

SUSANA NORI DE MACEDO

Efeito da mastite bovina sobre a composição e indicadores de higiene em leite de tanque



Pirassununga-SP

2013

SUSANA NORI DE MACEDO

Efeito da mastite bovina sobre a composição e indicadores de higiene em leite de tanque

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga-SP

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2916
FMVZ

Macedo, Susana Nori de
Efeito da mastite bovina sobre a composição e indicadores de higiene em leite de tanque / Susana
Nori de Macedo. -- 2013.
73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Cultura microbiológica. 2. Diagnóstico. 3. Micro-organismos. 4. Qualidade do leite. 5. Sanidade.
I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito da mastite sobre a composição e os indicadores de higiene em leite de tanque", protocolado sob o nº 2397/2011, utilizando leite coletado em tanques de expansão, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Effect of mastitis on the composition and indicators of hygiene in milk tank", protocol number 2397/2011, under the responsibility Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 25 de abril de 2013

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MACEDO, Susana Nori de

Título: Efeito da mastite bovina sobre a composição e indicadores de higiene em leite de tanque

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICO

Aos meus pais, José Maria e Helena, pelo amor, carinho e educação recebida e pelo apoio e dedicação em todos os momentos.

Às minhas irmãs, Adriana e Luciana, pelo amor, carinho, apoio e amizade sempre dedicados.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pelas oportunidades, pelos desafios, dificuldades e pelas conquistas.

Aos meus pais, José Maria Pereira de Macedo e Helena Tuulikki Nori, e minhas irmãs, Adriana Nori de Macedo e Luciana Nori de Macedo, pelo amor e dedicação incondicional. E por todos os ensinamentos e apoio em todos os momentos de minha vida.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela oportunidade de cursar o mestrado.

Ao Prof. Marcos Veiga dos Santos, meu orientador, pela oportunidade, confiança, orientação e amizade.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

À amiga Cristina Simões Cortinhas (Cris) que esteve presente em todas as fases do experimento desde a sua elaboração, execução e até a conclusão, dando todo o apoio necessário e valiosas sugestões. Pela sempre agradável companhia em todos os momentos dentro e fora do laboratório e pelo apoio e incentivo tanto na vida profissional quanto na vida pessoal.

À amiga Alessandra Módena Orsi que auxiliou em todas as etapas desde que chegou ao laboratório para fazer seu estágio. E pela sempre agradável companhia em todos os momentos dentro e fora do laboratório.

À Lucinéia Mestieri, especialista do Laboratório Qualileite e, sobretudo, amiga em todos os momentos, pelo auxílio e apoio prestados durante toda a execução do experimento e pelo apoio e incentivo sempre dedicados.

À amiga Taissa de Souza Canaes que sempre me apoiou desde a época da graduação e que foi quem, ainda na graduação, me mostrou a beleza e a importância da pesquisa. E que continuou me auxiliando e incentivando durante todo o mestrado, mesmo não participando do mesmo grupo de trabalho.

Às amigas Nara Ladeira de Carvalho, Camila Silano e Daniele Cristine Beuron, que me auxiliaram sempre que puderam na execução do experimento e pelo apoio e amizade.

Ao técnico do Laboratório Qualileite, José Franchini Garcia Moreno (Zeca), pelo apoio prestado durante a aquisição dos materiais para o experimento e pela amizade.

Aos amigos e companheiros do Laboratório Qualileite pela amizade e apoio sempre que necessário: Aline Gerato Dibbern, Alessandra Módena Orsi, Camila Silano, Cristian Marlon Magalhães Rodrigues Martins, Cristina Simões Cortinhas (Cris), José Franchini

Garcia Moreno (Zeca), Juliana Regina Barreiro, Juliano Leonel Gonçalves, Lucinéia Mestieri, Marcos André Arcari, Marina Elena Diniz Amaral Migliano (Nina), Nara Ladeira de Carvalho e Tiago Tomazi.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e/ou de minha formação profissional: Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso, Angélica Simone Cravo Pereira, Aníbal Sant'Ana Moretti, Augusto Hauber Gameiro, Francisco Palma Rennó, Márcio Brunetto, Luis Felipe Prada e Silva, Marcos Veiga dos Santos, Maria de Fátima Martins, Messias Alves Trindade Neto, Paulo Henrique Mazza Rodrigues e Romualdo Shiguelo Fukushima.

A todos os funcionários do Departamento de Nutrição e Produção Animal: Alessandra de Cassia Terassi da Silva, Fábila Silene Iaderoza e João Paulo de Oliveira Barros e a todos os técnicos de laboratório que estiveram sempre presentes e auxiliaram direta ou indiretamente.

Aos meus amigos que fazem da minha vida um momento único de muito aprendizado e que me ajudam a ver tudo por um ângulo diferenciado e perceber que tudo é importante para o meu desenvolvimento pessoal e, sobretudo, pela amizade em todos os momentos: Juliano Henrique Lázaro, Phelipe Marcelo Berretta Iaderoza e Dario Coppa.

A todos aqueles que me auxiliaram direta ou indiretamente durante todo o mestrado, meus sinceros agradecimentos.

*Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem.
Ou que seus planos nunca vão dar certo.
Ou que você nunca vai ser alguém.
Tem gente que machuca os outros.
Tem gente que não sabe amar.
Mas eu sei que um dia a gente aprende.
Se você quiser alguém em quem confiar,
Confie em si mesmo!
Quem acredita sempre alcança!*

*Ninguém nasce forte, torna-se forte. É pela repetição de atos, por
pequenas vitórias e sacrifícios reiterados, que se consegue um coração
generoso e uma grande coragem.*

RESUMO

MACEDO, S. N. **Efeito da mastite bovina sobre a composição e indicadores de higiene em leite de tanque.** [Effect of bovine mastitis on composition and hygienic quality in bulk tank milk]. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito da mastite subclínica sobre a composição e a qualidade higiênica do leite de tanque de rebanhos leiteiros. Especificamente, objetivou-se avaliar o efeito da contagem de células somáticas (CCS) do leite cru de rebanhos leiteiros sobre as concentrações de gordura, proteína, sólidos totais e extrato seco desengordurado e sobre a contagem bacteriana total (CBT), contagem de psicotróficos (CP) e contagem de coliformes (CC) do leite cru. Foram selecionados 230 rebanhos leiteiros localizados no Sul de Minas Gerais e Oeste de São Paulo, com base na média geométrica da CCS de cinco análises do mês anterior ao início das coletas. Estes rebanhos foram classificados de acordo com a CCS em três grupos: baixa (< 250.000 células/mL), média (> 250.000 e < 750.000 células/mL) e alta CCS (> 750.000 células/mL). Após a seleção dos rebanhos, amostras de leite de tanque foram coletadas quinzenalmente, por um período de três meses, totalizando 1380 amostras, que foram submetidas às análises de composição, CBT, CP e CC. Foi observado menor CBT e CC nos rebanhos com menor CCS, no entanto, rebanhos de média e alta CCS apresentaram maiores teores de gordura, proteína e sólidos totais. Foi observada média correlação entre CBT e CP ($r = 0,6215$) e entre CP e CC ($r = 0,3692$). Entre os indicadores de higiene e a composição do leite foram observadas correlações baixas e negativas entre CBT e gordura ($r = -0,0585$), CP e gordura ($r = -0,0688$) e CP e ST ($r = -0,0662$). Os rebanhos com CCS < 250.000 células/mL apresentam maior qualidade higiênica do leite de tanque, no entanto, quanto à composição, rebanhos com maior CCS apresentaram maiores teores de gordura e proteína.

Palavras-chave: Cultura microbiológica. Diagnóstico. Micro-organismos. Qualidade do leite. Sanidade.

ABSTRACT

MACEDO, S. N. **Effect of bovine mastitis on composition and hygienic quality in bulk tank milk.** [Efeito da mastite bovina sobre a composição e indicadores de higiene em leite de tanque]. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

The general objective of this study was to evaluate the effect of subclinical mastitis on composition and hygienic quality in bulk tank milk of dairy herds. The specific objectives were to evaluate the effect of somatic cell count (SCC) of raw milk on contents of fat, protein, total solids and nonfat dry milk and on total bacterial count (TBC), psychrotrophic count (PC) and total coliform count (CC). A total of 230 dairy farms located in South of Minas Gerais and West of São Paulo were selected, based on SCC geometric mean obtained from five monthly analysis preceding the beginning of the study. These dairy farms were classified in three groups according to SCC: low (< 250,000 cells/mL), medium (> 250,001 and < 750,000 cells/mL) and high SCC (> 750,001 cells/mL). After herd selection, bulk milk samples were collected fortnightly during three months totalizing 1380 samples, which were subjected to analysis of composition, TBC, PC and CC. A decrease of TBC and CC was observed in herds with low SCC, however, herds with medium and high SCC had increase on - fat, crude protein and total solids contents. A medium correlation was observed among TBC and PC ($r = 0.6215$), and also among PC and CC ($r = 0.3692$). Based on hygiene indicators and the milk composition, it was observed a low and negative correlation among TBC and fat ($r = -0.0585$), PC and fat ($r = -0.0688$) and PC and total solids ($r = -0.0662$). Dairy herds with low SCC had higher hygienic quality of bulk tank milk, however, considering the composition, herds with higher SCC showed higher milk fat and protein concentration.

