a prevalência de mastites subclínicas. De salientar que a correlação encontrada não segue um modelo linear uma vez que a produção depende também de factores genéticos e ambientais. Mas o modelo encontrado explicava cerca de 40% da variação dos valores de produção média entre os rebanhos estudados (Sánchez *et al.*, 1997). As perdas em caprinos podem corresponder a 21% (Sánchez *et al.*, 1997) ou 23% da produção total (Dulin *et al.*, 1983). Em estudos realizados em ovinos e caprinos a quantidade de leite produzido por metades mamárias experimentalmente infetadas por SCN é significativamente menor do que a produzida nas metades saudáveis da mesma cabra (Quadro 6; Leitner *et al.* (2004a).

**Quadro 6** - Impacto das mastites subclínicas por SCN na produção e qualidade do leite em caprinos (Leitner *et al.*, 2004a).

	Metade saudável	Metade Infectada
<b>Produção de leite</b>	0,98 kg	0,69 kg
<b>SCC</b> (células/ml)	417.000	1.750.000
<b>Gordura</b> (g/l)	38,9	38,8
<b>Proteína</b> (g/l)	34,2	35,0
<b>Caseína</b> (mg/ml)	28,1	28,2
<b>Soro</b> (g/l)	6,1	6,8
<b>Rendimento coalhada</b>	232 g/l	208 g/l
<b>Tempo coalhada</b> (segundos)	167	295

Estes dados são diferentes dos encontrados em outros estudos onde a infecção por SCN não conduziu a uma menor produção (De Crémoux *et al.*, 1996). A diferença entre esses dois resultados foi atribuída por De Crémoux *et al.* (1996) a uma maior produção da metade saudável, que compensaria as perdas da glândula infectada.

Mais recentemente, para outros autores a infecção intramamária por agentes patogênicos maiores causou uma pequena queda na produção (0,13 kg/dia) sem significado estatístico (Koop *et al.*, 2010b). Mas se o estatuto infeccioso do primeiro mês de lactação for tido em conta para prever a produção para o resto da lactação, as quebras de produção são superiores (0,29 kg/dia). Nestes estudos, o efeito da infecção intramamária na produção de leite em caprinos parece variar com o tipo de agentes envolvidos: as infecções por agentes patogênicos maiores estão associadas a uma pequena redução da produção de leite e nas infecções por SCN não há alterações significativas da produção. Em infecções por *Corynebacterium bovis* foi descrito, inclusivamente, um aumento da produção de leite (Koop *et al.*, 2009, 2010b).

Relativamente às contagens de células somáticas, os caprinos em lactação com CCS entre  $800 \times 10^3$  e  $1.600 \times 10^3$  células/ml, podem ter uma quebra de produção de 16% relativamente a cabras com CCS inferiores a  $200 \times 10^3$  células/ml. A percentagem de perdas é de 28% quando as CCS ultrapassam  $3.200 \times 10^3$  células/ml. Assim, a produção de leite por lactação diminui à medida que o número de células somáticas aumenta, uma vez que, a diminuição da produção está relacionada com a gravidade da inflamação (De Crémoux *et al.*, 1996; Chingwen *et al.*, 2002). Podem surgir variações significativas segundo a raça considerada. Barrón-Bravo *et al.* (2013) estimaram perdas na produção de leite com o aumento das CCS entre 0,2 - 29,1%. Na raça Alpina registaram-se maiores médias de CCS com menores produções associadas; e as menores CCS e maiores produções foram obtidas na raça Oberhasli.

### 3.2.2. Alterações qualitativas

Relativamente às alterações qualitativas (Quadro 7), nas mastites por agentes patogénicos maiores, pode existir uma diminuição de 7% na quantidade de proteína (MP). Simultaneamente pode registar-se uma diminuição da produção de leite equivalente, pelo que o teor de proteína (TP) mantém-se estável.

**Quadro 7** – Modificações físico-químicas do leite causadas por mastites (Modificado de Serieys *et al.*, 1987).

Características físico-químicas		Evolução
Lactose		↓
	Teor proteico	= ou ↑
	% proteínas coaguláveis	↓
Material proteico (MP)	% proteínas solúveis	↑
	Proteólise pela plasmina	↑
Matérias gordas (MG)	Teor butiroso (TB)	= ou ↓
	Ácidos gordos livres	↑
Minerais	K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , P	↓
	Cloreto de sódio (NaCl)	↑
	pH	↑

A quantidade de gordura (MG) diminuiu de forma mais acentuada (-13,3%), de tal modo que o teor de gordura (TB) diminuiu significativamente (2,4 g/kg). No caso de infecções por SCN, o MP e o TP permanecem inalterados e diminuem 3,1% a MG e 0,9 g/kg o TB (De Crémoux *et al.*, 1996; Baudry *et al.*, 1997; Chingwen *et al.*, 2002).

No que diz respeito às proteínas do leite, a concentração de caseína não é afectada, mas as proteínas do soro, como as imunoglobulinas e albumina, encontram-se em maior quantidade. A lactose e os minerais (ex. cálcio, fósforo e potássio) estão em quantidades menores em mastites causadas por SCN, enquanto o sódio e o cloro se encontram em quantidades mais elevadas. Concomitantemente, a actividade do cálcio é reduzida e a degradação enzimática da caseína está aumentada (Contreras *et al.*, 1997a, Leitner *et al.*, 2004a). O aumento da atividade da plasmina em resposta à infecção é pouco acentuada nos caprinos, ao contrário do que acontece em outros ruminantes domesticados (Leitner *et al.*, 2004a).

Adicionalmente, com o aumento das CCS registam-se menores teores de gordura (decréscimo de 0,01 a 10,8%) e maior teor proteico no leite (aumento de 0,3 – 15%) registando-se variações segundo a raça considerada (Barrón-Bravo *et al.*, 2013).

Devido a essas alterações na composição, o leite obtido tem um menor rendimento de queijo e um tempo de coagulação maior do que de um leite de uma cabra saudável (Contreras *et al.*, 1997a; Silanikove *et al.*, 2014). Os queijos elaborados

a partir de leites com CCS elevadas têm menor conteúdo em gordura e um aumento dos ácidos gordos (Le Maréchal *et al.*, 2011; Olechnowicz *et al.*, 2012) e os iogurtes têm maior conteúdo proteico e um maior nível de sinérise (i.e. saída do soro) (Olechnowicz *et al.*, 2012).

### **3.2.3. Produção animal**

As mastites gangrenosas podem resultar na morte do animal e são responsáveis por um elevado número de refugos. Outro aspecto a ter em consideração é que as cabras com mastite subclínica, e portanto com valores produtivos inferiores ao seu potencial produtivo, podem ser eliminadas do esquema de selecção genética de forma inapropriada, ocorrendo perda de potencial genético nos programas de melhoramento baseados nos dados do contraste leiteiro mensal (Contreras *et al.*, 2003).

As crias expostas ao leite proveniente de mães com mastite ingerem uma grande quantidade de agentes patogénicos e estão sujeitas a várias doenças, tais como gastroenterites ou septicemias. Isto por si só, ou agravado pelo facto de o colostro ser de pior qualidade, resulta num aumento acentuado da mortalidade ou menores índices de crescimento (Contreras *et al.*, 1997b).

### **3.2.4. Saúde pública**

O leite de cabras com mastite pode conter agentes patogénicos para os seres humanos dos quais se destacam os agentes que provocam doenças como a tuberculose, brucelose, listeriose, salmonelose, entre muitas outras (Contreras *et al.*, 1997b). A pasteurização do leite é um método eficaz para eliminar todos os agentes responsáveis por essas doenças, mas não é compatível com todas as técnicas usadas no fabrico do queijo, nomeadamente os queijos feitos a partir de leite crú. A presença de toxinas termoestáveis produzidas por *S. aureus* e alguns estreptococos constitui um grave problema de segurança alimentar uma vez que não são destruídas pela pasteurização e podem ser responsáveis por intoxicações alimentares.

Por outro lado, o leite pode, em consequência de más práticas produtivas, conter resíduos de antibióticos ou pesticidas (Bergonier *et al.*, 2003; Contreras *et al.*, 2007; Brenaut *et al.*, 2014). A presença de inibidores constitui um risco para a saúde do consumidor, compromete os processos industriais e pode contribuir para a desconfiança do consumidor no leite e seus derivados (Contreras *et al.*, 1997c).

### 3.2.5. Requisitos legais

A qualidade bacteriológica do leite de cabra, deve ser garantida por forma a proteger o consumidor, e simultaneamente atender às exigências associadas à transformação tecnológica do leite, pois em muitas regiões grande parte do leite produzido é destinado à produção de queijo.

Na União Europeia, a salvaguarda da qualidade microbiológica do leite de cabra está prevista na legislação em vigor, através da limitação à comercialização de remessas de leite que superem o limite legal do teor total em microrganismos mesófilos. O Regulamento (CE) Nº 853/2004 de 29 de Abril prevê, quando o leite ou seus produtos são tratados termicamente, que os operadores das empresas do sector alimentar devem assegurar que o leite cru de cabra não deve ter mais de  $1.500 \times 10^3$  UFC/ml de média geométrica constatada ao longo de um período de dois meses, com, pelo menos, duas colheitas mensais. Este valor é reduzido para  $500 \times 10^3$  UFC/ml, quando utilizado no fabrico de produtos feitos a partir de leite cru.

Tendo em conta a dinâmica das CCS no leite cabra, que será resumida mais à frente neste trabalho, influenciada por vários factores não infecciosos, a legislação na UE, ao contrário do determinado para o leite de vaca, não incorporou os limites celulares até que haja um consenso na comunidade científica. Mas desde o International Symposium: somatic cells and milk of small ruminants (Bella, Itália) realizado em 1994 que foi sugerido à UE que este limite não fosse nunca inferior a  $1.500 \times 10^3$  células/ml (Contreras *et al.*, 1997a).

Os sistemas de pagamento tradicionais em função da qualidade do leite de cabra eram feitos em função do teor butíroso e do estrato seco. Mas, nos últimos anos há uma tendência crescente para o pagamento em função de critérios higiénicos (qualidade bacteriológica) e sanitários (CCS) (Contreras *et al.*, 1997a). O primeiro exemplo de programa de pagamento pela qualidade do leite de cabra a incorporar esses critérios teve início em França em 1986 (Le Mens, 1991; Dumoulin e Peretz, 1993) e permitiu uma melhoria significativa da situação sanitária do leite de cabra (Dumoulin e Peretz, 1993; Lodi, 1993). Desde então, outros países da Europa (Portugal, Espanha, Itália, Grécia, Noruega e Holanda), Estados Unidos, Canadá, Israel e Taiwan implantaram sistemas de pagamento por qualidade para o leite de cabra (Pirisi *et al.*, 2007).

Nos EUA, a Food and Drug Administration (FDA), obriga a um controlo mensal das CCS no tanque e são tomadas medidas regulatórias quando 2 de 4 amostras excedem o limite. A licença de exploração é retirada quando o limite de 3 em 5 testes é excedido. Atualmente o limite de CCS para os caprinos é de  $1.500 \times 10^3$  células/ml

(para bovinos, búfalos e ovelhas é de  $750 \times 10^3$  células/ml). As contagens microbianas de mesófilos no leite do tanque não podem exceder  $100 \times 10^3$  UFC/ml. A experiência demonstrou algumas dificuldades no cumprimento do limite de CCS imposto ( $1.000 \times 10^3$  células/ml) pela “Pasteurized Milk Ordinance” até 2009 o que justificou a atualização do limite (PHS/FDA, 2011; Ruegg, 2011).

Na ausência de limite legal, alguns operadores económicos em Portugal tem utilizado, fundamentalmente, dois limiares:  $1.000 \times 10^3$  células/ml, baseado no limite de CCS anteriormente regulamentado nos Estados Unidos, ou  $1.200 \times 10^3$  células/ml, baseado no esquema de pagamento pela qualidade do leite na Noruega (Skeie, 2014).

### 3.2.6. Perdas económicas

As perdas económicas causadas pelas mastites em caprinos, apesar de evidentes, não são fáceis de quantificar. Para uma melhor perceção podem ser divididas em perdas económicas directas (Quadro 8) e indirectas (Quadro 9).

Nos custos directos incluem-se as perdas associadas à diminuição da produção ou não aproveitamento do leite para consumo humano e a mortalidade das cabras nos casos mais graves. Os custos de intervenção técnico-veterinária em caso de mastites clínicas também devem ser considerados, tal como os investimentos realizados na prevenção das mastites (ex. produtos profiláticos e o tempo gasto com a imersão dos tetos).

**Quadro 8** – Perdas directas associadas às mastites caprinas (Contreras *et al.*, 1997bc; Bergonier *et al.*, 2003).

<b>Perdas directas</b>
- Diminuição da produção de leite;
- Diminuição qualidade e decréscimo no pagamento do leite por aumento das CCS;
- Leite não aproveitado no caso de mastites clínicas;
- Custos de tratamento das mastites clínicas;
- Mortalidade cabras.

Existem outros aspectos que devem ser considerados como custos nas mastites caprinas (Quadro 9), tais como, as alterações ao manejo do rebanho por parte do produtor, que incluem a separação das cabras doentes e alteração na ordem de ordenha, o fornecimento leite/colostró às crias filhas dessas cabras, os custos de trabalho adicional que toda essa logística implica (Contreras *et al.*, 1997c).

**Quadro 9** – Perdas indiretas associadas às mastites caprinas (Contreras *et al.*, 1997bc; Bergonier *et al.*, 2003)

<b>Perdas indiretas</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Perda de leite devido ao intervalo de segurança após o tratamento;<ul style="list-style-type: none"><li>- Decréscimo da produção de queijo;</li></ul></li><li>- Maior quantidade de problemas no fabrico de queijo;<ul style="list-style-type: none"><li>- Menor crescimento das crias;</li><li>- Refugo precoce das cabras;</li></ul></li><li>- Custos gerados pelo plano de controlo de mastites;</li><li>- Problemas associados à presença de inibidores no leite;<ul style="list-style-type: none"><li>- Perda no melhoramento genético;</li><li>- Limitações à comercialização.</li></ul></li></ul>

Não devem ser negligenciadas as perdas associadas aos intervalos de segurança e à grande quantidade de recorrências. Por último, devem ser ainda contabilizados os custos no diagnóstico das mastites subclínicas e os gastos no diagnóstico laboratorial das mastites (Contreras *et al.*, 1997c).

### **3.3. Diagnóstico das mastites**

A identificação de alterações macroscópicas no leite, de sinais de inflamação no úbere e a cultura microbiana da secreção mamária são as técnicas mais utilizadas para a identificação de mastites clínicas ou subclínicas em caprinos (Smith e Sherman, 2009). São ainda importantes para o diagnóstico precoce de mastites os métodos indirectos baseados na medição de indicadores da inflamação: contagem de células somáticas (CCS), condutividade eléctrica, proteínas da fase aguda e a actividade de diferentes enzimas.

#### **3.3.1. Sinais clínicos**

Os primeiros indícios de mastite clínica incluem uma diminuição na produção de leite ou a claudicação no lado afectado (Plummer e Plummer, 2012). À inspecção visual pode observar-se assimetria do úbere e uma glândula tumefacta (processo agudo) ou atrofiada (inflamação crónica) (Kapur e Singh, 1978). À palpação podemos identificar a presença de calor, dor e edema (mastite aguda), endurecimento ou atrofia (mastite crónica), ou mesmo a presença de múltiplos abscessos. Nas mastites agudas, a cabra pode apresentar sinais sistémicos como febre, anorexia e depressão. Nos casos de mastite gangrenosa o úbere apresenta-se frio e edematoso e/ou com secreção vermelha e aquosa (Smith e Sherman, 2009). Nos sistemas de aleitamento natural os cabritos demonstram ter fome e a mastite está associada a um aumento da taxa de mortalidade nas crias (Addo *et al.* 1980, 1984).

### 3.3.2. Diagnóstico microbiológico

A identificação dos microrganismos responsáveis pela mastite é fundamental para o estabelecimento de planos terapêuticos e na definição de estratégias profiláticas adequadas ao controlo do agente etiológico.

A cultura bacteriana é o método de diagnóstico mais adequado para infecção intramamária (IIM) em caprinos (Paterna *et al.*, 2014). O diagnóstico clássico de mastites clínicas ou subclínicas é relativamente fácil e não requer procedimentos laboratoriais complexos, utilizando-se normalmente ágar sangue em condições de aerobiose, cumprindo os protocolos do US National Mastitis Council (Oliver *et al.*, 2004; Paterna *et al.*, 2014). Para determinação do crescimento bacteriano total utiliza-se o “plate count agar” (PCA) de acordo com a norma ISO 4833:203 (Zweifel *et al.*, 2005; Dik *et al.*, 2009). Estes procedimentos requerem que a colheita de leite seja feita em condições de assépsia (Contreras *et al.*, 1997b; Paterna *et al.*, 2014). No entanto, apresenta limitações na identificação de mastites causadas por *S. aureus* (Koop *et al.*, 2011, 2012b) e não permite a detecção de lentivírus (Paterna *et al.*, 2014). Por outro lado, o diagnóstico de *Mycoplasma spp.* em mastites caprinas requer a utilização de meios específicos, enriquecidos e a metodologia é tecnicamente mais exigente e demorada (Razin e Freund, 1984; Paterna *et al.*, 2014).

Desta forma, se necessário, os métodos baseados na detecção de fragmentos específicos de ADN por “polymerase chain reaction” (PCR) podem ser utilizados de forma complementar à cultura bacteriana, para identificação dos agentes responsáveis por mastites caprinas (Paterna *et al.*, 2014).

### 3.3.3. Contagem automática

Muitas vezes, a cultura microbiana, demorada e fastidiosa, ou o PCR mais caro, não podem ser usados por rotina. Nessas situações os sistemas de contagem automáticos de bactérias totais presentes no leite podem ser uma alternativa. Hoje em dia são utilizados pela indústria em algumas regiões do mundo e o resultado determina em parte o preço do leite pago ao produtor. Muitos destes métodos utilizam a citometria de fluxo para contagem das bactérias em leite cru, como por exemplo o BactoScan FC®.

Este método oferece bons parâmetros de validade. As contagens bacterianas totais estão altamente correlacionadas com o método de referência (relação linear com a cultura bacteriana); a repetibilidade (coeficiente de correlação de 0,99 entre duas amostras pareadas) e a reprodutibilidade são excelentes (Tirard-Collet *et al.*, 1991; Ninane *et al.*, 2000).

### 3.3.4. Contagem de células somáticas (CCS)

As células presentes naturalmente no leite podem ter duas origens: (1) a corrente sanguínea, como é o caso dos neutrófilos, dos linfócitos e dos monócitos/macrófagos, ou (2) a descamação do epitélio mamário (i.e. células epiteliais). Dependendo do modo de secreção ser apócrina ou mecrócrina também podem ser encontradas, respectivamente, em maior ou menor quantidade, partículas citoplasmáticas anucleadas (Perrin e Baudry, 1993).

A presença no leite de células da corrente sanguínea é fundamentalmente de origem inflamatória e imunitária, ao contrário das células epiteliais e partículas citoplasmáticas (Bergonier *et al.*, 1996; Sordillo e Streicher, 2002). Estas células estão presentes em glândulas mamárias saudáveis, embora os processos inflamatórios, independentemente da causa, conduzam a um aumento da transferência de leucócitos, principalmente polimorfonucleares para o leite por quimiotaxia e diapedese (Sordillo e Streicher, 2002).

Assim, o aumento de leucócitos e conseqüentemente das CCS pode ser considerada um factor indicador do estado inflamatório da glândula mamária (Bergonier *et al.*, 1996), mas a sua interpretação deve ter em conta factores não infeciosos que também podem influenciar as contagens destas células (Paape *et al.*, 2001).

Há três características que distinguem o leite de cabra do de vaca e de ovelha na ausência de infecção intramamária: os elevados valores de partículas citoplasmáticas, de neutrófilos polimorfonucleados e de CCS (Paape *et al.*, 2001; Boutnaud e Jammes, 2002; Paape *et al.*, 2007). Os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) constituem mesmo a maioria da população (45-74% das células) no leite de cabras saudáveis. A sua proporção varia de acordo com a fase da lactação, à medida que se avança na lactação a percentagem de neutrófilos aumenta (Droke *et al.*, 1993), atingindo 74-80% no final da lactação (Bergonier *et al.*, 2003). Em úberes infectados a percentagem de neutrófilos é ainda maior (71-86%) (Dulin *et al.*, 1983; Paape, *et al.*, 2007). A percentagem de macrófagos no leite de cabra é menor (cerca de 15%) do que a encontrada no leite de vaca e de ovelha. Em vacas e ovelhas livres de infecção, os macrófagos são o tipo celular predominante no leite, representando entre 40 e 80% de todas as células somáticas (Paape *et al.*, 2001).

Outra particularidade importante do leite de cabra é ter um elevado número de partículas citoplasmáticas devido ao tipo de secreção apócrina (Dulin *et al.*, 1982; Dulin *et al.*, 1983b; Paape e Capuco, 1997; Sousa *et al.*, 2012). A secreção do leite ocorre com a passagem dos componentes do leite da membrana apical da célula para a luz

alveolar com perda de citoplasma, ao contrário do que acontece nos bovinos (Neveu *et al.*, 2002). Embora a secreção de leite de ovelha também tenha uma importante componente apócrina, a concentração de partículas citoplasmáticas é muito baixa, cerca de um décimo da encontrada no leite de cabra (Paape *et al.*, 2001).

Estas partículas têm morfologia esférica e tamanho semelhante aos leucócitos, e embora a maioria não tenha núcleo (Dulin *et al.*, 1983; Paape e Capuco, 1997) são contadas como células somáticas quando não são utilizados métodos “específicos de ADN” (Marco *et al.*, 2012).

As partículas citoplasmáticas não são influenciadas por factores fisiológicos nem por factores patológicos (Contreras *et al.*, 1998).

Além do mais, a concentração celular no leite de cabra é mais elevada do que no leite de vaca e de ovelha (Paape. *et al.*, 2007). Na ausência de mastite, as CCS em leite de cabra podem variar entre  $270 \times 10^3$  e  $2.000 \times 10^3$  células/ml, ao passo que no leite de vaca e leite de ovelha variam entre  $10 \times 10^3$  e  $200 \times 10^3$  células/ml (Paape *et al.*, 2001).

#### 3.3.4.1. Métodos de medição das CCS

A contagem através da microscopia direta é universalmente considerado o método de referência de CCS e no leite de cabra exigem a utilização de colorações específicas de ADN como o verde de metilo pironina (i.e. coloração de referência nos EUA), o May-Grünwald-Giems e o tricrómico de Gallego. Esta técnica é, no entanto, demorada e fastidiosa, impraticável como exame de rotina (Gonzalo *et al.*, 1998b; Berry e Broughan, 2007; ISO/IDF, 2008).

O teste californiano de mastites (TCM) é um método semi-quantitativo para estimar a quantidade de nucleoproteínas no leite, e, indiretamente, a quantidade de células no leite. A interpretação dos resultados é feita com base numa escala de classificação que varia de 0 (negativa) a 3+ (formação de gel) como se pode ver no quadro 10.

**Quadro 10** – Pontuação do TCM correspondente à reação visível.

TCM	Reação visível
0	A textura permanece líquida sem que ocorra formação de precipitado.
T	Precipitado ligeiro, visível após inclinar a raquete.
1+	Precipitado distinto sem formação de gel.
2+	A mistura torna-se mais espessa e quando se agita a raquete forma uma massa periférica, ficando o fundo do copo exposto.
3+	Formação de uma massa gelatinosa firme e consistente.

É um teste que tem a vantagem de ser rápido e poder ser utilizado à beira do animal como “teste de estábulo”. Na maioria dos estudos, considerando como resultado positivo a classificação de 2+ ou 3+, a concordância entre o TCM e a bacteriologia é geralmente boa, apresentando valores valor predito do resultado negativo elevados (Contreras *et al.*, 1997a). Assim, apesar de o TCM ser uma prova subjetiva, sobretudo se considerarmos as diferenças entre duas classificações seguidas e não os extremos, pode ser especialmente útil para classificar os animais que não têm infecção intramamária (Quintas, 2015).