Key words: Microbiological culture. Diagnostic. Microorganisms. Milk quality. Sanity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Diluição de amostras para plaqueamento automático para determinação da CBT e da CP..... 43
- Figura 2 - (A) Placas com meio PCA inoculadas; (B) e (C) equipamento para plaqueamento automático Spiral Plater-ID-DS Plus, Interscience, França; (D) inoculação automática no equipamento Spiral Plater – ID-DS Plus..... 44
- Figura 3 - (A) Estufa bacteriológica; (B) Placa com meio PCA para determinação da CBT; (C) Placa com meio PCA para determinação da PC; (D) Leitura das placas de CBT e CP; (E) Leitor automático de colônias SCAN 1200-ID, Interscience, França; (F) Imagem gerada para leitura das placas de CBT e CP..... 44
- Figura 4 - Inoculação das amostras em placas Petrifilm (3M TM PetrifilmTM CC Count Coliform) para contagem de coliformes totais 45
- Figura 5 - (A) Contador de colônias manual; (B) 4 colônias de coliformes totais em placa Petrifilm CC Count Coliform; (C) Incontáveis colônias de coliformes totais em placa Petrifilm CC Count Coliform; (D) Placa Petrifilm CC Count Coliform sem crescimento 45
- Figura 6 - Correlação entre CCS e CC e entre CCS e o teor de gordura em leite de tanques.. 51
- Figura 7 - Correlação entre CCS e o teor de proteína e entre CCS e o teor de sólidos totais em leite de tanques..... 51
- Figura 8 - Correlação entre CBT e CP e entre CBT e CC em leite de tanques..... 51
- Figura 9 - Correlação entre CBT e CCS e entre CBT e o teor de gordura em leite de tanques52
- Figura 10 - Correlação entre CP e CC e entre CP e o teor de gordura em leite de tanques 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias da contagem bacteriana total (CBT), contagem de psicrotróficos (CP), contagem de coliformes (CC) e contagem de células somáticas (CCS) do leite de tanques de acordo com a CCS.....	49
Tabela 2 - Efeito do nível de CCS sobre as médias da composição do leite de tanques de rebanhos leiteiros.....	49
Tabela 3 - Coeficientes de correlação entre os indicadores de higiene e de composição de leite de tanques	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBT	Contagem bacteriana total
CC	Contagem de coliformes
CCS	Contagem de células somáticas
CP	Contagem de psicrotróficos
EPM	Erro padrão da média
ESD	Extrato seco desengordurado
r	Coefficiente de correlação linear
ST	Sólidos totais
UFC	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Qualidade do leite	19
2.2	Mastite bovina	22
2.3	Indicadores de higiene em leite de tanque	29
2.3.1	Contagem bacteriana total.....	30
2.3.2	Contagem de psicotróficos	32
2.3.3	Contagem de coliformes totais.....	35
2.4	Composição do leite	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Seleção dos rebanhos e coleta das amostras de leite	42
3.2	Análises microbiológicas do leite.....	43
3.3	Determinação da composição do leite e contagem de células somáticas	46
3.4	Análises estatísticas	46
4	RESULTADOS	48
4.1	Análises microbiológicas do leite de tanque	48
4.2	Composição do leite de tanque	49
4.3	Análise de correlação entre as variáveis de composição e os indicadores de higiene do leite de tanque	50
5	DISCUSSÃO	53
5.1	Análises microbiológicas do leite de tanque	53
5.2	Composição do leite de tanque	55
5.3	Análise de correlação entre as variáveis de composição e os indicadores de higiene do leite de tanque	56
6	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O aumento da competitividade da cadeia agroindustrial do leite depende da produção de matérias primas de alta qualidade (ROMA JÚNIOR et al., 2009), pois a qualidade do leite cru interfere no processamento, no rendimento e na aceitabilidade dos derivados lácteos. (BOTARO et al., 2013). Para caracterizar a qualidade do leite são analisados fatores relacionados com a higiene, a composição do leite e as características sensoriais de interesse dos consumidores (BRANDT et al., 2010). Os principais aspectos que afetam a qualidade do leite cru são a incidência de vacas com mastite no rebanho e as condições de higiene e armazenamento durante a produção e o processamento do leite (FORSBÄCK et al., 2010b).

A mastite é uma inflamação da glândula mamária (BRADLEY, 2002) caracterizada por diversas modificações nas características físicas e químicas do leite (OVIDO-BOYSO et al., 2007). Tanto na forma clínica quanto na subclínica (CAVERO et al., 2008), a mastite é a doença que causa os maiores prejuízos em toda a cadeia produtiva do leite (GROENENDAAL et al., 2004), pois afeta a produção, a qualidade do leite, o rendimento dos derivados e a vida de prateleira dos produtos lácteos (HOGVEEN et al., 2011).

Com o aumento da contagem de células somáticas (CCS) em resposta à infecção da glândula mamária por micro-organismos causadores da mastite, são observadas diversas alterações na composição do leite, tais como o aumento da quantidade de ácidos graxos livres, a diminuição do teor de caseína e a elevação do teor de proteínas séricas (ÅKERSTEDT et al., 2012), além da redução do teor de lactose e alteração de teores de minerais do leite. Estas alterações são devidas à ação de mediadores da inflamação e à atividade das enzimas e toxinas sintetizadas pelos patógenos da mastite (BRANDT et al., 2010).

A qualidade higiênica do leite na fazenda é estimada pela CBT do leite de tanque (PANTOJA et al., 2012). Entretanto, a ampla diversidade de fontes de contaminação do leite cru contribui para a baixa acurácia na identificação das causas de contaminação (BRITO et al., 1998). Dessa forma, além da CBT, pode-se avaliar a qualidade higiênica do leite pela contagem de grupos específicos de micro-organismos (JAYARAO et al., 2004), tais como a contagem de psicrotóxicos (CP) e a contagem de coliformes (CC) (ELMOSLEMANY et al., 2010), pois a contagem de grupos específicos de micro-organismos no leite de tanque indica a provável fonte de contaminação do leite e auxilia na busca por possíveis soluções (BAVA et al., 2011).

A CP estima o número de micro-organismos que se proliferam em temperaturas de refrigeração e que podem se multiplicar em temperaturas de 0° a 20° C (MARTH; STEELE, 2001). Os micro-organismos psicrotróficos são amplamente encontrados no ambiente (ELMOSLEMANY et al., 2009a) e a presença dessas bactérias no leite de tanque indica especialmente falhas na higienização dos equipamentos de ordenha (CEMPÍRKOVÁ; MIKULOVÁ, 2009). Este grupo de bactérias sintetiza enzimas que hidrolisam a gordura e a proteína do leite (WANG; JAYARAO, 2001), reduzindo a qualidade e a vida de prateleira dos produtos lácteos (SVENSSON et al., 2006). A síntese dessas enzimas está diretamente relacionada com a CP, de forma que quanto maior a CP, maior a produção de enzimas e menor a vida de prateleira dos produtos lácteos (FRANK; YOUSEF, 2004; CEMPÍRKOVÁ; MIKULOVÁ, 2009).

Os micro-organismos pertencentes ao grupo dos coliformes são comumente encontrados nas fezes das vacas, porém, podem estar distribuídos em todo o ambiente da fazenda (JAYARAO et al., 2004). Geralmente, os coliformes podem estar associados aos casos de intoxicação de origem alimentar, mas são facilmente destruídos pela pasteurização (PANTOJA et al., 2011). No entanto, se houver alguma falha durante o tratamento térmico (COTON et al., 2012), estes micro-organismos podem deteriorar o leite (GAUCHER et al., 2008) e causar doenças nos consumidores (BLUM et al., 2008). A presença dessas bactérias no leite de tanque é um indicativo de contaminação fecal, de falhas na refrigeração do leite ou de sanitização do equipamento de ordenha e tanque (COTON et al., 2012).

Em geral, a qualidade do leite é estimada pela análise da CCS, da CBT e dos teores de gordura e proteína. Entretanto, a CP pode ser utilizada para indicar falhas na higienização do equipamento de ordenha, e para prever a vida de prateleira do leite e derivados (FRANK; YOUSEF, 2004) e a CC pode ser utilizada para avaliar a qualidade sanitária das etapas de produção e processamento do leite (BAVA et al., 2011; PANTOJA et al., 2011). Para a melhoria da qualidade do leite devem ser adotados programas de prevenção de mastite e adequadas práticas de manejo (JANSEN et al., 2010). O monitoramento periódico da saúde da glândula mamária (RUEGG, 2003a) e da qualidade higiênica do leite produzido na fazenda (BRITTEN, 2012) são ações para o estabelecimento desses programas (BARKEMA et al., 2013).

Desta forma, a hipótese testada neste estudo foi que a CCS do tanque está associada negativamente com a composição e a qualidade higiênica do leite de tanques. Portanto, os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Avaliar o efeito da CCS sobre os teores de gordura, proteína, sólidos totais e extrato seco desengordurado do leite e sobre os indicadores de higiene (CBT, CP e CC) em leite de tanque de rebanhos comerciais;
- 2) Avaliar a correlação entre os indicadores de higiene (CBT, CP e CC) e a composição do leite (gordura, proteína, sólidos totais e extrato seco desengordurado) de tanque de rebanhos comerciais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Qualidade do leite

Para o aumento da competitividade da cadeia agroindustrial do leite, um dos principais desafios é a produção de matérias primas de qualidade (ROMA JÚNIOR et al., 2009), pois a qualidade do leite cru interfere no processamento, rendimento e aceitabilidade dos derivados lácteos (BOTARO et al., 2013). A qualidade do leite está relacionada à higiene, composição e aspectos sensoriais relevantes aos consumidores (BRANDT et al., 2010). Para que o leite seja considerado de boa qualidade, deve apresentar inocuidade e ausência de resíduos e baixa contagem bacteriana e não ter sua composição alterada pela adição ou remoção de substâncias (ROMA JÚNIOR et al., 2009).