O método fluoro-optoelectrónico (exemplo: Fossomatic<sup>®</sup>, Foss, Dinamarca) é um método “específico de ADN” baseado na contagem de elementos nucleados após a coloração do ADN nuclear com um corante fluorescente. Este tipo de tecnologia utiliza uma coloração específica de ADN que permite contar apenas os elementos nucleados, evitando a sobreposição de células somáticas e partículas citoplasmáticas (Perrin et Baudry, 1993).

Este tipo de equipamentos tem sido utilizado a nível laboratorial para realizar as contagens de células somáticas do leite de tanque que serve como parâmetro para estabelecer o pagamento aos produtores de leite em algumas regiões do mundo (de Crémoux, *et al.*, 1997).

Este método é mais adequado ao leite de cabra que os contadores automáticos de partículas e os resultados obtidos são mais fidedignos (Ferrer *et al.*, 1996).

Nos últimos anos surgiram no mercado equipamentos portáteis para CCS. O DeLaval<sup>®</sup> cell counter que conta as células somáticas de forma óptica é um bom exemplo disso. Este equipamento foi testado no leite cabra (Berry e Brougham, 2007), e é preciso e objetivo mas o equipamento é dispendioso pelo que a sua utilização só está ao alcance de explorações de grande dimensão (Persson e Olofsson, 2011).

#### **3.3.4.2. Factores de variação das contagens de células somáticas**

As infecções bacterianas são a principal causa de flutuações nas contagens (De Crémoux *et al.*, 1994; Leitner *et al.*, 2012) no entanto um número considerável de factores inflamatórios e não inflamatórios podem influenciar as CCS do leite em caprinos. Recentemente Jiménez-Granado *et al.* (2014) resumiram a influência desses factores (Quadro 11).

**Quadro 11** - Factores que influenciam as contagens de células somáticas no leite de cabra (Jiménez-Granado *et al.*, 2014).

<b>Inflamatórios</b>	Etiologia infecciosa	Bactérias Lentivírus dos Pequenos Ruminantes
	Etiologia não infecciosa	Agentes físicos Agentes químicos
<b>Não Inflamatórios</b>	Intrínsecos	Fase da lactação Número de lactações Cio Variações diárias Raça Nº de crias Fração da ordenha Intervalo entre ordenhas Frequência de ordenha Nível de produção
	Extrínsecos	Stress Tipo de ordenha Alimentação Sazonalidade Sistema de produção Instalações Controlo reprodutivo
<b>Outros factores</b>	Método de contagem Armazenamento e conservação das amostras	

Os factores fisiológicos estão sempre sujeitos ao estado de infecção do úbere, e a sua influência diminui durante as IIM (Luengo *et al.*, 2004) ou é mesmo nula no caso de infecções pelos agentes patogénicos maiores (De Crémoux *et al.*, 1994).

A fase de lactação é o factor de origem não infecciosa mais importante de variação das contagens células somáticas individuais (CCSi) (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2007). As CCSi diminuem durante os primeiros dias de lactação (Quadro 23), para em seguida aumentarem gradualmente até à secagem (Perrin e Baudry, 1993; McDougall *et al.*, 2010; Persson *et al.*, 2014). Outro factor importante é o nº de lactações (ou paridade), as CCS aumentam com o número de lactações do animal. A maioria dos autores encontraram uma correlação positiva entre o número de lactações e as CCSi (Dulin *et al.*, 1983a; Luengo *et al.*, 2004; Paape *et al.*, 2007).

Outros factores relacionados com o stress de manejo podem ter influência nas CCS nos caprinos (Quadro 11). De salientar que a leitura individual dos factores expostos pressupõe uma interpretação parcial do fenómeno, uma vez que é necessário perceber as relações existentes entre os diferentes factores que influenciam as CCS (Jiménez-Granado *et al.*, 2014).

Por esta razão a definição de um limiar de positividade para as CCS é controverso (Souza *et al.*, 2012). Para McDougall *et al.* (2001), particularmente se se examinar um só animal, a influência dos diversos factores fisiológicos, não permite aumentar o valor predito do resultado positivo baseado nas CCS, que, apesar destas limitações, consideraram uma ferramenta muito útil. Assim, outros autores sugerem a interpretação das CCS à luz da fase de lactação (Haenlein, 2002).

O limiar mais consensual para diagnóstico de IIM subclínica em cabras Murciano-Granadinas é considerando a média geométrica de contagem de células somáticas individual (CCSi) monitorizada mensalmente durante 7 meses,  $1.000 \times 10^3$  células/ml (Sánchez *et al.*, 1999b). Por sua vez, para De Crémoux *et al.* (1994) o melhor compromisso é obtido ao escolher  $750 \times 10^3$  células/ml como o limiar de positividade entre cabras saudáveis e infectadas por agentes patogénicos menores (ex. SCN) e  $1.750 \times 10^3$  células/ml como o limiar de positividade entre cabras infectadas por SCN e as infectadas por agentes patogénicos maiores (ex. *S. aureus* e coliformes). Dado o elevado de factores de variação infecciosos e não infecciosos das CCS, mais do que um valor isolado, cuja interpretação é arriscada, é preferível assumir o limiar de positividade como válido quando o valor é excedido duas ou três vezes (em cinco ou seis medidas anuais), o que melhora a precisão do diagnóstico (De Crémoux *et al.*, 1994). Alguns estudos recomendam a determinação de um limiar para o pico da lactação. Koop *et al.* (2011) propuseram um limiar de CCS de  $1.500 \times 10^3$  células/ml para detectar mastites por *S. aureus* em cabras; este limiar poderá ser aumentado para  $2.000 \times 10^3$  células/ml ou mais na determinação de CCS no fim da lactação.

Para um adequado controlo das CCS Paterna *et al.* (2014) sugerem que sejam aproveitados os resultados obtidos nas explorações sujeitas a controlos oficiais periódicos ao abrigo da directiva do International Committee for Animal Recording (ICAR) onde são colhidas amostras de leite a cada quatro (sistema A4) ou seis (sistema A6) semanas. Nestas condições poderão conhecer-se as CCS periódicas de forma barata e simples.

#### **3.3.4.3. CCS no leite de tanque**

Se as CCS a nível individual apresentam problemas de interpretação as CCS no leite de tanque (CCSt) são um desafio adicional. As CCSt apenas estão associadas com a prevalência de IIM no início da lactação. A partir daí as CCSt podem apresentar variações importantes (McDougall *et al.*, 2014). Segundo vários estudos, normalmente ocorre uma ligeira diminuição das CCSt no início da primavera (época de partos no inverno), seguido de um aumento gradual até o inverno seguinte, que corresponde ao

fim da lactação (Droke *et al.*, 1993; De Crémoux *et al.*, 1997; Koop *et al.*, 2009). Dadas estas variações sazonais, alguns autores sugeriram utilização da média geometria em vez da aritmética (Crémoux *et al.*, 1997). A utilização da média geométrica também permite atenuar os efeitos temporários sobre as CCS e as possíveis elevações pontuais devidas a factores de manejo (Sánchez *et al.*, 1998).

A contagem de células somáticas totais CCSt apresenta variações mensais, mais ou menos regulares de um ano para o outro (Koop *et al.*, 2009; que são causadas, em parte, graças à intervenção do factor “fase de lactação” e ao factor “concentração”, uma vez que a maior parte do leite é produzido entre Fevereiro e Junho (De Crémoux *et al.* 1997; Koop *et al.*, 2009).

Alguns estudos correlacionam as contagens bacterianas totais no tanque (TBCt) e as CCSt (Park e Humphrey, 1986; Tirard-Collet *et al.*, 1991; Zeng e Escobar, 1996; Raynal-Ljutovac *et al.*, 2007), mas os coeficientes de correlação encontrados são pouco elevados (em média 0,4). A variação das CCSt e das TBCt é explicada não só pelas IIM, mas também pelo fenómeno de diluição/concentração, que depende da fase de lactação (Koop *et al.*, 2009).

No entanto, as contagens de estafilococos totais estão correlacionadas com as CCSt (Koop *et al.*, 2010a). Os estreptococos e micoplasmas também estão associados a aumentos significativos das CCSt. Não se encontraram diferenças significativas nas CCSt entre explorações cronicamente infetadas por *Mycoplasma spp.* (sem sinais clínicos) e aquelas onde ocorrem surtos da doença (Corrales *et al.*, 2004). Segundo os dados disponíveis não se encontrou associação entre infecção por *S. aureus* ou coliformes e as TBCt dada a baixa prevalência nas infecções intramamárias encontradas nesses estudos (Koop *et al.*, 2010a).

**Parte II**  
**TRABALHO EXPERIMENTAL**

#### **4. Objetivos**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre as contagens de células somáticas no leite do tanque em efectivos de cabras de raça Serrana e os parâmetros de gordura, de proteína, de lactose e as contagens bacterianas totais.

#### **5. Matérias e Métodos**

No âmbito do contraste leiteiro realizado pela LEICRAS, de Outubro de 2014 a Setembro de 2015, colheram-se 1.294 amostras de leite do tanque de 46 explorações de rebanhos de cabras da raça Serrana (Mirandela-Portugal). Em cada rebanho, semanalmente ou mensalmente, foi colhida uma amostra de 45 ml de leite do tanque para um recipiente estéril e adicionou-se 4 gotas (160  $\mu$ L) de azida de sódio (azidiol; Panreac Quimica SA, Barcelona, Espanha) como conservante, procedendo-se posteriormente à homogeneização da amostra (Barcina *et al.*, 1987).

As amostras foram conservadas em condições de refrigeração (4°C) e entregues ao laboratório da Associação Interprofissional do Leite e Lacticínios (ALIP) até 24 horas após a sua colheita para realização das análises.

A CCS foi feita pelo método fluoro-optoelectrónico (FC Fossomatic <sup>TM</sup>; Foss Instruments, Hillerød, Dinamarca), a 40°C, baseado na coloração do ADN das células somáticas com brometo de etídio (Sanchez *et al.*, 2005).

A percentagem de gordura, proteína e lactose foram analisados pelo método modificado por Fourier de espectroscopia de infravermelho (MilkoScan 6000; Foss Instruments, Hillerød, Dinamarca) descrito por Šustová *et al.* (2007). A contagem total bacteriana foi realizada por citometria de fluxo (BactoScan <sup>TM</sup> FC; Foss Instruments) (Blowey & Edmondson, 2010).

##### **5.1. Análise estatística**

Os valores das CCS pelo método fluoro-optoelectrónico (variável dependente) foram transformados no seu logaritmo natural (base e) de forma a obter uma distribuição normal dos dados antes da análise estatística. Os dados de CCS são apresentados como médias geométricas (i.e. anti-logaritmo da média aritmética dos logaritmos dos números de CCS) e em médias aritméticas.

As relações entre as diferentes provas foram analisadas através da utilização da correlação linear de Pearson e da regressão linear simples.

Para demonstrar associações entre os parâmetros descontínuo das amostras utilizou-se a prova do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e, para analisar diferenças entre variáveis contínuas, recorreu-se à análise de variância.

Na análise das relações entre as CCS e as proteínas totais, o teor de gordura, a lactose e a contagens bacterianas totais utilizou-se o seguinte modelo linear misto:

$$Y_{ijlm} = \mu + P_i + G_j + L_l + B_m + \varepsilon$$

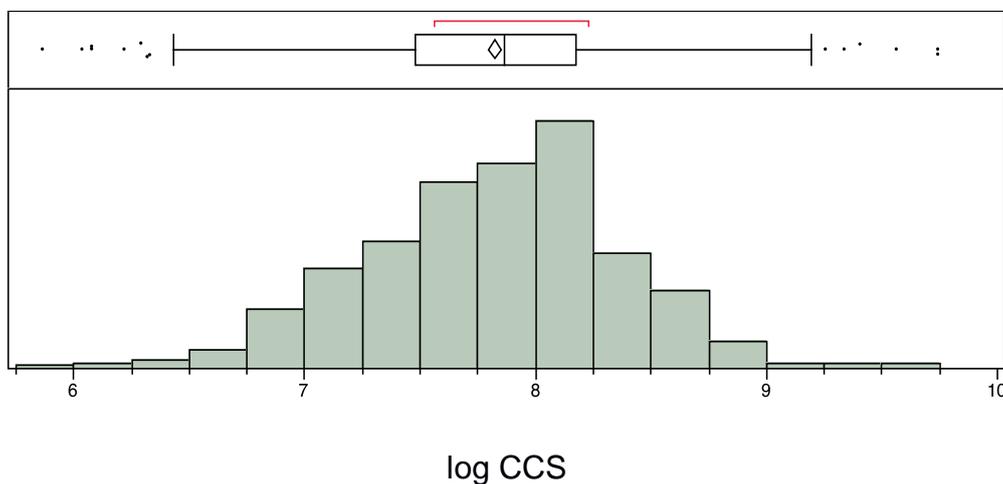
Onde  $Y_{ijlm}$  é a observação (i.e. logCCS),  $\mu$  é a média geral,  $P_i$  é o efeito fixo da  $i$  proteína total,  $G_j$  é o efeito fixo do  $j$  teor de gordura,  $L_l$  é o efeito fixo da  $l$  de lactose,  $B$  é o efeito fixo  $m$  de contagens bacterianas totais e por fim  $\varepsilon$  é o efeito aleatório do erro residual da estrutura de covariância.