O leite cru apresenta composição rica em nutrientes e tem pH 6,7 - 6,9, favorecendo a proliferação de grande variedade de micro-organismos (ARCURI et al., 2006), muitos dos quais são responsáveis pela alteração de sabor e odor dos produtos lácteos e podem constituir um risco à saúde dos consumidores (FRICKER et al., 2011). Os principais riscos à saúde estão relacionados à presença de antimicrobianos usados no tratamento de vacas com mastite (OLIVER; MURINDA, 2012) e à contaminação por micro-organismos patogênicos. Embora, em geral, a pasteurização elimine os principais agentes patogênicos, se ocorrerem falhas durante esse processo, o leite pode se tornar veículo de transmissão de doenças para o homem (BRADLEY, 2002). Quando presentes no leite, os resíduos de antimicrobianos podem desencadear reações alérgicas em indivíduos sensíveis, além de causar alterações no equilíbrio da microbiota intestinal dos consumidores e aumentar o risco de resistência dos antimicrobianos (BRADLEY, 2002; FREITAS et al., 2005).

O leite sintetizado e secretado pela glândula mamária de vacas sadias é estéril, entretanto, a contaminação bacteriana pode ocorrer dentro do úbere de vacas com mastite, durante a ordenha, na estocagem, e durante o transporte e processamento (PERKINS et al., 2009). Em nível de fazenda, a contaminação microbiológica do leite de tanque pode ocorrer por três principais vias: contaminação bacteriana da pele do úbere e tetos, higienização incorreta do equipamento de ordenha, e presença de micro-organismos causadores de mastite no interior do úbere (ELMOSLEMANY et al., 2010).

A higiene do úbere é um aspecto importante para a qualidade do leite (DE PINHO MANZI et al., 2012), pois influencia o tipo e a quantidade de micro-organismos presentes na pele dos tetos. Úberes e tetos sujos são fontes de bactérias ambientais que podem contaminar o leite (SCHREINER; RUEGG, 2003; ELMOSLEMANY et al., 2009a), além de elevar a prevalência de infecções intramamárias (RUEGG, 2003a). Durante a ordenha, os micro-organismos presentes nos tetos sujos podem contaminar o leite por contato com o equipamento de ordenha, ou entrar pelo canal do teto após a ordenha e infectar a glândula mamária (ZUCALI et al., 2011).

Os métodos de referência utilizados para a avaliação da qualidade do leite cru são a contagem bacteriana total (CBT) e a contagem de células somáticas (CCS) (DUFOUR et al., 2011). Os resultados da CBT permitem estimar o número total de bactérias presentes no leite (ELMOSLEMANY et al., 2009b) e a CCS é um indicativo de saúde da glândula mamária (SCHWARZ et al., 2010). Quando a CCS e a CBT estão dentro dos limites legais, a pasteurização é altamente efetiva para destruir os micro-organismos patogênicos que podem ameaçar a saúde humana (PANTOJA et al., 2009).

Com o objetivo de estabelecer os padrões legais para a qualidade do leite diversos países definiram limites de qualidade do leite para garantia da saúde pública. Nos Estados Unidos, para o leite cru na fazenda, o limite superior para a CCS é de 750.000 células/mL e para a CBT é de 100.000 UFC/mL (BARBANO et al., 2006. Supplement, 1). No Canadá, o limite máximo de CCS foi reduzido de 750.000 células/mL para 500.000 células/mL (NIGHTINGALE et al., 2008) e nos países da União Europeia foi reduzido de 750.000 células/mL para 400.000 células/mL (BERRY et al., 2006).

No Brasil, para promover a melhoria da qualidade do leite, oferecer ao consumidor produtos lácteos de melhor qualidade e aumentar a competitividade em novos mercados, o governo brasileiro criou o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL). Como parte desse programa, a instrução normativa nº 51 (IN 51/2002), alterada pela IN 62/2011, aprovou a regulamentação técnica da produção, identificação e qualidade dos diferentes tipos de leite comercializados no Brasil (BRASIL, 2002; 2011).

Com a IN 62/2011 foram estabelecidos os limites legais máximos para a CBT e a CCS e os valores mínimos para composição e características físicas e químicas do leite cru de acordo com as regiões brasileiras. Para as regiões Sudeste, Sul e Centro Oeste, o limite máximo para a CBT passou de 1.000.000 UFC/mL em 2002 para 600.000 UFC/mL em 2012 e deverá chegar a 300.000 UFC/mL a partir de julho de 2014 e a 100.000 UFC/mL em 2016. Para CCS, o limite legal máximo passou de 1.000.000 células/mL em 2002 para 600.000

células/mL em 2012, a partir de julho de 2014 será 500.000 células/mL e em 2016 será de 400.000 células/mL. Para a composição, os valores mínimos estabelecidos são de 3,0% de gordura para o leite integral e 2,9% de proteína (BRASIL, 2002; 2011).

As perdas econômicas causadas pela baixa qualidade do leite e mais especificamente pela alta CCS incentivaram as indústrias de laticínios a adotar programas de bonificação aos produtores que fornecem leite com baixa CBT e CCS e com maiores teores de gordura e proteína (NIGHTINGALE et al., 2008; ROMA JÚNIOR et al., 2009). Estes sistemas de bonificação motivaram os produtores de leite a fornecerem um produto de melhor qualidade (BOTARO et al., 2013).

Nos Estados Unidos, os sistemas de pagamento por qualidade tiveram início a partir da segunda metade da década de 1970, quando os laticínios implantaram programas de bonificação, principalmente devido às perdas que ocorriam na produção de queijos (BARBANO et al., 2006. Supplement, 1). O processamento de leite com alta CCS apresenta efeitos adversos sobre a produção de queijo, tais como a diminuição do rendimento, a redução da firmeza e o aumento das perdas de gordura e caseína no soro do leite (FORSBÄCK et al., 2010b). Inicialmente, a indústria começou a bonificar os produtores que forneciam leite com baixa CCS. Depois, outras variáveis foram incluídas nos sistemas de pagamento por qualidade, como a baixa CBT, o aumento dos teores de gordura e proteína, a ausência de antibióticos e a não adição de água (BARBANO et al., 2006. Supplement, 1).

No Brasil, os principais laticínios utilizam sistemas de pagamento do leite por qualidade desde a década de 1990 (ROMA JÚNIOR et al., 2009). As indústrias brasileiras têm adotado sistemas de bonificação baseados principalmente na CCS, porém, alguns laticínios também têm utilizado sistemas de pagamento pela composição do leite (LANGONI et al., 2011). Os maiores laticínios brasileiros também têm adotado um sistema já utilizado por alguns países europeus, além de Estados Unidos e Canadá, no qual os produtores são classificados pela produção de leite, CBT, CCS e composição do leite e recebem uma bonificação extra de acordo com a qualidade do leite. Neste sistema, quanto menor a CBT e a CCS e maior os teores de gordura e proteína, maior a bonificação. Desse modo, os produtores são incentivados a produzir leite de alta qualidade (BARBANO et al., 2006. Supplement, 1; NIGHTINGALE et al., 2008).

Para o monitoramento da qualidade do leite produzido na fazenda, são comumente utilizadas amostras coletadas a partir do tanque (ELMOSLEMANY et al., 2009a). A análise dessas amostras possibilita estimar a ocorrência de mastite no rebanho e investigar possíveis problemas relacionados ao aumento da CBT e da CCS, além de estimar a prevalência e a

ocorrência de patógenos causadores de mastite, especialmente os contagiosos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (ELIAS et al., 2012; KEEFE, 2012).

Embora seja um método mais barato de avaliação da qualidade do leite em comparação com a cultura de amostras individuais devido ao menor número de amostras, a cultura do leite de tanque tem como limitação a diversidade de fontes de contaminação, pois além do úbere, os micro-organismos encontrados no leite total do rebanho podem ser oriundos de diversas fontes, como o ambiente da fazenda (BRITO et al., 1998).

2.2 Mastite bovina

A mastite é uma inflamação da glândula mamária e um dos principais problemas de saúde de vacas leiteiras (BAGHERI et al., 2013). É de difícil controle por ser uma doença de etiologia multifatorial. É caracterizada por modificações físicas, químicas e microbiológicas no leite (ELIAS et al., 2012) e por uma resposta inflamatória da glândula mamária que pode ser causada por alterações metabólicas e fisiológicas, trauma do úbere, ou mais frequentemente por micro-organismos patogênicos (OVIEDO-BOYSO et al., 2007).

A mastite é a doença que causa os maiores prejuízos tanto para a indústria quanto para os produtores de leite. Estas perdas são devidas principalmente ao menor rendimento de fabricação de derivados lácteos pela alteração na composição do leite e pela menor vida de prateleira do leite e seus derivados (ÅKERSTEDT et al., 2012; ARCHER et al., 2013). Para o produtor de leite, as perdas se devem à redução da produção e ao descarte do leite, ao trabalho extra para tratamento e custo de aplicação de antibióticos e ao aumento do risco de doenças subsequentes, além de ser uma das principais causas de descarte de vacas em rebanhos leiteiros (GROENENDAAL et al., 2004; HOGVEEN et al., 2011).