Na análise estatística foi utilizado o programa de estatística JMP 9 (SAS Institute, EUA).

## 6. Resultado e Discussão

### 6.1. Distribuição da CCS do leite de tanque

A figura 4 mostra a distribuição da CCS das amostras analisadas (n=1.294):



**Figura 4** – Distribuição das contagens de células somáticas (n=1.294).

No primeiro quartil (Tabela 1) encontram-se amostras com CCS até  $1.770 \times 10^3$  células/ml. A mediana das amostras de tanque analisadas é de  $2.611 \times 10^3$  células/ml. Menos de 10% das amostras apresentaram valores inferiores a  $1.000 \times 10^3$  células/ml.

**Tabela 1** – Distribuição das contagens de células somáticas (n=1.294).

		logCCS	CCS (x $10^3$ células/ml)
100,00%	<b>Valor máximo</b>	9,74	17.060
75,00%	<b>Quartil</b>	8,18	3.560
50,00%	<b>Mediana</b>	7,87	2.611
25,00%	<b>Quartil</b>	7,48	1.770
10,00%		7,08	1.191
0,00%	<b>Valor mínimo</b>	5,87	353

A média geométrica da CCS das amostras de tanque analisadas (n=1.294) foi de  $2.495 \pm 2$  células/ml (Tabela 2).

**Tabela 2** – Distribuição das contagens de células somáticas (n=1.294).

N	Média Geométrica ± Desvio padrão	Intervalo de Confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo
1.294	2.495±2	2.422	2.569

Os valores de CCS no tanque foram de uma forma geral muito elevados, superiores aos referidos em estudos anteriormente realizados noutros países (Koop *et al.*, 2012c). Apesar de não estarem estabelecidos limites legais na União Europeia para as CCS no tanque de leite de cabra, estes valores, na generalidade das explorações analisadas, ultrapassam em muito as recomendações de  $1.500 \times 10^3$  células/ml feitas pelo Comité Científico do International Symposium: somatic cells and milk of small ruminants (Contreras *et al.*, 1997a), que é também o actual limite estabelecido pela FDA nos Estados Unidos pela “Pasteurized Milk Ordinance” (PHS/FDA, 2011). Segundo os dados apresentados menos de 10% das explorações cumpriam os critérios que pontualmente são exigidos pela indústria em Portugal:  $1.000 \times 10^3$  células/ml, baseado no limite de CCS regulamentado até 2009 nos Estados Unidos (Ruegg, 2011) e apenas 10% das explorações cumpriram os  $1.200 \times 10^3$  células/ml, baseado na melhor classificação para pagamento pela qualidade do leite na Noruega (Tine, 2013; Skeie, 2014).

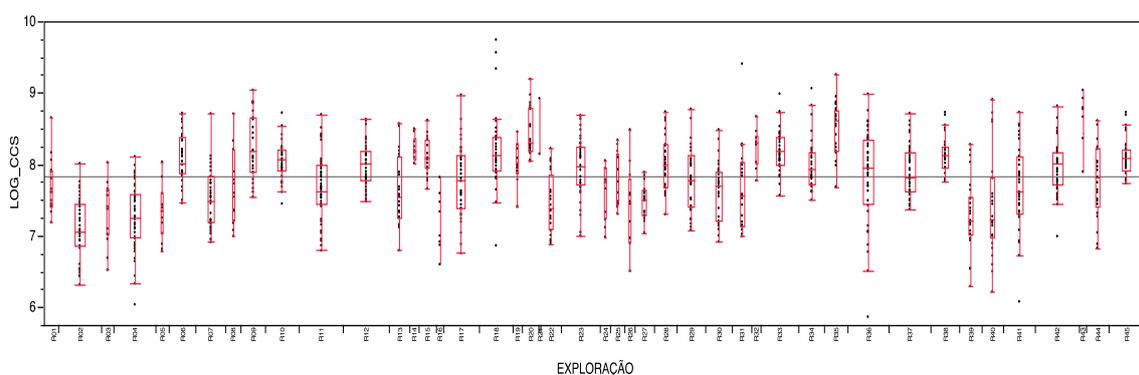
Estes dados podem levantar questões quanto à qualidade microbiológica do leite de cabra oriundo destas explorações, como será discutido mais à frente neste trabalho. Mas também quanto à aplicação tecnológica do leite de cabra para a produção de queijo uma vez que Jiménez - Granado *et al.* (2012c) estabeleceram o limiar de CCSi  $<1.300 \times 10^3$  células/ml como um alvo para manter a qualidade bromatológica (i.e gordura e proteína) no leite de caprinos de raça Florida. O que reforça a pertinência do presente estudo e, também, a compreensão da relação entre contagens de células somáticas do tanque e parâmetros de qualidade do leite de cabra Serrana.

Para essa compreensão importa relembrar que, para alguns autores, as CCS no tanque de leite de cabra apenas estão associadas com a prevalência de infecções intramamárias no início da lactação (McDougall *et al.*, 2014). Inclusivamente o aumento das CCS no tanque com o aumento simultâneo da qualidade bacteriológica foi associado à intensificação da produção e aumento da produção de leite por animal (Pirisi *et al.*, 2007). As variações mensais de forma relativamente regulares ao longo do ano (Droke *et al.*, 1993; De Crémoux *et al.*, 1997; Koop *et al.*, 2009) foram em

vários estudos associadas à fase de lactação e às variações na produção de leite (ex. menor produção maior CCS devido ao factor concentração) (De Crémoux *et al.*, 1997; Koop *et al.*, 2009).

Deste modo, face aos dados encontrados importa perceber em futuros estudos os factores que influenciam a dinâmica das CCS no leite de tanque nas explorações de caprinos de raça Serrana, tendo em atenção os factores infecciosos e não infecciosos (paridade, fase de lactação, nível de produção, número de cabritos amamentando ou não, tipo e frequência de ordenha, estro, etc.).

A figura 5 ilustra a distribuição das amostras (n=1.294) por exploração (n=46); 39,6% da variância do logCCS do leite de tanque pode ser explicada pelo factor “exploração” ( $R^2= 0,396$ ;  $p<0,0001$ ).



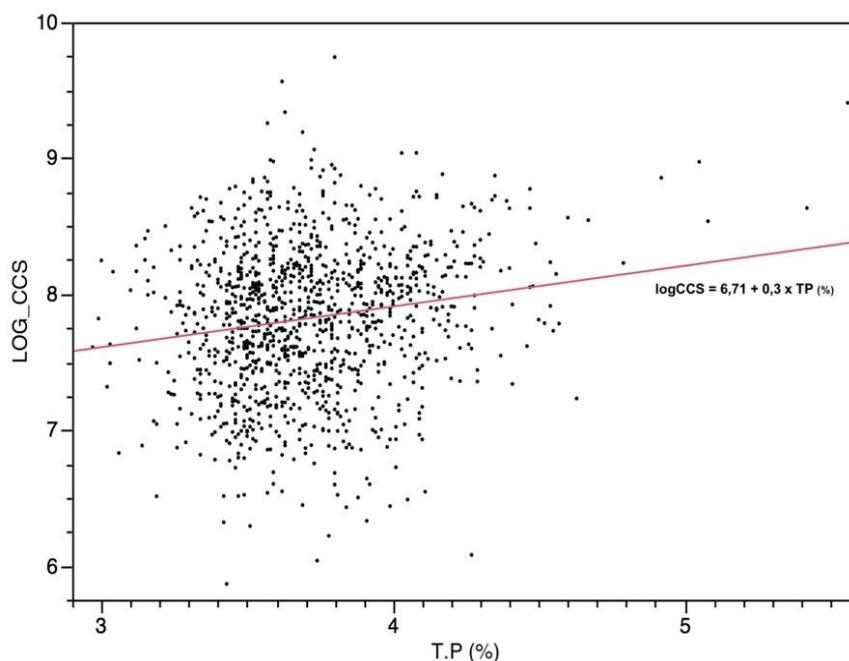
**Figura 5** – Contagens de células somáticas por exploração (n=1.294).

Isto pode precisamente ser atribuído ao facto de existirem um grande número de factores que influenciam as CCS no leite de cabra e esses factores variarem de fase de lactação exploração para exploração (Jiménez-Granado *et al.*, 2014).

Este dado é também importante na medida em que a falta de uniformização no que diz respeito ao número de recolhas feitas por exploração pode influenciar negativamente a qualidade dos dados recolhidos. Em futuros estudos deve ser tomando o mesmo número de amostras por exploração, por exemplo, segundo as colheitas que são feitas ao abrigo das normas estabelecidas pelo ICAR com colheitas de 4 em 4 semanas (sistema A4) em cada exploração.

## 6.2. Relação linear entre Proteínas Totais (TP) (%) e CCS

A figura 6 ilustra a relação entre Proteína Total (%) e a contagem de células somáticas do leite de tanque das amostras analisadas (n=1.294):



**Figura 6** – Relação entre PT (%) e CCS.

Registou-se uma associação entre as variáveis “Proteína Total” e “CCS” ( $\chi^2=35,47$ ;  $p<0,001$ ) e uma correlação positiva apesar de ser relativamente baixa ( $R^2=0,03$ ;  $r=0,17$ ;  $p<0,001$ ). Ou seja, aparentemente quanto maior for o número de células somáticas na amostra maior é a percentagem de proteínas totais tal como foi descrito por outros autores (Barrón-Bravo *et al.*, 2013).

Apesar de na bibliografia estarem descritas ligeiras diminuições associadas à IIM por agentes patogénicos maiores e a ausência de alterações na quantidade de proteína em infeções por SCN (De Crémoux *et al.*, 1996a; Baudry *et al.*, 1997; Chingwen *et al.*, 2002). Uma vez que no nosso trabalho não foi feito o isolamento microbiológico dos agentes presentes nas amostras analisadas não é possível a comparação com esses estudos.

Este aumento nos teores de proteína não deve ser considerado favorável à qualidade do leite porque é feito essencialmente à custa do aumento de imunoglobulinas e albumina (devido à inflamação) uma vez que a concentração de caseína não se altera (Contreras *et al.*, 1997a; Leitner *et al.*, 2004a).

Segundo Harmon (1994) em leites com elevadas CCS ocorre uma expressiva redução na fracção de caseína, pela sua degradação por proteases bacterianas e

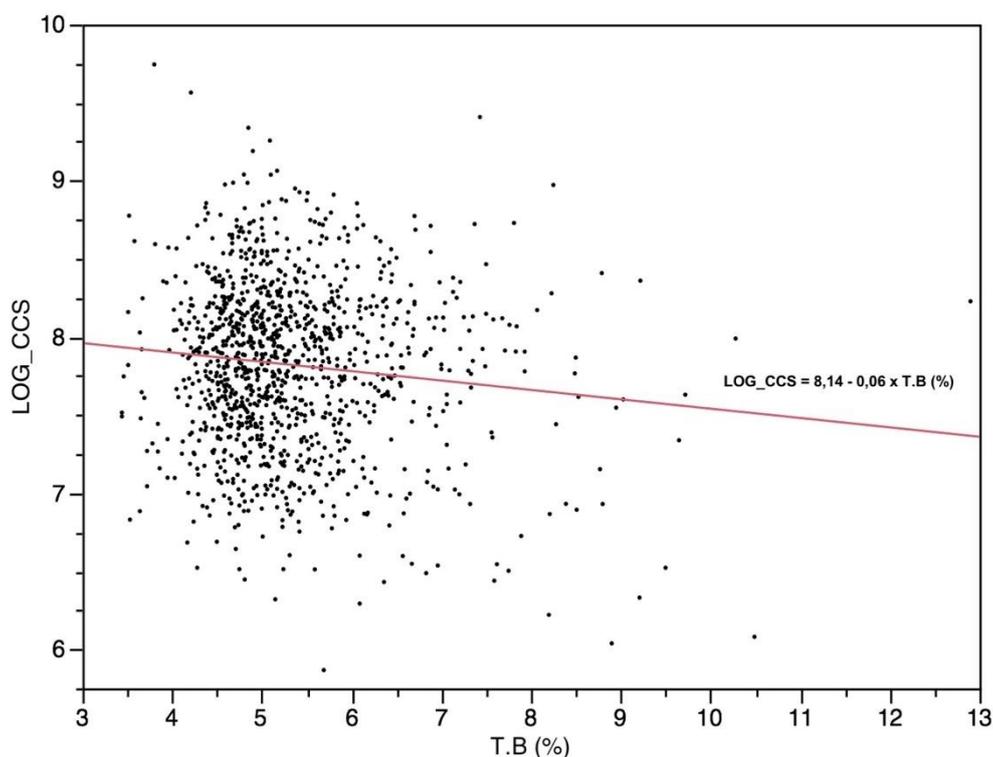
leucocitárias e pela diminuição de sua síntese devido à inflamação da glândula mamária.

Este aumento da actividade enzimática, promove uma maior activação do plasminogénio em plasmina, o que promove a proteólise, principalmente na caseína e, mais especificamente, na  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ S2-caseína, alterando a composição proteica do leite e diminuindo o rendimento no fabrico do queijo, além de resultar na acumulação de pequenos peptídeos que são responsáveis pelo desenvolvimento de um sabor amargo.

Para além da plasmina, os neutrófilos polimorfonucleares libertam outra protease, a catepsina-G, que contribui para a proteólise do leite, resultando em peptídeos similares aos libertados pela plasmina. Dessa forma, os sistemas de pagamento baseados na percentagem de proteína total, sem considerar a CCS, apresentam limitações, uma vez que o rendimento industrial do leite está associado principalmente à fracção de caseína (Considine *et al.*, 2002).

### 6.3. Relação entre percentagem do Teor de gordura (TG) e CCS.

Na figura 7 pode-se observar relação entre Teor de Gordura (%) e CCS.



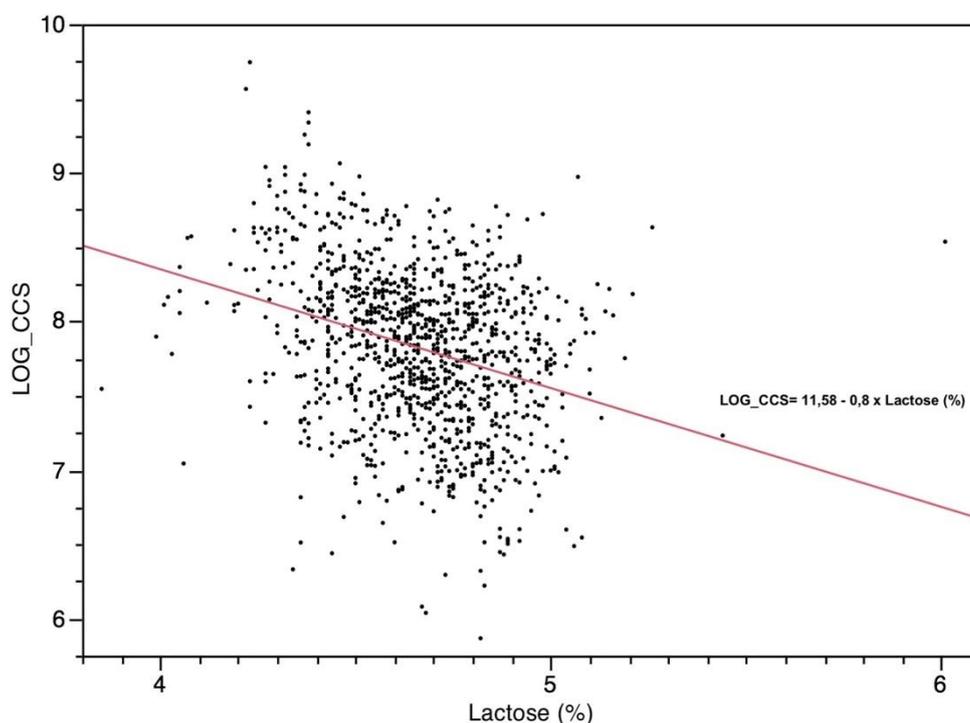
**Figura 7** – Relação entre Teor de Gordura (%) e CCS.

Observou-se uma associação entre as variáveis “Teor de Gordura” e “CCS” ( $\chi^2=15,41$ ;  $p<0,001$ ) e uma correlação negativa bastante baixa ( $R^2=0,012$ ;  $r=0,11$ ;  $p<0,001$ ).

A percentagem de gordura diminui à medida que aumenta a CCS, o que está de acordo com os resultados apresentados por outros autores (Pereira *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2000; Noro *et al.*, 2006; Barrón-Bravo *et al.*, 2013). Inclusivamente estão descritas grandes decréscimos na quantidade de gordura e o teor de gordura em infecções por agentes patogénicos maiores e diminuições mais ligeiras, nestes parâmetros, em infecções por SCN (de Crémoux *et al.*, 1996a; Baudry *et al.*, 1997; Chingwen *et al.*, 2002).

#### 6.4. Relação entre Lactose (%) e CCS

Observou-se também uma associação entre as variáveis “Lactose” e “CCS” ( $\chi^2=134,36$ ;  $p<0,001$ ; Figura 8) e uma correlação negativa baixa ( $R^2=0,094$ ;  $r=0,31$ ;  $p<0,001$ ). Tendencialmente quanto menor for o número de células somáticas na amostra maior é a percentagem de lactose.



**Figura 8** – Relação entre Lactose (%) e CCS (contagem de células somáticas).

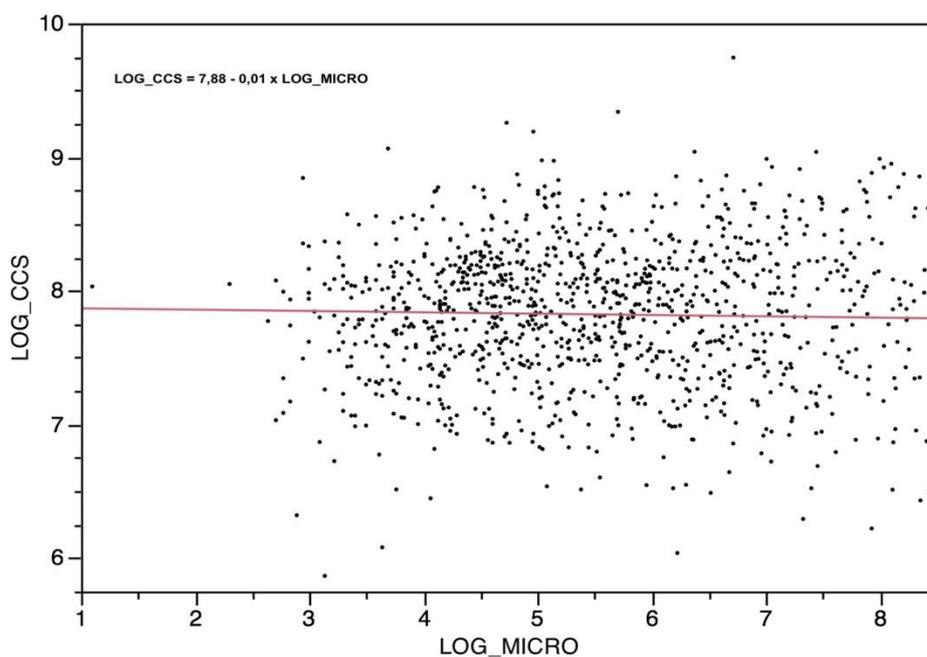
Estes resultados vão de encontro aos descritos por outros investigadores (Contreras *et al.*, 1997a; Leitner *et al.*, 2004a), inclusivamente Andrade *et al.* (2009) observaram que os teores de lactose diminuíam de forma significativa a partir das 400.000 células/ml. Esses autores defendiam que apenas a redução das CCS para

valores “fisiológicos” (200.000 células/ml) seria capaz de mitigar o efeito desta variável sobre a lactose.

A redução no teor de lactose do leite, à medida que se elevaram os valores de CCS, para Harmon (1994) e Auld (1995) pode ser resultante de distúrbios da glândula mamária, ocorrendo menor biossíntese desse constituinte ou aumento da permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue, ocasionando perda de lactose para a corrente sanguínea. Além disso, a diminuição dos teores de lactose pode ocorrer por acção directa dos agentes patogénicos presentes na glândula mamária, que utilizam esse hidrato de carbono como principal substrato (Machado, 2000; Harmon, 1994).

### 6.5. Relação entre contagens bacterianas totais (CBT) e CCS

Por sua vez, apesar de se ter observado uma associação entre as variáveis “contagens bacterianas totais”, realizada pelo BactoScan™ FC, e “CCS” pelo método fluoro-optoelectrónico ( $\chi^2= 0,97$ ;  $p<0,0001$ ; Figura 9) não se registou qualquer correlação significativa entre as variáveis ( $R^2=0,0007$ ;  $r=0,03$ ;  $p>0,05$ ).



**Figura 9** – Relação entre contagens bacterianas totais e CCS.

Nas amostras analisadas, as CCS não foram influenciadas pelas contagens bacterianas totais. Estes valores são diferentes dos encontrados por outros autores (Park e Humphrey, 1986; Tirard-Collet *et al.*, 1991; Zeng e Escobar, 1996; Raynal-Ljutovac *et al.*, 2007), em que os coeficientes de correlação encontrados, apesar de não serem muito elevados, foram em média de 0,4. A variação das CCS no tanque e

das CBT correspondentes pode ser explicada em parte pelas infecções intramamárias, mas também pelo fenômeno de diluição/concentração que depende da fase de lactação (Koop *et al.*, 2009).

Para Koop *et al.* (2010a) os estafilococos totais estão correlacionados com as CCS no tanque, de modo que um aumento de uma unidade logarítmica corresponde ao aumento de  $100 \times 10^3$  células/ml. Para estes autores, apesar das elevadas CCS individuais encontradas durante uma infecção por *S. aureus*, não foi possível encontrar uma correlação significativa entre estas, as contagens deste agente e as CCS no tanque, dada a sua baixa prevalência nas infecções intramamárias.

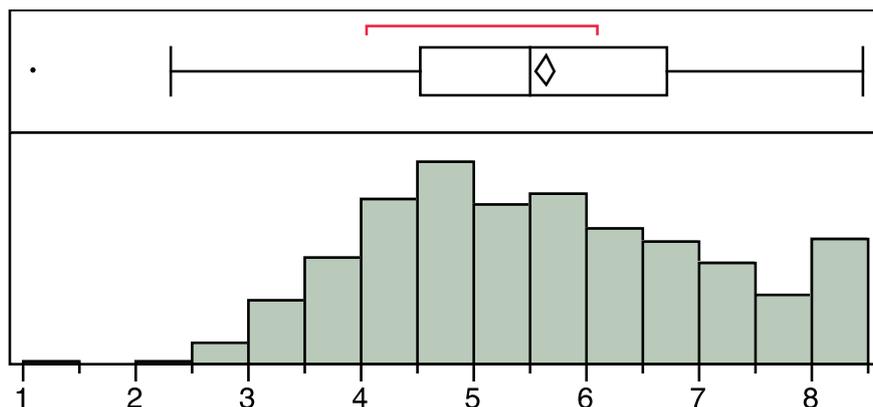
Outros agentes patogênicos maiores, como os estreptococos e micoplasmas também podem ser associados a aumentos significativos das CCS no tanque aparente. Inclusivamente não se encontraram diferenças significativas nas CCS no tanque entre explorações cronicamente infectadas por *Mycoplasma spp.* e aquelas onde ocorrem surtos da doença (Corrales *et al.*, 2004).

Os coliformes, habitualmente não estão correlacionados nem com as CBT nem com as CCS no tanque, o que pode ser explicado pelas diferenças entre explorações e pela sua baixa percentagem na flora total, cerca de 1% (Koop *et al.*, 2010a).