A mastite pode se manifestar de duas formas: clínica e subclínica. Na forma clínica, apresenta-se com sintomas visíveis, como alterações na vaca (edema e sensibilidade aumentada do úbere e febre) e no leite (presença de grumos, pus ou sangue) (BRADLEY, 2002). A mastite subclínica não apresenta sintomas aparentes, porém pode ultrapassar os 70% dos casos anuais de mastite, enquanto que a forma clínica da doença tem incidência média de 25 a 30% de casos por ano (CAVERO et al., 2008).

Nos casos de mastite, as principais alterações no leite são a elevação da quantidade de ácidos graxos livres, a diminuição do teor de caseína do leite e aumento do teor de proteínas

do soro (ÅKERSTEDT et al., 2012), assim como redução da concentração de lactose, alteração de teores de sódio, cloro, potássio e cálcio e aumento do pH. Estas alterações são causadas pelos mediadores químicos da inflamação e pela atividade das enzimas e toxinas bacterianas no leite e podem ocorrer em diferentes intensidades dependendo da forma de manifestação e duração da inflamação da glândula mamária (BRANDT et al., 2010).

As alterações da qualidade do leite podem ocorrer pela ação de enzimas extracelulares secretadas pelas bactérias causadoras da mastite (ÅKERSTEDT et al., 2012). Estas enzimas hidrolisam a gordura e a proteína do leite, o que eleva a concentração de ácidos graxos livres e diminui o teor de proteína do leite (FERNANDES et al., 2007). O aumento da concentração de proteínas do soro no leite e da concentração de alguns íons é causado pela alteração da permeabilidade dos capilares sanguíneos (MOTTRAM et al., 2007; ÅKERSTEDT et al., 2012). Isso ocorre devido ao decréscimo do teor de lactose, que desempenha papel fundamental para o equilíbrio osmótico do leite em relação ao sangue, aumentando a passagem de íons sódio e cloreto como mecanismo de compensação para restabelecimento do equilíbrio osmótico (FORSBÄCK et al., 2010b).

Nos processos inflamatórios que ocorrem em resposta à infecção da glândula mamária, pode haver maior ou menor lesão tecidual, dependendo do micro-organismo causador e da persistência da inflamação (BRANDT et al., 2010). De acordo com a duração da inflamação, a mastite pode ser classificada em crônica ou aguda (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). A mastite crônica ocorre quando o patógeno causador da mastite não é eliminado e a inflamação é persistente (LEITNER et al., 2000), enquanto que os casos agudos são de curta duração e são caracterizados por alterações físicas nos quartos acometidos, como inchaço e aumento da temperatura, além de alterações visíveis no leite (HORTET; SEEGERS, 1998; SIIVONEN et al., 2011).

Dependendo da intensidade da lesão pode ocorrer a perda de função das células secretoras e diminuição da capacidade de síntese de leite (PARK et al., 2007), pois a produção de leite é dependente do número de células secretoras ativas e do grau de diferenciação dessas células. Como a mastite pode ocorrer em qualquer fase do ciclo produtivo, pode afetar tanto o desenvolvimento quanto a função da glândula mamária. Para que haja secreção abundante de leite após o parto é necessário que o funcionamento estrutural e bioquímico da glândula mamária esteja adequado (AKERS; NICKERSON, 2011).

A principal causa das infecções intramamárias é de origem microbiana, sendo os patógenos causadores geralmente classificados em dois grupos: contagiosos e ambientais (BRADLEY, 2002). Em geral, os micro-organismos do primeiro grupo são adaptados a

sobreviver na glândula mamária e são transmitidos de quartos infectados para quartos sadios entre vacas ou mesmo entre quartos de uma mesma vaca (FREITAS et al., 2005). Os patógenos ambientais são considerados invasores oportunistas e não são adaptados a sobreviver na glândula mamária (BRADLEY, 2002). Esse grupo de micro-organismos invade a glândula mamária pelo canal do teto e se multiplicam, o que resulta em resposta imune a qual pode eliminar a infecção (HOGAN; SMITH, 2012).

Os principais patógenos contagiosos são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma* (FRANCOZ et al., 2012) e estão geralmente relacionados com o decréscimo da produção de leite e aumento da CCS do tanque (ZADOKS et al., 2004). Em geral, as infecções são de longa duração e se apresentam na forma subclínica, com casos clínicos intermitentes (SCHUKKEN et al., 2012). *Streptococcus agalactiae* é um patógeno obrigatório da glândula mamária bovina (KEEFE, 1997) enquanto que *Staphylococcus aureus* embora seja encontrado na glândula mamária, também pode estar presente em outras partes do corpo da vaca, tais como pele do úbere, narina, reto e vulva. Além disso, *Staphylococcus aureus* também pode ser encontrado no ambiente (ROBERSON et al., 1994).

Os patógenos ambientais mais comumente encontrados são os coliformes e os estreptococos ambientais (HOGAN; SMITH, 2012). Estes micro-organismos são encontrados na água, nas fezes e no ambiente e podem infectar a glândula mamária quando o úbere ou os tetos das vacas entram em contato com a contaminação do ambiente (SCHREINER; RUEGG, 2002). Os casos de mastite causados por coliformes são considerados os mais graves, enquanto que a mastite causada por estreptococos ambientais, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*, apresenta sinais clínicos moderados (PYÖRÄLÄ et al., 2011). Embora estes patógenos causadores de mastite sejam classificados como ambientais, micro-organismos como *Streptococcus uberis* e *Klebsiella* spp. podem estar mais adaptados ao hospedeiro, pois, após causar mastite clínica, estes patógenos podem retornar para a forma subclínica (RUEGG, 2012).

Dessa forma, esta classificação dos patógenos causadores da mastite em contagiosos e ambientais torna-se generalizada (RUEGG, 2012). Com a utilização de técnicas de biologia molecular para a caracterização dos patógenos da mastite, foi descrito que os micro-organismos podem apresentar diferentes perfis de transmissão ambiental ou contagiosa, dependendo do rebanho (ZADOKS et al., 2011). Por exemplo, patógenos contagiosos como *Staphylococcus aureus* foram encontrados no ambiente, assim como foram encontrados patógenos ambientais adaptados a sobreviver na glândula mamária. A partir dos resultados destes estudos, micro-organismos ambientais capazes de causar mastite subclínica persistente

e disseminar colônias no leite em quantidade suficiente para estabelecer uma infecção podem ser classificados como contagiosos (RUEGG, 2012).

O risco de infecção da glândula mamária está relacionado com a exposição ao patógeno e à eficiência dos mecanismos de defesa da vaca (SCHREINER; RUEGG, 2003). A primeira barreira contra a invasão do úbere por patógenos causadores da mastite é o canal do teto. Dessa forma, a integridade da extremidade dos tetos é fundamental para reduzir o risco de infecção da glândula mamária (DE PINHO MANZI et al., 2012), que ocorre quando micro-organismos invadem a glândula mamária pelo canal do teto, se multiplicam nas cisternas do teto e da glândula e atingem os tecidos secretores (SURIYASATHAPORN et al., 2000).

Um dos fatores que podem afetar a integridade das extremidades dos tetos é o tempo efetivo de ordenha, no qual o conjunto de ordenha encontra-se ordenhando a vaca (EDWARDS et al., 2013). Recomenda-se que o tempo entre a primeira estimulação do úbere e o término da ordenha seja de 90 segundos. Este tempo é necessário para que ocorra a rápida e contínua remoção do leite, evitando o tempo prolongado de ordenha (WATTERS et al., 2012). Quando ocorre a sobre ordenha, podem aparecer lesões nos tetos das vacas que afetam a integridade das extremidades dos tetos e que podem comprometer a saúde do úbere (ZUCALI et al., 2011).

A persistência das bactérias dentro da glândula depende da capacidade de aderência ao tecido mamário, principalmente durante a lactação, quando o úbere é frequentemente esvaziado durante a ordenha (CARNEIRO et al., 2009) e da capacidade de adaptação do agente invasor à ação da resposta imune da vaca (CAMUSSONE; CALVINHO, 2013). Bactérias como *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* aderem-se bem ao tecido da glândula mamária (VIGUIER et al., 2009) ao contrário de *Escherichia coli* que não tem boa capacidade de adesão, porém se multiplica rapidamente nos quartos mamários com baixa CCS (AKERS; NICKERSON, 2011).

Para aderir à glândula mamária, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* sintetizam substâncias que são responsáveis pela interação e adesão dos micro-organismos ao epitélio da glândula mamária (JACOBSSON, 2003; CAMUSSONE; CALVINHO, 2013). Para sobreviver na glândula mamária, algumas estirpes de *Escherichia coli* sintetizam cápsulas que as protegem da ação do sistema imune da vaca (HOGAN; SMITH, 2003). Como fator de proteção à resposta imune da vaca, *Staphylococcus aureus* produzem polissacarídeos capsulares que podem resistir à fagocitose (CAMUSSONE; CALVINHO, 2013).