É importante em estudos futuros, na raça Serrana, incluir o diagnóstico de agentes importantes de mastite em caprinos como os micoplasmas e os lentivírus dos pequenos ruminantes. Pensamos que a inclusão do diagnóstico etiológico (microbiológico) dos agentes presentes nas explorações poderá ajudar a compreender melhor as CCS no tanque.

O BactoScan FC<sup>®</sup> tem demonstrado bons parâmetros de validade, mas obviamente não substitui o diagnóstico etiológico. Com o BactoScan FC<sup>®</sup> as contagens bacterianas totais (CBT) estão altamente correlacionadas com o método de referência (cultura bacteriana), o coeficiente de correlação (repetibilidade) entre duas amostras pareadas é de 0,99, e a reprodutibilidade é excelente (Tirard-Collet *et al.*, 1991). Para Ninane *et al.* (2000) a relação entre as bactérias contadas pelo aparelho (impulsos/ml) e o método de referência (em UFC/ml) é linear.

A figura 10 mostra a distribuição das contagens bacterianas totais das amostras analisadas (n=1.294):



**Figura 10** – Distribuição contagens bacterianas totais (n=1.294).

No primeiro quartil (Tabela 3) encontram-se amostras com contagens bacterianas totais até  $92 \times 10^3$  células/ml. A mediana das amostras de tanque analisadas é de  $246 \times 10^3$  células/ml e 75% das amostras apresentaram valores inferiores a  $824 \times 10^3$  células/ml.

**Tabela 3** – Distribuição das contagens bacterianas totais (CBT; n=1.294).

		Log_CBT	CBT (x $10^3$ células/ml)
100,00%	<b>Valor máximo</b>	8,46	4.707
75,00%	<b>Quartil</b>	6,71	824
50,00%	<b>Mediana</b>	5,51	246
25,00%	<b>Quartil</b>	4,52	92
10,00%		3,76	43
0,00%	<b>Valor mínimo</b>	1,10	3

A média geométrica das contagens bacterianas totais das amostras de tanque analisadas (n=1.294) foi de  $281 \pm 4$  células/ml (Tabela 4).

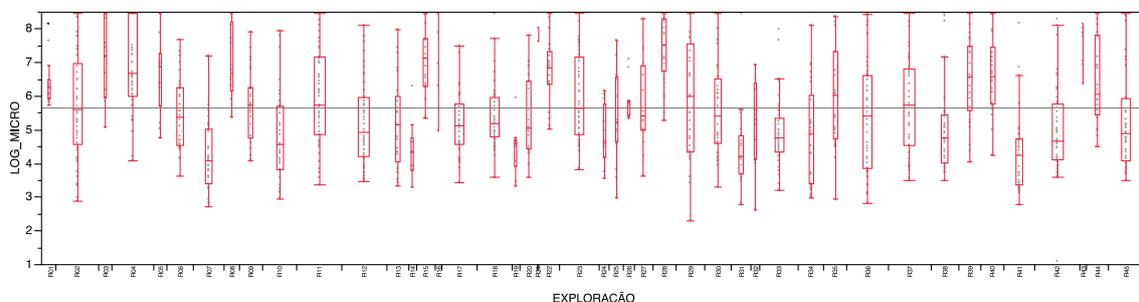
**Tabela 4** – Distribuição das contagens de células somáticas (n=1.294).

N	Média Geométrica ± Desvio padrão	Intervalo de Confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo
1.294	$281 \pm 4$	259	304

Estes dados reforçam a necessidade de se compreenderem quais os factores de natureza não infecciosa que interferem significativamente com a dinâmica de CCS no leite do tanque nas explorações de raça caprina Serrana, uma vez que as elevadas

contagens por si só podem levar à percepção que a qualidade microbiológica do leite não é adequada, o que segundo os dados disponíveis não se verifica.

A figura 11 ilustra a distribuição das contagens bacterianas totais (n=1.294) por exploração (n=46); 28,9% da variância do log CBT do leite de tanque pode ser explicada pelo factor “exploração” (p<0,0001).



**Figura 11** – Contagens bacterianas totais por exploração (n=1.294).

As contagens bacterianas totais do leite de tanque (TBCt) variam muito de exploração para exploração. Dados semelhantes já tinham sido descritos por Koop *et al.* (2009) com o acompanhamento de 300 explorações durante 3 anos que permitiu concluir que 26% da variância do  $\log_{10}$  TBCt é explicada pelo factor “exploração” (Koop *et al.*, 2009). O número de animais por exploração é um dos factores apontados para explicar esta observação. Com efeito, Muehlherr *et al.* (2003) registaram Standard Plate Count no leite do tanque (SPCt) e CCSt mais elevadas nas explorações de maior dimensão. Também foram registadas, por outros autores, em pequenos ruminantes, diferenças nas SPCt em função da dimensão da exploração (Zweifel *et al.*, 2005). Além disso, o tipo de agentes isolados em cada exploração deve ser tomado em consideração (Koop *et al.*, 2010). Estes dados devem ser tidos em consideração em estudos futuros na raça Serrana.

## 6.6. Equação de regressão linear múltipla

O modelo testado pode ser resumido pela seguinte equação:

$$\log\text{CCS} = 10,23 - (0,15 \times \text{“Teor de gordura”}) + (0,83 \times \text{“Proteína Total”}) - (0,96 \times \text{Lactose}) - (0,27 \times \text{contagens bacterianas totais})$$

É necessário, no entanto, salientar que este modelo apenas explica 22% da variância das CCS ( $r = 0,47$ ;  $R^2 = 0,22$ ;  $P < 0,001$ ), tratando-se este estudo de uma abordagem inicial à compreensão da dinâmica das CCS no tanque destas explorações.

## 7. Conclusões

As percentagens de gordura e de lactose no leite de tanque das explorações analisadas correlacionaram-se negativamente com as CCS. Por sua vez a percentagem de proteína correlacionou-se positivamente com as CCS. Apesar de existirem relações entre estas variáveis as correlações encontradas são baixas.

Relativamente à relação entre contagens bacterianas totais e as CCS no leite de tanque não foi encontrada qualquer correlação. O “fator exploração” explicou 28,9% da variância das contagens bacterianas totais e 38,6% da variância das CCS.

Estes dados salientam a importância de se compreender a dinâmica das CCS no leite de tanque nas cabras de raça Serrana. É por isso necessário em trabalhos futuros investigar os factores infecciosos e não infecciosos responsáveis pela variação das contagens nesta raça.

Embora a UE ainda não tenha estabelecido um limite legal para as CCS no leite de tanque das explorações de caprino, de acordo com as regras dos EUA, menos de 25% das amostras de leite seriam admitidas no mercado por terem contagens médias superiores a  $1.500 \times 10^3$  células/ml. Apesar de a qualidade microbiológica revelada pelas contagens bacterianas totais ser genericamente adequada, estes dados devem conduzir a uma reflexão por parte dos operadores económicos e à instituição nas explorações de programas de boas práticas de ordenha e de controlo das mastites, de forma a melhorar a qualidade do leite e dos seus produtos, defender a saúde pública e melhorar a económica das explorações.

## Referências bibliográficas

1. Addo, P., Chineme, C, e Eid, F. 1980. Incidence and importance of chronic mastitis in Nigerian goats. *Buli. Anim. Health Prod. Afr.*, 28:225-231.
2. Addo, P. 1984. Chronic caprine mastitis: clinical, microbiological and pathological findings in spontaneously occurring cases in Nigerian goats. *Int. Goat Sheep Rés.* 2:266-273.
3. Almendra, L., 1990. Estudo Comparativo de Três Épocas Tradicionais de Produção de Leite de Origem Caprina Serrana em Trás-os-Montes, DRATM, Mirandela.
4. Alonso, L., Fontecha J. Lozada, L. Fraga, M. & Juárez M. 1999. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched chain and trans fatty acids. *J. Dairy Sci.* 82:878–884.
5. Andrade, U., Hartmann, W. Masson, M. 2009. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. *ARS Vet.*, Jaboticabal, SP.v.25, n.3, 129-135.
6. Auldish, M., Coats S, Rogers G, McDowell G. 1995. Changes in the composition of milk from healthy and mastitis dairy cows during the lactation cycle. *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 35(4):427-436.
7. Barcina, Y., Ros G. Rincon, F. 1987. Azidol as a preservative for milk samples. In: *Anales de Veterinaria de Murcia.* Murcia: Universidad de Murcia. p. 65-69.
8. Barrón-Bravo, O., Gutiérrez-Chávez A., Angel-Sahagúna C, Montalob H, Shepardc L, Valencia-Posadas M. 2013. Losses in milk yield, fat and protein contents according to different levels of somatic cell count in dairy goats. *Small Ruminant Rés.* V 113 (2-3): 421-431.
9. Baudry, C., De Crémoux R, Chartier, C., Perrin G. 1997. Incidence de la concentration cellulaire du lait de chèvre sur sa production et sa composition. *Vet. Rés.* Vol. 28: 277-286.
10. Baudry, C., Mercier P, Mallereau M, Lenfant D. 2000. Evaluation de l'efficacité du post-trempage chez la chèvre. *Rev. Méd. Vét.* 11, Vol. 151, 11:1035-1040.
11. Belanger, J. 1990. Criação de Cabras. 4a edição. Mem-Martins: Publicações.
12. Bergonier, D., Lagriffoul G, Berthelot X, Barillet F, 1996. Facteurs de variation non infectieux des comptages de cellules somatiques chez les ovins et caprins laitiers. *Wageningen Pers EAAP* 77: 112-135.
13. Bergonier, D., Blanc M, Fleury P, Lagriffoul G, Barillet F, Berthelot X. 1997. Les mammites des ovins et des caprins laitiers: étiologie, épidémiologie, contrôle. *Renc. Rech. Rum.* Vol. 4: 251-260.

14. Bergonier, D., Berthelot X, Romeo M. 1998. Fréquence des différents germes responsables de mammites cliniques et subcliniques chez les petits ruminants laitiers. Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants; 130-136.
15. Bergonier, D., de Crémoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X. 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res.* Vol. 34: 689-716.
16. Bergonier, D., Berthelot X. 2008. Mycoplasmoses des petits ruminants: le syndrome de l'agatactie contagieuse. *Buli. Acad. Vét. Fr.*, Vol. 161, 2: 167- 177.
17. Berry, E., Broughan J. 2007. Use of the DeLaval cell counter (DCC) on goats' milk. *J Dairy Rés* 74(3): 345-348.
18. Blowey, R., 1999. *A Veterinary Book for Dairy Farmers*. 3th ed. Ipswich: Farming Press.
19. Blowey, R., Edmondson P. 2010. Bactoscan and total bacterial count (TBC). In: *Mastitis control in dairy herds* (eds. by Blowey R. & Edmondson P.), pp. 171-183. Shepton Veterinary Group, UK.
20. Boutnaud, M., Jammes, H. 2002. Potential uses of milk epithelial cells. *Reprod. Nutr. Dev.* 42:133-147 INRA, EDP Sciences.
21. Bragulla, H., Budrais K, Mülling C, Reese S, König H. 2012. Tegumento común (Integumentum commune), in: König, hl. Liebich, hl. (Eds.), *Anatomia de Los Animales Domésticos, Oganos, Sistema Circulatorio Y Sistema Nervioso*. Editorial Medica Panamericana, Madrid, pp. 325-378.
22. Brenaut, P., Lefèvre L, Rau A, Laloë D, Pisoni G, Moroni P, Bevilacqua C, Martin P. 2014. Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Vet Rés.* Feb 12:45:16.
23. Brozos, C., Saratsis P., Boscós C., Kyriakis, S., & Tsakalof, P. 1998. Effects of long-term recombinant bovine somatotropin (bST) administration on milk yield, milk composition and mammary gland health of dairy ewes. *Small Rum. Res.* 29:113–120.
24. Chandan, R., Attaie R. & Shahani K. 1992. Nutritional aspects of goat milk and its products. In: *Proc. V. Intl. Conf. Goats*, vol. II: part II, New Delhi, India, p. 399.
25. Chingwen, Y., Han-Tsung W., Jih-Tay H. 2002. Relationship of somatic cell count, physical, chemical and enzymatic properties to the bacterial standard plate count in dairygoat milk. *Livestock Production Science*, 74: 63 - 77.
26. Considine, T., Geary S, Kelly A., McSweeney P. 2002. Proteolytic specificity of cathepsin G on bovine alphas 1- and beta caseins. *Food Chemistry*. 76(1):59-67.
27. Constantinescu, G. 2010. Functional anatomy of the goat, in: Solaíman, S. (Ed.), *Goat Science and Production*. Wiley-Blackwell, Iowa, USA, pp. 89-137.