A gravidade e a duração da mastite são influenciadas pela interação dos microorganismos que invadem a glândula mamária com os leucócitos presentes no leite, pelo estado imunológico da vaca e pela estirpe do patógeno causador da mastite (KANDASAMY et al., 2011). Em vacas saudáveis, os macrófagos são os leucócitos predominantes no leite e são responsáveis pela detecção da invasão dos patógenos (RUEGG, 2003a). Após a detecção da infecção, os macrófagos liberam substâncias que atraem os neutrófilos para a área de infecção (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Estes leucócitos se acumulam próximos aos alvéolos, onde fagocitam e destroem os patógenos invasores (RUEGG, 2003a). Quando os mecanismos de defesa da glândula mamária infectada não conseguem combater os agentes invasores, ocorre uma resposta imune prolongada. Neste caso, os leucócitos sintetizam substâncias que podem resultar em sinais clínicos da mastite (SURIYASATHAPORN et al., 2000).

Para o monitoramento da saúde da glândula mamária, as variáveis mais frequentemente analisadas são a CCS, a incidência de mastite clínica, a porcentagem de vacas descartadas devido à mastite (BARKEMA et al., 2013) e, com menor frequência, devido ao custo mais elevado, a identificação de patógenos causadores de mastite (BRITO et al., 1998). A CCS é a principal variável para estimar a prevalência e a incidência de mastite, mesmo quando não há sinais clínicos (DUFOUR et al., 2011) e pode ser analisada em amostras de leite individuais, ou do leite do tanque. No leite oriundo de vacas saudáveis, a CCS é inferior a 200.000 células/mL (CARAVIELLO et al., 2005) e com o início de uma inflamação da glândula mamária, ocorre aumento de CCS, devido à migração de leucócitos do sangue para a glândula mamária (AKERS; NICKERSON, 2011).

As células somáticas são o conjunto das células epiteliais secretórias, células de descamação e leucócitos presentes no leite (RUEGG, 2003a). Quando ocorre uma inflamação no úbere, há aumento no número de leucócitos de origem sanguínea, que são responsáveis pela resposta à infecção. A migração de leucócitos do sangue para a glândula mamária, como resposta à infecção é, geralmente, proporcional à gravidade da infecção (ANDREWS et al., 2008; NORMAN et al., 2011).

A CCS é amplamente usada como um indicador de ocorrência de mastite (LAKIC et al., 2011), sendo considerada inflamação intramamária quando a CCS é superior a 200.000 células/mL (WILLIAMS et al., 2012). A inflamação da glândula mamária é semelhante à de outros tecidos, porém, os principais sinais não são sempre facilmente detectáveis, exceto nos casos de mastite clínica (ANDREWS et al., 2008).

Além dos micro-organismos presentes na glândula mamária, diversos fatores podem interferir na CCS, tais como: a genética, o estágio de lactação, as condições metabólicas e fisiológicas da vaca (OLECHNOWICZ; JAKOWSKI, 2012), fatores nutricionais (HEINRICHS et al., 2009) e a estação do ano (ARCHER et al., 2013).

O intervalo entre a infecção da glândula mamária e o início da resposta imune depende da liberação de mediadores inflamatórios, que são controlados por fatores genéticos, e podem variar entre as vacas de um mesmo rebanho (BAGHERI et al., 2013). O sistema imune de vacas que não respondem rapidamente a uma nova infecção tem maior dificuldade para eliminar o patógeno causador da mastite. Estes animais que apresentam maior intervalo entre a infecção e o início da resposta imune, são geneticamente mais suscetíveis à mastite e possuem maior probabilidade de infecções recorrentes (OUWELTJES et al., 2007; KANDASAMY et al., 2011).

Durante a lactação há variação na CCS, mesmo em vacas sadias. No início da lactação, as vacas apresentam maior CCS principalmente nos cinco primeiros dias após o parto. A CCS diminui até o pico de lactação, quando, em geral, atinge o menor valor. Após o pico de produção, a CCS tem elevação gradual até o término da lactação (FOX, 2009; MADOUASSE et al., 2010).

O adequado balanceamento da dieta é um importante fator para a manutenção da saúde e o funcionamento adequado do sistema imune das vacas, pois a composição da dieta interfere na condição corporal e no fornecimento de nutrientes essenciais para o sistema imune e, conseqüentemente, no balanço energético do período de transição (HEINRICHS et al., 2009). Menor perda de peso e de escore de condição corporal da vaca após o parto está associada com saúde da glândula mamária e menor incidência de mastite clínica durante a lactação (VAN STRATEN et al., 2009). Vacas com grande déficit de energia no início da lactação são metabolicamente mais estressadas e têm maior risco de apresentar casos de mastite durante a lactação (JAMROZIK; SCHAEFFER, 2012).

A estação do ano e o clima podem interferir no risco de novos casos de mastite (FOX, 2009). Em geral, há aumento da CCS no verão e na primavera, causados possivelmente pelo aumento da temperatura e umidade, os quais contribuem para a proliferação dos micro-organismos no ambiente e elevam a probabilidade de infecções do rebanho pelo aumento da exposição aos patógenos (GREEN et al., 2006; ARCHER et al., 2013).

A análise da CCS no leite de tanque possibilita estimar a prevalência de vacas com elevada CCS no rebanho (MADOUASSE et al., 2010), embora não seja linear a correlação entre a CCS do tanque e a proporção de vacas com alta CCS. Estima-se que em rebanhos com

CCS do tanque acima de 350.000 células/mL aproximadamente 40% das vacas em lactação tenham CCS acima de 200.000 células/mL. Esta porcentagem, no entanto, é maior em rebanhos com alta produção, pois a CCS geralmente é menor nas vacas mais produtivas (BARKEMA et al., 2013). Isto pode ocorrer devido à diminuição da concentração de células somáticas pela maior produção de leite (FORSBÄCK et al., 2009).

O efeito da diluição da CCS também pode encobrir a presença de animais com mastite no rebanho (REYHER; DOHOO, 2011). Mesmo em tanques com CCS inferior a 200.000 células/mL, pode haver leite oriundo de vacas com elevada CCS. Neste caso, podem estar presentes enzimas de origem bacteriana, que mesmo em baixas concentrações, podem contribuir para a deterioração do leite no tanque (FORSBÄCK et al., 2011). Do mesmo modo, em nível de vaca, a análise de amostras compostas pode encobrir a presença de um quarto infectado (FORSBÄCK et al., 2010b).

O aumento da CCS do tanque está geralmente associado com o decréscimo da produção de leite. Essa diminuição pode ser observada até uma semana antes do aparecimento de sinais clínicos. Quando há casos de mastite antes do pico de lactação, os efeitos sobre a produção de leite são mais graves e a vaca produz menos leite no restante da lactação se comparada com vacas que não tiveram casos de mastite (LE MARÉCHAL et al., 2011).

Em diversos países, desde a introdução de programas de prevenção da mastite, têm sido obtidos grandes progressos na melhoria da qualidade do leite, com decréscimo da prevalência de infecções intramamárias e diminuição da CCS do leite de tanque (PITKALA et al., 2004; PIEPERS et al., 2007; SAMPIMON et al., 2009). Primeiramente, foi estabelecido um programa padrão para controle da mastite, no qual foram estabelecidas as cinco principais ações para o controle das infecções intramamárias (SURIYASATHAPORN et al., 2000; RUEGG, 2003b). Depois o programa foi expandido e foram incluídos outros cinco pontos, com a criação do programa de dez pontos para controle da mastite (KEEFE, 2012).

Os objetivos dos programas para controle da mastite são diminuir a incidência de infecções intramamárias e melhorar a qualidade do leite (JANSEN et al., 2010) e, para isso, inclui as seguintes ações: estabelecimento de metas para o controle da saúde da glândula mamária; manutenção de um ambiente limpo, seco e confortável; realização dos procedimentos adequados na ordenha; manutenção periódica do equipamento de ordenha; registro dos dados de produção e de casos de mastite; manejo apropriado da mastite clínica durante a lactação; realização da terapia da vaca seca; controle de patógenos contagiosos e descarte das vacas cronicamente infectadas; monitoramento regular da saúde do úbere; e revisão periódica do programa de controle de mastite (KEEFE, 2012; LAM et al., 2013).

Nos principais programas de controle da mastite, geralmente já são adotados o estabelecimento de metas, o registro de dados (KEEFE, 2012) e o monitoramento da saúde da glândula mamária (RUEGG, 2003a). A adoção de adequado tratamento da mastite clínica, da terapia da vaca seca e de práticas de higiene reduziu a prevalência de infecções causadas por patógenos contagiosos (BRITTEN, 2012), aumentando a prevalência de infecções por patógenos ambientais (RUNCIMAN et al., 2010), que são mais comuns durante o período seco, principalmente no início e final do período (RUEGG, 2003a). A suscetibilidade para infecções da glândula mamária durante este período é atribuída às possíveis falhas na formação do tampão de queratina no início do período seco e à perda do tampão no final do período seco (RUNCIMAN et al., 2010).

A terapia da vaca seca é indicada para tratar as infecções subclínicas no final da lactação e prevenir novas infecções durante o período seco (DENIS et al., 2009). A aplicação de antimicrobianos na secagem é indicada mesmo em quartos sadios, pois há redução na incidência de novas infecções durante o período seco (WILLIAMSON et al., 1995). Além disso, as infecções que ocorrem no período seco podem representar um risco não somente logo após o parto, mas também para toda a lactação. Metade dos casos de mastite ambiental diagnosticados até os 100 primeiros dias de lactação são atribuídos às infecções no período seco (RUNCIMAN et al., 2010). Em novilhas infectadas com *Staphylococcus aureus* que não recebem tratamento intramamário durante a gestação é observada diminuição de 10% na produção de leite no início da lactação em relação aos animais tratados (NICKERSON, 2009).

2.3 Indicadores de higiene em leite de tanque

A qualidade higiênica do leite cru é um dos principais problemas para a indústria de lácteos (ERCOLINI et al., 2009), pois afeta a qualidade do leite pasteurizado e produtos derivados (ELMOSLEMANY et al., 2009a). Para estimar a condição higiênica durante as etapas de produção do leite na fazenda são analisadas a CBT e a contagem de grupos de micro-organismos presentes no leite de tanque (JAYARAO et al., 2004), tais como a CP, a CC e a contagem dos micro-organismos causadores de mastite (ELMOSLEMANY et al., 2010). A contagem de grupos específicos de bactérias é importante para os programas de controle de qualidade (GODIČ TOROKAR; GOLC TEGER, 2008), pois a presença desses

grupos de micro-organismos no tanque indica a provável fonte de contaminação e auxilia na busca por possíveis soluções (BAVA et al., 2011).

2.3.1 Contagem bacteriana total

A CBT é um dos principais indicadores internacionalmente utilizados para definir a qualidade e a segurança do leite cru (BRASIL, 2011; PANTOJA et al., 2012). Para que seja considerado livre de perigos para a saúde humana é desejável que o leite do tanque apresente baixa CCS e CBT (INGHAM et al., 2011), que esteja livre de antibióticos e de micro-organismos patogênicos (JAYARAO et al., 2004). A CBT elevada pode desencadear uma série de problemas para a qualidade do leite e seus derivados, com a diminuição do rendimento e da vida de prateleira dos produtos (PANTOJA et al., 2012).

Dentre as formas de avaliação da qualidade do leite, a CBT é de interesse tanto para os produtores quanto para a indústria, pois é um indicativo da sanidade do rebanho, das condições sanitárias da propriedade e do equipamento de ordenha, das condições higiênicas e da temperatura de estocagem do leite (HAYES et al., 2001; BERRY et al., 2006). Entretanto, devido à ampla diversidade de fontes de contaminação (BRITO et al., 1998), a CBT em amostras de leite de tanque tem baixo valor para a identificação da fonte de contaminação (BAVA et al., 2011).

Em nível de fazenda, as principais fontes de contaminação do leite são a proliferação de bactérias sobre a superfície do equipamento de ordenha ou tanque não adequadamente higienizado, o uso de água não tratada para a limpeza do equipamento de ordenha, a contaminação de tetos e úberes sujos, a presença de animais com mastite (JAYARAO; WOLFGANG, 2003; ELMOSLEMANY et al., 2009a), além do tempo e da temperatura de armazenamento, que podem favorecer a multiplicação dos micro-organismos, elevar a CBT e comprometer a qualidade do leite (RYSANEK et al., 2009).

Quando o processo de limpeza do equipamento de ordenha e do tanque não é adequado, os resíduos de leite ou de água contaminada sob a superfície dos equipamentos favorecem a proliferação de micro-organismos deteriorantes (BAVA et al., 2011). Com a passagem do leite da ordenha subsequente, estes micro-organismos entram em contato com o leite e são levados para o tanque (KELLY et al., 2009). Neste caso, se o leite não for resfriado

adequadamente, haverá multiplicação dos micro-organismos no tanque e aumento da CBT (BARBANO et al., 2006. Supplement, 1; INGHAM et al., 2011).

A condição higiênica das vacas é essencial para a produção de leite de alta qualidade (ZUCALI et al., 2011), pois a presença de vacas com tetos e úbere sujos na ordenha favorece a contaminação do leite (BRITO et al., 1998) e eleva o risco de infecções intramamárias (SCHREINER; RUEGG, 2003) por patógenos contagiosos e ambientais (RUEGG, 2003a). Para diminuir o risco de contaminação pelos tetos e úbere é preciso manter a cama e o ambiente das vacas limpos e secos (DE PINHO MANZI et al., 2012) e higienizar os tetos adequadamente antes da ordenha (ELMOSLEMANY et al., 2009b).

No material da cama podem ser encontrados tanto micro-organismos gram-positivos, quanto gram-negativos, tais como estreptococos ambientais, *Klebsiella* e outros coliformes (PADUCH et al., 2013). Estes micro-organismos podem ser oriundos do solo, das fezes dos animais ou ainda do úbere de vacas infectadas (BARKEMA et al., 2009). Se os tetos não forem limpos e secos adequadamente, estas bactérias podem contaminar o leite durante a ordenha, elevando a CBT do tanque. No entanto, o aumento da CBT depende tanto do grau de contaminação, quanto das práticas de higiene antes da ordenha (ELMOSLEMANY et al., 2009b).

A presença de animais com mastite no rebanho pode contribuir para a elevação da CBT do leite de tanque (KELLY et al., 2009) devido à contaminação do leite pelos patógenos causadores da mastite (PANTOJA et al., 2009). A influência da mastite sobre a CBT do tanque depende do tipo de micro-organismo causador da mastite, do estágio de infecção e da porcentagem de animais infectados no rebanho. Os micro-organismos causadores da mastite que mais influenciam a CBT são *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* coagulase negativa e coliformes (RYSANEK et al., 2009).

A legislação brasileira recomenda que o leite seja resfriado a 4° C imediatamente após a ordenha e seja processado até 48 horas após a ordenha (BRASIL, 2011). O resfriamento rápido do leite cru reduz a proliferação dos micro-organismos contaminantes, entretanto, favorece a multiplicação de bactérias que se desenvolvem em baixas temperaturas (psicrotróficas) (BARBANO et al., 2006. Supplement, 1; YAGOUB et al., 2008). Para evitar a proliferação desse grupo de micro-organismos recomenda-se que o tempo de estocagem do leite não seja superior a 48 horas (BRASIL, 2011), pois, embora os psicrotróficos não resistam à temperatura de pasteurização, estas bactérias sintetizam enzimas termo-resistentes que deterioram o leite e diminuem a vida de prateleira dos derivados lácteos (BAVA et al., 2011).

No leite de tanque, podem ser encontradas espécies de micro-organismos ambientais, como *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus bovis*, coliformes e leveduras (BRITO et al., 1998), e bactérias contagiosas como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (KELLY et al., 2009). A presença destes micro-organismos pode ser resultado de infecção intramamária, ou devido à contaminação após a ordenha no caso dos micro-organismos ambientais (BRITO et al., 1998). A maioria destas bactérias não é patogênica, entretanto, podem ser encontrados alguns gêneros que podem causar surtos de doenças, tais como *Campylobacter*, *Escherichia*, *Salmonella* e *Yersinia* (BERRY et al., 2006) além das espécies *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* que podem causar intoxicação alimentar (KELLY et al., 2009).

Para aumentar a segurança dos produtos lácteos, todo leite comercializado deve ser pasteurizado (JAYARAO et al., 2006; BRASIL, 2011), pois, quando a CBT do leite de tanque está dentro dos limites estabelecidos pela legislação (PANTOJA et al., 2009), a pasteurização é efetiva contra os principais micro-organismos patogênicos (NÖRNBERG et al., 2010). Surtos de doenças de origem alimentar estão mais comumente associados à presença de micro-organismos como *Salmonella*, *Listeria* e *Escherichia coli* e podem ocorrer quando há falhas no processo de pasteurização ou quando ocorre contaminação após a pasteurização (VAN KESSEL et al., 2004).

2.3.2 Contagem de psicotróficos

As bactérias psicotróficas são as que se proliferam rapidamente em temperaturas de refrigeração, mas podem se multiplicar em faixas de temperatura de 0° a 20° C, independentemente do ponto ótimo de proliferação (MARTH; STEELE, 2001). Estes micro-organismos podem produzir odor e sabor indesejáveis, além de sintetizar enzimas termo estáveis que resistem à temperatura de pasteurização e causam degradação do leite e redução da vida de prateleira dos produtos lácteos (ELMOSLEMANY et al., 2010).

As bactérias psicotróficas pertencem a diversos gêneros, sendo que as principais encontradas no leite incluem as gram-negativas *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium* e as gram-positivas *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Microbacterium* (CEMPÍRKOVÁ, 2002). Alguns gêneros de bactérias

isoladas do leite podem apresentar características tanto de psicrotróficas quanto de termodúricas: *Bacillus* gram-positivo, *Clostridium*, *Microbacterium*, *Micrococcus* e *Corynebacterium* (MARTH; STEELE, 2001).

As bactérias psicrotróficas mais comumente encontradas no leite de tanque são pertencentes ao gênero *Pseudomonas* spp., sendo *Pseudomonas fluorescens* a espécie mais prevalente (PINTO et al., 2006; MARCHAND et al., 2008). Esta espécie de bactéria produz enzimas termotolerantes que degradam a gordura e a proteína do leite (WANG; JAYARAO, 2001). Na fase de crescimento exponencial, em temperaturas de 4° C, estas bactérias sintetizam enzimas capazes de hidrolisar toda a caseína disponível em peptídeos solúveis, que deixam o leite com sabor amargo (PERKO, 2011).