28. Contreras, A., Corrales, J., Sierra, D., Marco, J. 1995. Prevalence and aetiology of non-clinical intramammary infection in Murciano-Granadina goats. *Small Rumin. Rés.* 17, 71-78.
29. Contreras A, Corrales, J., Sanchez, A., Sierra D. 1997a. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation, *J. Dairy.*
30. Contreras, A., Sanchez, A., Corrales, J., Luengo, C., Marco, J. 1997b. Concepto e importância de las mamitis caprinas. In: *Mamitis caprina I. Ovis – Aula Veterinária: Tratado de patologia y produccion ovina.* 53, 11, 31.
31. Contreras, A., Paape, M., Di Cario, A., Miller, R., Rainard, P. 1997c. Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual goats. *Journal of Dairy Science.* 80: 1113-1118.
32. Contreras, A., Sierra, D., Corrales, J., Sanchez, A., Gonzalo, C. 1998. Diagnostico Indirecto de las mamitis caprinas. In: *Mamitis caprina II. Ovis – Aula Veterinária: Tratado de patologia y produccion ovina.* 54, 25, 36.
33. Contreras, A., Paape, M., Miller R. 1999. Prevalence of subclinical intramammary infection caused by *Staphylococcus epidermidis* in a commercial dairy goat herd. *Small Rum. Rés. Vol.* 31: 203-208.
34. Contreras, A., Luengo C, Sanchez, A., Corrales, J. 2003. The role of intramammary pathogens in dairy goats. *Livest. Prod. Sci.* 79: 273–283.
35. Contreras, A., Sierra, D., Sánchez, A., Corrales, J., Marco J., Paape M., Gonzalo C. 2007. Mastitis in small ruminants. *Sma// Rum. Rés. Vol.* 68: 145-153.
36. Corrales, J., Sánchez, A., Luengo C., Poveda, J., Contreras, A. 2004. Effect of clinical contagious agalactia on the bulk tank milk somatic cell counts in Murciano-Granadina goat herds. *J. Dairy Sei.* 87, 3165- 3171.
37. Cunningham, J., Klein, B. 2008. A glândula mamária. *In: Tratado de Fisiologia veterinária. 4ª Edição.* Elsevier Editora Lda. Brasil.
38. De Crémoux, R., Poutrel, B., Berny, F., Heuchel, V. 1994. Relations entre lês numérations cellulaires du lait et lês statut infectieux de la mamelle chez la chèvre. *Renc. Rech. Rum. Vol.* 1: 139-142.
39. De Crémoux R., Berby, C., Baudry, C., Menard J. 1996. Incidence dès infections et du degré d'inflammation de la mamelle sur la production laitière chez la chèvre. *Renc. Rech. Rum. Vol.* 3, pp. 165-166.
40. De Crémoux, R., Lagriffoul, G., Bernard, J., Lautier, G., Millet, F., Berthelot, X. 1997. Situation dès comptages dès cellules somatiques du lait de brebis et de chèvres en France. *Renc. Rech. Rum. Vol.* 4: 269-272.
41. Dik, N., Koop, G., Lipman, L. 2009. The prevalence of some mastitis pathogens in bulk milk of Dutch dairy goats and the relationship with bulk milk somatic cell count

- and bulk milk standard plate count. Disponível em [dspace.library.uu.nl](https://dspace.library.uu.nl/). Utrecht University open library.
42. Direção-Geral De Pecuária, 1987. Recursos Genéticos, Raças Autóctones, Espécies Ovina e Caprina, Lisboa.
  43. Droke, E., Paape, M., Di Carlo A. 1993. Prevalence of high somatic cell counts in bulk tank goat milk. *J. Dairy Sci.* Vol. 76, 4:1035-1039.
  44. Dulin, A., Paape, M., Wergin, W., 1982. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. *Journal of Food Protection.* 45:435-439.
  45. Dulin, A., Paape, M., Berkow, S., Hamosh, M., e Hamosh, P. 1983. Comparison of total somatic cells and differential cellular composition in milk from cows, sheep, goats and humans. *Dairy Sci. Abstr.* 45:908.
  46. Dumoulin, E., Peretz, G. 1993. Qualité bactériologique du lait cru de chèvre en France. *Lait.* Vol. 73: 475-483.
  47. Dürr, J. 2004. Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite: uma oportunidade única. p. 38- 55. In: Carvalho, M.P. & Santos M.V. O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Editora UPF, Passo Fundo.
  48. EFSA. 2005. Opinion on the usefulness of somatic cell counts for safety of milk and milk derived products from goats. *EFSA Journal* 305, 1-19. Europa -América.
  49. Ferrer, O., Real, F., Acosta, B., Molina, M., 1996. Physiological cellular values in Canary (Agrupacion Caprina Canária) goat milk. En: *Somatic Cells and Milk of Small Ruminants.* (Ed: Rubino, R.). Wageningen Pers. (EAAP, 77): 81-84.
  50. Fonseca, P. 1988. Levantamento da Caprinicultura em Portugal, in II Jornadas de Caprinicultura, XXI Reunião S.P.O., Castelo Branco.
  51. Fonseca, P. Santos M.V. 2007. Estratégia para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. 2ª ed. Editora Manole, Barueri, p. 314.
  52. Foschino, R., Invernizzi, A., Barucco, R., Straditto, K. 2002. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during lactation year. *J. Dairy Res.* 69: 213-225.
  53. Gilbert, F., Fromageau, A., Poutrel, B., Lictévout, V., Dubuc-Forfait, C., Champion J. 2006. Dépistage par ELISA des mammites à *Staphylococcus aureus* chez la chèvre. *Renc. Rech. Rum.* 13, p. 447.
  54. Gonzalo, C., Martínez, J., San Primitivo, F. 1998. Significación y métodos de valoración del recuento celular en la leche de oveja. *Ovis* 56: 13-25.
  55. Gonzalo, C. 2014. Mamitis estafilocócicas en los pequeños ruminantes. Comunicação pessoal VIMCO, Zamora Julho de 2014. 1-15.

56. Goudjil, H., Fontecha, J., Luna, P., Fuente, M., Alonso, L. & Juárez, M. 2004. Quantitative characterization of unsaturated and trans fatty acids in ewe's milk fat. *Lait* 84:473–482.
57. Guégen, L. 1997. La valeur nutritionnelle minérale du lait de la chevre. In: Intérêts nutritionnelles et diététiques du lait de chevre: INRA. 67-80.
58. Guo, M., Dixon, P., Park, Y., Gilmore, J., & Kindstedt, P. 2001. Seasonal changes in the chemical composition of commingled goat milk. *J. Dairy Sci.* 84(Suppl. E):79-83.
59. Haenlein, G. 1992. Role of goat meat and milk in human nutrition. In: Anais V Int. Conf. on Goats, New Delhi, India, 2-8 March. Pre-Conference Proceedings Invited Papers, Vol. II, Part II, p. 575-580.
60. Haenlein, G. 2001. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *J. Dairy Sci.* 84: 2097–2115.
61. Haenlein, G. 2002. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. *Small Ruminant Research* 45: 163–178.
62. Haenlein, G. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Rum. Res.* 51:154-163.
63. Harmon, R. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science.* 1994;77(7):2103-2112.
64. Jiménez-Granado, R., Rodríguez-Estévez, V., Arce, C., Morantes, M., López-Farina, M., Pérez-Salas, R., Sánchez-Rodríguez, M. 2012. Relación dei recuento de células somáticas con la calidad bromatológica de la leche de cabra Florida: grasa y proteína. *Proc XXXVII Cong Na Sociedad Espanola de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, Ciudad Real, Sept 19-21. pp: 159-163.
65. Jiménez-Granado, R., Sanchez-rodriguez, M., Arce, C. 2014. Factors affecting somatic cell count in dairy goats: a review. *Spanish J. Agric. Res.* 12: 133–150.
66. Kapur, M., Singh, R. 1978. Studies on clinicaí cases of mastitis in cows, buffaloes and goats in Haryana State. *Indian Vet. J.*, 55:803-806.
67. Kehrli, M., Shuster, D. 1994. Factors Affecting Milk Somatic Cells And Their Role In Health Of The Bovine Mammary Gland. *J Dairy Sci* 1994, 77:619-627.
68. Koop, G., Nielen, M., Van-Werven, T. 2009. Bulk milk somatic cell counts are related to bulk milk total bacterial counts and several herd-level risk factors in dairy goats. *J. Dairy Sei.* Vol. 92, 9: 4355-4364.
69. Koop, G., Van-Werven T, Schuiling, H., Nielen, M. 2010. The effect of subclinical mastitis on milk yield in dairy goats. *Journal of Dairy Science* 93: 5809-17.
70. Koop, G., Van-Werven, T., Toft, N., Nielen, M. 2011. Estimating test characteristics of somatic cell count to detect *Staphylococcus aureus*-infected dairy goats using latent class analysis. *J Dairy Sei* 94(6): 2902-2911.

71. Koop, G., De Vtiegher, S., De Visscher, A., Supre, K., Haesebrouck, F., Nielsen, M., Van-Werven, T. 2012a. Differences between coagulase-negative Staphylococcus species in persistence and in effect on somatic cell count and milk yield in dairy goats. *J. Dairy Sci.* 95 (9): 5075-5084.
72. Koop, G., Nielen, M., Van-Werven, T, 2012b. Diagnostic tools to monitor udder health in dairy goats. *Vet. Q.* 32, 37-44.
73. Koop, G. 2012c. Udder health in dairy goats. PhD Dissertation. Utrecht University. pp: 1-196.
74. Lê Maréchal, C., Thiéry, R., Vautor, E., Le Loir, Y. 2011. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products. *Dairy Sci. & Technol.* 91:247–282.
75. Leboeuf, A., Belanger, D. 2003. Epidémiologie de l'arthrite-encéphalite caprine: revue des connaissances. *Méd. Vét. Québec.* Vol. 33, 1 et 2: 39-42.
76. Leitner, G., Merlin, N., Silanikova. 2004. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goat. *J Dairy Sci.* 87:1719-1726.
77. Leitner, G., Merin, K., Blum, S., Rivas, A., Silanikove, N. 2012. Effects of intramammary bacterial infection with coagulase negative staphylococci and stage of lactation on shedding of epithelial cells and infiltration of leukocytes into milk: comparison among cows, goats and sheep. *Vet Immunol Immunopathol.* Jun 30; 147(3-4):202-10.
78. Lodi, R. 1993. Qualité bactériologique du lait cru de chèvre en Italie. *Lait.* Vol. 73: 473-474.
79. Luengo, C., Sanchez, A, Corrales, J., Fernandez. E., Contreras, A. 2004. Influence of intramammary infection and non-infection factors on somatic cell counts in dairy goats. *Journal of Dairy Research.* 71: 169-174.
80. Macedo, L., Damasceno, J., Martins, E., Macedo V., Santos, G., Falcão, A., & Caldas, N. 2003. Substituição do farelo de soja pela farinha de glúten de milho na alimentação de cabras leiteiras. *Rev. Bras. Zootec.* 32:992-1001.
81. Machado, P., Pereira, A., Ribeiro, S., Adrian. 2000. Composição do Leite de Tanques de Rebanhos Brasileiros Distribuídos Segundo sua Contagem de Células Somáticas. *Rev. Bras. Zootec.* vol.29 no.6 Viçosa Nov./Dec. 2000.
82. Marco, J., Jacquin, C., Esnal, A., Jiménez, R., Sánchez, M., Gonzalo, C. 2012. Los programas de mejora de la calidad e la leche: Su impacto en la rentabilidad de las explotaciones de caprino lechero. *Tierras Caprino* 2: 8-19.
83. Marnet, P. 1998. Physiologie de l'éjection du lait et importance pour la lactation. *Renc. Rech. Ruminants,* 5: 313-320.
84. Matthews, J. 2009. Diseases of the goat, 3rd edition. Wiley-Blackwell. 213-235.