Bacillus spp. podem ser muitas vezes encontrados no leite cru na forma esporulada ou não esporulada (CHRISTIANSSON et al., 1999). Em temperaturas de refrigeração, estas bactérias se proliferam e sintetizam enzimas (GARCÍA-ARMESTO; SUTHERLAND, 1997) que reduzem a qualidade do leite (SVENSSON et al., 2006). Na forma esporulada, estes micro-organismos não são inativados pela pasteurização (FRANK; YOUSEF, 2004), podendo ser encontrados também no leite pasteurizado e derivados lácteos. Por este motivo, a presença de *Bacillus* spp. é uma das principais causas de deterioração dos produtos lácteos processados (BARTOSZEWICZ et al., 2008).

Os micro-organismos psicrotróficos são amplamente distribuídos no ambiente, podendo ser encontrados na água não tratada, no solo, na vegetação e na pele dos tetos e úbere (ELMOSLEMANY et al., 2009b). A contaminação do leite pode ocorrer pela presença de vacas com tetos e úbere sujos durante a ordenha, pelo uso de água contaminada na limpeza dos equipamentos de ordenha ou por falhas na higienização do tanque e da ordenhadeira (CEMPÍRKOVÁ; MIKULOVÁ, 2009).

Quando a higiene dos equipamentos de ordenha não é adequada, as superfícies internas podem ter resíduos de leite que são usados como substrato para a proliferação dos micro-organismos presentes na água de limpeza contaminada (BAVA et al., 2011; SIMOJOKI et al., 2012). A população de bactérias deteriorantes forma biofilmes, que mantém os micro-organismos presos à superfície dos equipamentos de ordenha ou do tanque (TEH et al., 2011). Com a passagem do leite da ordenha subsequente, parte das bactérias é carregada para o tanque, contaminando o leite produzido (BAVA et al., 2011).

O tempo necessário para que o leite atinja a temperatura de estocagem (4° C) e o tempo de armazenamento até a pasteurização são fatores adicionais que influenciam a velocidade de proliferação dos psicrotróficos e a síntese de lipases e proteases

(CEMPÍRKOVÁ; MIKULOVÁ, 2009). Os micro-organismos psicrotróficos podem se multiplicar no leite resfriado durante o armazenamento na fazenda ou no laticínio e durante o transporte para a indústria (CEMPÍRKOVÁ, 2002). O aumento do tempo de estocagem do leite associado com a temperatura de refrigeração favorece a proliferação desse grupo de micro-organismos, principalmente *Pseudomonas* spp. (PERKO, 2011).

Para estimar o grau de contaminação do leite pelos micro-organismos psicrotróficos (ELMOSLEMANY et al., 2010) e para prever a vida de prateleira do leite e derivados é realizada a contagem de bactérias psicrotróficas (CP) (FRANK; YOUSEF, 2004). Embora a maioria dos micro-organismos presentes no leite cru seja inativada durante a pasteurização (NÖRNBERG et al., 2011), estima-se que quando a CP está acima de 1.000.000 UFC/mL há redução da qualidade e da vida de prateleira dos produtos lácteos (FRANK; YOUSEF, 2004; CEMPÍRKOVÁ; MIKULOVÁ, 2009), pois algumas espécies de bactérias psicrotróficas sintetizam enzimas extracelulares capazes de resistir à temperatura de pasteurização (TEH et al., 2011).

Enzimas lipolíticas e proteolíticas estão presentes tanto no leite cru oriundo de vacas sadias quanto no leite de vacas com mastite (DATTA; DEETH, 2001). Estas enzimas, de origem endógena, são produzidas nas células do tecido mamário, no plasma sanguíneo ou nos leucócitos (LEITNER et al., 2006). A produção dessas enzimas está relacionada com a fase de lactação, a qualidade dos alimentos oferecidos às vacas e ao aumento da CCS (CEMPÍRKOVÁ et al., 2009).

Em geral, vacas no final da lactação apresentam maior concentração de substâncias que ativam a produção de enzimas proteolíticas. O aumento da concentração de proteases eleva a taxa de hidrólise das proteínas lácteas (DATTA; DEETH, 2001). Com o aumento da CCS há elevação da síntese de enzimas lipolíticas e proteolíticas endógenas e bacterianas (CEMPÍRKOVÁ et al., 2009). As lipases e proteases de origem endógena encontram-se aumentadas em resposta ao aumento dos leucócitos na glândula mamária durante a infecção e pelo aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos. Além disso, também ocorre o aumento da produção das lipases e proteases de origem bacteriana que estão diretamente relacionadas com a elevação do número de bactérias (FORSBÄCK et al., 2011).

As enzimas lipolíticas e proteolíticas de origem endógena estão presentes em quantidade insuficiente para causar alterações nos componentes do leite. Além disso, as enzimas endógenas não são termo-resistentes e são inativadas durante a pasteurização do leite (CEMPÍRKOVÁ; MIKULOVÁ, 2009). As principais alterações do leite ocorrem quando há

alta CP e, conseqüentemente, aumento na concentração de enzimas de origem bacteriana (GOMASHE et al., 2012).

As lipases são responsáveis pela degradação da gordura do leite (CEMPÍRKOVÁ, 2002), que é encontrada na forma de glóbulos envoltos por camada de proteínas, fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e glicerídios (HAUG et al., 2007). Esta membrana pode ser rompida pela ação mecânica ou enzimática (CEMPÍRKOVÁ et al., 2009). Com a quebra desta camada, as lipases microbianas tem acesso aos triglicerídios, que são hidrolisados pela ação dessas enzimas, originando ácidos graxos livres (FERNANDES et al., 2007). Como resultado da ação das lipases, há o aparecimento de sabor rançoso no leite e seus derivados (CEMPÍRKOVÁ; MIKULOVÁ, 2009).

As proteinases termoestáveis produzidas pelas bactérias psicrotróficas presentes no leite cru podem aumentar a viscosidade no leite UHT (*Ultra High Temperature*) (GOMASHE et al., 2012), diminuindo a sua vida de prateleira (FORSBÄCK et al., 2011). A gelificação, ou aumento da viscosidade do leite UHT, ocorre pela interação das proteínas do soro, principalmente a β -lactoglobulina, com a κ -caseína, que é liberada das micelas de caseína pelas proteinases dos psicrotróficos, formando os $\beta\kappa$ -complexos. Para evitar a alteração da viscosidade do leite UHT é necessário utilizar leite com baixa CBT e principalmente com baixa CP, além da necessidade de processamento do leite por até 48 horas e de armazenamento sob refrigeração a 4° C (BRASIL, 2011). Essas medidas minimizam a proliferação de micro-organismos psicrotróficos e, conseqüentemente, a síntese de proteinases (DATTA; DEETH, 2001).

2.3.3 Contagem de coliformes totais

O grupo dos coliformes compreende as bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas, gram-negativas, não formadoras de esporos e que fermentam a lactose com produção de ácidos e gás em temperatura entre 32° C e 35° C (DAVIDSON et al., 2004). As bactérias gram-negativas são classificadas como patógenos ambientais da mastite (HOGAN; SMITH, 2003) e são comumente associadas com a forma clínica da doença, porém, a proporção de coliformes dentre os patógenos causadores de casos clínicos pode variar de menos de 20% a mais de 60% (KAIPAINEN et al., 2002). A presença de coliformes nos produtos lácteos

indica falhas de higiene durante a produção, o processamento e a estocagem do leite (COTON et al., 2012).

A CC é uma ferramenta utilizada para avaliar as boas práticas de produção, tais como a refrigeração do leite, a limpeza e sanitização do equipamento de ordenha e a higiene e preparação do úbere antes da ordenha (PANTOJA et al., 2011). Além disso, é também utilizada para mensurar a qualidade sanitária do processamento do leite cru a fim de minimizar a contaminação bacteriana dos produtos lácteos (BAVA et al., 2011). Uma elevada CC indica práticas de produção com baixa higiene e/ou inadequada preparação da vaca para a ordenha (ELMOSLEMANY et al., 2010).

Os principais micro-organismos pertencentes ao grupo dos coliformes são dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (HOGAN; SMITH, 2003), sendo *Escherichia coli* uma das espécies mais comumente encontradas. *Escherichia coli* pode apresentar estirpes patogênicas, que podem causar infecções tanto em humanos quanto em animais, e estirpes não patogênicas (BLUM et al., 2008). Outras bactérias gram-negativas não coliformes frequentemente isoladas de infecções intramamárias incluem as dos gêneros *Serratia*, *Pseudomonas* e *Proteus* (HOGAN; SMITH, 2012).

Os coliformes estão presentes no trato intestinal das vacas (SHPIGEL et al., 2008) e são comumente encontrados nas fezes, no material das camas, no solo e na água dos reservatórios, que pode ser contaminada pela presença de roedores, pássaros, insetos e poeira (JAYARAO et al., 2004). Estes micro-organismos podem entrar em contato com o leite cru pela contaminação do equipamento de ordenha com a água, pelo contato com os tetos não higienizados corretamente (ZUCALI et al., 2011) ou pela presença de vacas com mastite causada por coliforme no rebanho (BARKEMA et al., 2009). Algumas espécies de bactérias gram-negativas classificadas como ambientais estão mais adaptadas ao hospedeiro e têm se comportado como patógenos contagiosos (BARKEMA et al., 2009; RUEGG, 2012). A adaptação dessas bactérias possibilita a sua proliferação no interior da glândula mamária e pode elevar a CC no leite de tanque (BLUM et al., 2008).