85. McDougall, S., Murdough, P., Pankey, W., Delaney, C., Barlow, J., Scruton, D. 2001. Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Rumin. Res.* 40:245-254.
86. McDougall, S., Prosser, C. 2010. Prevalence and incidence of intramammary infection in lactating dairy goats. In: Hillerton JE (ed). *Mastitis Research into Practice: Proceedings of the 5th International Mastitis Conference*. VetLearn, Wellington, NZ. Pp 235-40.
87. McDougall, S., Malcolm, D., Prosser, C. 2014. Prevalence and incidence of intramammary infections in lactating dairy goats. *N Z Vet J.* May;62(3):136-45.
88. Moioli, B., Pilla, F., & Tripaldi, C. 1998. Detection of milk protein genetic polymorphisms in order to improve dairy traits in sheep and goats: a review. *Small Rum. Res.* 27:185-195.
89. Moroni, P., Pisoni, G., Antonini, M., Ruffo, G., Carli, S., Varisco, G., Boettcher, P., 2005. Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. *J. Dairy Sci.* 88, 1694-1704.
90. Muehlherr, J., Zweifel, C., Corti, S., Blanco, J., Stephan, R., 2003. Microbiological quality of raw goats and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J. DairySci.* Vol. 86, 12: 3849-3856.
91. Neuveu, C., Riaublanc, A., Miranda, G., Chich, J, Martin, P. 2002. Is the apocrine milk secretion process observed in the goat species rooted in perturbation of intracellular transport mechanism induced by defective alleles at the alpha(s1)-Cn locus. *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 142-172.
92. Ninane, V., Reub, K., Ogerc, R., Reybroeck, W., Guyota, A. 2000. Evaluation du Bactoscan FC pour la numération des bactéries du lait cru. *Lait.* Vol. 80: 527-538.
93. Olechnowicz, J., Jaskowski, J. 2012. Somatic cell count and total bacteria count in bulk tank milk of small ruminants. *Slov Vet Res* 2012; 49 (1): 13-18
94. Oliver, S., Gonzalez, R., Hogan, J, Jayarao, B., Owens, W. 2004. *Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality*. National Mastitis Council, Verona, WI, USA.
95. Ordóñez, J. 2005. *Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal*. v.2. Editora Artmed, Porto Alegre, p.279.
96. Paape, M., Capuco, A. 1997. Cellular defence mechanisms in the udder and lactation of goats. *Journal of Dairy Science* 84:E237-E244.
97. Paape, M., Poutrel, B., Contreras, A., Marco, J., Capuco, A. 2001. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. *J. Dairy Sci.* 84: 237–244.

98. Paape, M., Wiggans, G., Bannerman, D., Thomas, D., Sanders, A., Contreras, A., Moroni, P., Miller, R. 2007. Monitoring goat and sheep milksomatic cell counts. *Small Ruminant Research* 68 1-2:114-125.
99. Park, Y. 1986. Bacterial cell counts in goat milk and their correlations with somatic cell counts, percent fat, and protein. *J. Dairy Sei.* Vol. 69, 1:32-37.
100. Park, Y. 1994. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Rés.* 14:151-159.
101. Park, Y., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Sm. Rum. Res.* 68:88-113.
102. Park, Y., Haenlein, G. 2010. Milk production. *In: Goat science anda production.* Sandra G. Solaiman, Ed., Wiley-Blackwell, Iowa, pp275-292.
103. Paterna, A., Contreras, A., Gómez-Martín, A., Amores, J., Tatay-Dualde, J., Pratsvan, M., Corrales, J., Sánchez, A., De la Fe, C. 2014. The diagnosis of mastitis and contagious agalactia in dairy goats. *Small Ruminant Research* 121:36-41
104. Pereira, A., Silva, L., Molon, L., Machado, P., Barancelli, G. 1999. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I – Gordura e Proteína. *Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science.* 36(3):121-124.
105. Pereira, F. 2012. Estimativa dos componentes de variância da produção de leite diária da cabra Serrana - Ecótipo Transmontano. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologias Animais.
106. Perrin, G., Baudry, C. 1993. Numérations cellulaires du lait de chèvre. *Le Lait* 73:489-497.
107. Persson, Y. 2011. Direct and indirect measurement of somatic cell count as indicator of intramammary infection in dairy goats. *Acta Vet Scand* 53: 15.
108. Persson, Y., Torben, L., Nyman, A. 2014. Variation in udder health indicators at different stages of lactation in goats with no udder infection *Small Ruminant Research* 116(2014)51-56.
109. Pirisi, A., Lauret, A., Duboeuf, J. 2007. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Sma// Rum. Rés.* 68: 167-178.
110. Plummer P. 2012. Diseases of the mammary gland. *In: Pugh D, Baird A. Sheep and Goat Medicine.* Missouri: Elsevier Saunders. 442–465.
111. Poutrel, B., Lerondelle, C. 1983. Cell content of goat milk: Califórnia Mastitis Test, Coulter Counter, and Fossomatic for predicting half infection. *J. Dairy Sc;* Vol. 66, 12:2275-2279.
112. Poutrel, B., De Crémoux, R., Pillet, R., Heuchel, V., Ducelliez, M. 1996. Relations entre statut infectieux des mamelles et numérations cellulaires du lait de

- chèvre. In Rubino, R. (Ed.). Pro-ceedings of somatic cells and milk of small ruminants. International Symposium, Bella, Italy, Wageningen Pers, Netherlands.
113. Public Health Service/Food and Drug Administration (PHS/FDA). 2011. Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance, Including Provisions from the Grade "A" Condensed and Dry Milk Products and Condensed and Dry Whey--Supplement I to the Grade "A". Pasteurized Milk Ordinance.382 pp.;
114. Quintas, H. 2015. Avaliação dos principais métodos de detecção de mastites subclínicas em caprinos de raça Serrana. Dissertação da Tese Doutorado UTAD. Vila Real 6-11.
115. Raynal-Ljutovac, K., Pirisi, A., De Crémoux, R., Gonzalo, C. 2007. Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Rumin. Res.* 68: 126–144.
116. Razin, S., Freundt, E. 1984. The mycoplasmas. In: Krieg, N. R., Holt, J. G. (Eds.), *Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA, pp. 740-793.
117. Remeuf, F., & Lenoir, J. 1986. Relationship between the physicochemical characteristics of goat's milk and its rennetability. *Intl. Dairy Bull.* 202:68.
118. Rovai, M., Caja, G., Salama, A., Jubert, A., Lázaro, B., Lázaro, M., Leitner, G. 2014. Identifying the major bacteria causing intramammary infections in individual milk samples of sheep and goats using traditional bacteria culturing and realtime polymerase chain reaction. *J. Dairy Sei.* 97:5393-5400
119. Ruegg, P. 2011. Mastitis in small ruminants. Communication presented: Annual Conf. Am. Assoc. Bovine Practitioners, Small Ruminant Session: Sept 22-25, St. Louis MO.
120. Salama, A. 2005. Modifying the lactation curve in dairy goats: effects of milking frequency, dry period, and kidding interval. Ph.D. Thesis. Barcelona. Department de ciència animal I deis aliments. Universidade autónoma de Barcelona. Acedido em Nov, 19, 2008. Online:<http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/5668/aaks1de1.pdf?sequence=1>, acedido a 1 de Dezembro de 2015.
121. Sánchez, A., Contreras, A., Corrales, J., S. 1997. Influencia de la infección intramamaria clínica en la producción láctea de rebaños de cabras Murciana-Granadina. *Medicina Veterinaria*, 14(5):290-297.
122. Sánchez, A., Corrales, J., Marco, J. y Contreras, A. 1998. Aplicación del recuento de células somáticas para el control de las mastitis caprinas. *Ovis (Mamitis caprina II)* 54:37-52.

123. Sánchez, A., Corrales, J., Luengo, C., Contreras, A. 1999. Intramammary pathogens and somatic cell counts in dairy goats. *Milking and Milk Production of Dairy Sheep and Goats*, vol. 95. EAAP Publication, pp. 124-129.
124. Sánchez, A., Sierra, D., Corrales, J., Morales, C., Contreras, A., & Gonzalo, C. 2005. Influence of storage and preservation on somatic cell count and composition of goat milk. *Journal of Dairy Science* 88, 3095-100.
125. Serieys, F., Auclair, J., Poutrel, B. 1987. Influence des infections mammaires sur la composition chimique du lait. In: *Le lait, matière première de l'industrie laitière*. INRA-CEPIC
126. Silanikove, N., Merin, U., Shapiro, F., Leitner, G. 2014. Subclinical mastitis in goats is associated with upregulation of nitric oxide-derived oxidative stress that causes reduction of milk antioxidative properties and impairment of its quality. *J Dairy Sci.* 2014 Jun; 97(6):3449-55.
127. Silva, P. 1997. Leite: aspectos de composição e propriedades. *Revista Química Nova na Escola* (6):3-5.
128. Silva, P. 2005. Trabalho de Conclusão do Curso de Medicina Veterinária. Área de Sanidade em Bovinicultura Leiteira. Faculdades Integradas, Departamento de Medicina Veterinária, Brasília.
129. Sisson, S., Grossman, J. 1986. Anatomia dos animais domésticos. (5ª edição). Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. Volume 1. *Small Rumin Rés* 107(2): 65-75.
130. Skeie, S. 2014. Quality aspects of goat milk for cheese production in Norway: A review. *Small Ruminant Rés*. Smith MC, Sherman DM. 2009. Mammary gland and milk production. In: *Goat Medicine*, 2nd edition. Wiley-Blackwell. 647-679.
131. Smith, M., Sherman, D. 2009. Mammary gland and milk production. In: *Goat Medicine*, 2nd edition. Wiley-Blackwell. 647-679.
132. Sordillo, L., Streicher, K. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland, Biology and Neoplasia* 7.
133. Souza, F., Blagitz, M., Penna, C., Della Libera, A., Heinemann, M., Cerqueira M. 2012. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe *Small Rumin. Res.* 107: 65–75.
134. Stehling, R., Vargas, O., Santos, E., Duarte, R. 1986. Evolution of caprine mastitis induced with staphylococcal and streptococcal enterotoxin. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 38 (5), 701-717.
135. Šustová, K., Růžičková, J., & Kuchtík, J. 2007. Application of FT near spectroscopy for determination of true protein and casein in milk. *Czech Journal of Animal Science* 52, 284–91. Washington (DC): National Academies Press (US).

136. Tavares, M. 2003. Influência da quantidade de células somáticas na produção e composição química do leite. Relatório de Trabalho de Fim de Curso de Engenharia das Ciências Agrárias - Ramo Animal, Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco.
137. Tine. 2013. Tines regelverk om bedømmelse og betaling avleverandermelk etter kvalitet (The Regulations by TINE for Evaluation and Payment of Milk Quality According to Quality). Em linha: <https://medlem.tine.no/cms/praktisk-informasjon/tines-regelverk/attachment/309445?ts=14255e3ddb9>.
138. Tirard-Collet, P., Zee, J., Carmichael, L., Simard, R. 1991. A study of the microbiological quality of goat milk in Quebec. *J. Food Prot.* Vol. 54, 4: 263-266.
139. Walker, V. 1965. Therapeutic uses of goats milk in modern medicine. *Brit. Goat Society's Yearbook*, pp. 24-26.
140. Wilson, D., Stewart, K, Sears P. 1995. Effects of stage of lactation, production, parity and season on somatic cell counts in infected and uninfected dairy goats. *Small Rumin Rés* 16(2): 165-169.
141. Wooding, F., Peaker, M., Linzel. J. 1970. Theories of the milk secretion: evidence from the electron microscopic examination of milk, *Nature* 226:762-764.
142. Wooding, F., Morgan, G., Craig, H. 1977. "Sunbursts" and "christiesomes": cellular frag-ments in normal cow and goat milk, *Cell Tissue Res.* 185:535-545.
143. Zeng, S, Escobar, E. 1996. Effect of breed and milking method on somatic cell count, standard plate count and composition of goat milk. *Sma// Rumin. Rés.* 19: 169-175.
144. Zweifel, C., Muehtherr, J., Ring, M., Stephan, R. 2005. Influence of different factors in milk production on standard plate count of raw small ruminant bulk-tank milk in Switzerland. *Small Rum. Rés.* 58: 63-70.