A elevação da CC está associada com o aumento do escore de sujidade dos tetos e das pernas das vacas (ELMOSLEMANY et al., 2009b). A correta sanitização dos tetos é essencial para produzir leite de alta qualidade (GLEESON et al., 2013). O uso de sanitizantes antes e após a ordenha dificulta o acesso de micro-organismos ao equipamento de ordenha e ao canal do teto (HOGAN; SMITH, 2003) e pode reduzir até 75% da população de bactérias na superfície dos tetos (ZUCALI et al., 2011).

Fatores relacionados com a sanitização do equipamento de ordenha, tais como a temperatura e a qualidade da água, o tempo de contato, a concentração do detergente e a turbulência são importantes para o controle da CC no leite de tanque (ELMOSLEMANY et al., 2009b; BAVA et al., 2011). A capacidade dos coliformes de permanecerem incubados em biofilmes nos equipamentos de ordenha com higiene imprópria pode elevar a CC do leite de tanque (ZUCALI et al., 2011). A adesão dos micro-organismos na superfície dos equipamentos de ordenha ou do tanque ocorre quando há falhas na higienização (SANTOS et al., 2013) e presença de resíduos de leite ou de água de limpeza no interior dos equipamentos de ordenha (SANTOS et al., 2013). A limpeza e sanitização da ordenhadeira é uma combinação de processos químicos, térmicos e físicos que necessitam de um tempo mínimo para correta ação (BAVA et al., 2011).

Durante o pré-enxágue é removida a maioria dos resíduos do leite e a temperatura da água deve estar entre 38° C e 55° C. No ciclo de limpeza propriamente dito, o detergente alcalino remove os resíduos orgânicos, como a gordura e a proteína do leite. Nesta fase, a temperatura da água deve ser entre 60° C e 73° C. O detergente ácido é usado para remover os resíduos minerais da água e do leite (GLEESON et al., 2013). A turbulência da circulação da água garante a correta distribuição da solução de detergente em todo o equipamento de ordenha para a remoção dos resíduos. Quando há falhas no processo de limpeza do equipamento de ordenha, o leite residual pode se tornar fonte de nutrientes para os micro-organismos, que se proliferam no intervalo entre ordenhas e entram em contato com o leite na ordenha subsequente (BAVA et al., 2011).

Quando a CBT do leite cru está dentro dos limites exigidos pela legislação, a maioria dos coliformes é destruída com a pasteurização. Porém, se houver alguma falha durante a pasteurização (PANTOJA et al., 2011), ou se o leite for consumido sem tratamento térmico (COTON et al., 2012), estes micro-organismos podem causar a deterioração do leite (GAUCHER et al., 2008) e ser a causa de doenças nos consumidores (BLUM et al., 2008; PEARCE et al., 2012).

Alguns micro-organismos do grupo dos coliformes, tais como *Klebsiella* e *Citrobacter*, são psicrotróficos e podem afetar negativamente a qualidade dos produtos lácteos pela alteração do sabor como resultado da deterioração dos componentes (COTON et al., 2012). Em temperatura de refrigeração, a quantidade dessas bactérias no tanque pode aumentar entre 100 e 1000 vezes (PANTOJA et al., 2011).

A melhoria da qualidade higiênica do leite é demandada por parte dos produtores devido às maiores exigências dos laticínios e do mercado consumidor (PANTOJA et al.,

2011). Os esforços para a produção de leite de alta qualidade incluem ações em todas as etapas de produção e de processamento do leite. Estas ações incluem a adoção de adequadas práticas de manejo em nível de fazenda, com controle mais rigoroso dos fatores que podem interferir na qualidade do leite produzido (LERICHE; FAYOLLE, 2012).

2.4 Composição do leite

A análise da composição do leite é uma ferramenta que deve ser utilizada para o gerenciamento de rebanhos leiteiros (SRAÏRI et al., 2009; FORSBÄCK et al., 2010a), pois é um dos principais fatores para avaliação da qualidade do leite produzido (BRANDT et al., 2010). A qualidade dos produtos lácteos depende da qualidade do leite cru e dos principais componentes: proteína e gordura (SRAÏRI et al., 2009). A análise periódica dessas variáveis fornece informações sobre problemas que podem afetar a produção e a qualidade do leite (FORSBÄCK et al., 2010a).

O leite bovino é um produto complexo (GAUCHER et al., 2008), rico em nutrientes e com pH 6,7 - 6,9 (FRICKER et al., 2011). É composto por aproximadamente 87% de água e entre 12% e 13% de sólidos (NASCIMENTO et al., 2013), que incluem lipídios, proteínas, carboidratos, aminoácidos, vitaminas e minerais (HILL et al., 2012). A porcentagem dos componentes sólidos do leite depende de vários fatores, tais como a raça, o estágio de lactação, o estado fisiológico (GAUCHER et al., 2008), a composição da dieta (SRAÏRI et al., 2009) e a eficiência e frequência de ordenha (FORSBÄCK et al., 2010a) além da sanidade do rebanho (FORSBÄCK et al., 2010b).

Vacas de raças que produzem maior quantidade de leite apresentam menores teores de gordura e proteína em relação às vacas de raças menos especializadas na produção de leite (LANDI et al., 2011). Isto ocorre pela diminuição da concentração dos componentes pela maior produção de leite (FORSBÄCK et al., 2009). O leite de vacas da raça Holandesa apresenta em média 3,5% de gordura e 3,1% de proteína, enquanto que vacas da raça Jersey produzem leite com média de 5,5% de gordura e 3,9% de proteína. O leite de vacas zebuínas apresenta média de 4,9% de gordura e 3,9% de proteína (JENSEN, 1995).

No final da lactação, a concentração de proteína, caseína e gordura do leite aumentam em relação ao início da lactação. Com o avanço da lactação, a produção de leite diminui pelo decréscimo do número de células secretoras da glândula mamária (AULDIST et al., 1998) e

como resultado, os componentes do leite ficam mais concentrados, sendo observado aumento dos teores de sólidos no leite (FORSBÄCK et al., 2009).

Diversas alterações fisiológicas ocorrem no início da lactação. Neste período, mudanças metabólicas e endócrinas mobilizam gordura corporal e desviam metabólitos para a glândula mamária para fornecer substratos para a síntese de leite (VAN STRATEN et al., 2009). Vacas com escore de condição corporal ao parto próximo a 3,5 mobilizam maior quantidade de reservas corporais após o parto, o que contribui para o fornecimento de maior quantidade de nutrientes para a síntese de leite (RENNÓ et al., 2006) e para o menor déficit de energia (BRANDT et al., 2010) e conseqüentemente, para a elevação da produção de leite e dos teores de sólidos (RENNÓ et al., 2006).

Os teores de gordura e proteína do leite estão diretamente relacionados com os teores de energia e a composição da dieta (BRANDT et al., 2010). Vacas alimentadas com dietas com baixo teor de fibra, alto teor de amido ou grande quantidade de gordura insaturada geralmente produzem leite com menor teor de gordura (PALMQUIST; MATTOS, 2011). A síntese de proteína microbiana (principal fonte de proteína para ruminantes) é reduzida quando há déficit de energia e, como resultado é observada diminuição do teor de proteína do leite (BRANDT et al., 2010).

Como a composição do leite está diretamente ligada às condições nutricionais das vacas, os teores de gordura e proteína podem ser utilizados para o monitoramento da dieta oferecida (BRANDT et al., 2010). Devido às variações na concentração de gordura e proteína do leite durante a lactação, a razão entre os teores de gordura e proteína do leite é utilizada como um indicador do estado metabólico da vaca. Se a razão gordura:proteína estiver entre 1,2 e 1,4 é um indicativo de balanço energético positivo. Acima de 1,4 indica que há alto risco da vaca desenvolver cetose e valores abaixo de 1,1 pode indicar acidose ruminal (CEJNA; CHLÁDEK, 2005).

A eficiência do equipamento de ordenha também pode influenciar no teor de gordura do leite (FORSBÄCK et al., 2010a). O leite contido na cisterna da glândula mamária é prontamente removido com a colocação do conjunto de ordenha (WATTERS et al., 2012) e apresenta menor concentração de sólidos em relação ao leite alveolar. Se o processo de ordenha não é eficiente, parte do leite contido nos alvéolos da glândula mamária não é removido e o leite pode apresentar menores teores de gordura e proteína (TANCIN et al., 2007; FORSBÄCK et al., 2010a).

A gordura representa de 3,0% a 5,0% da composição do leite e se encontra na forma de glóbulos emulsionados na fase aquosa (HAUG et al., 2007). Na região central dos glóbulos

são encontrados lipídios como os triacilgliceróis, e os ésteres de colesterol e de retinol, que são revestidos com uma camada de fosfolipídios ou proteínas (JENSEN, 2002). Os triacilgliceróis correspondem a aproximadamente 95% da gordura do leite (BLOWEY; EDMONDSON, 2010) e são formados por três ácidos graxos ligados a um éster e uma molécula de glicerol (KELLY, 2010).

Os lipídios do leite de ruminantes são compostos por ácidos graxos de cadeia curta e baixa quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PALMQUIST; MATTOS, 2011). Os ácidos graxos presentes no leite podem ser oriundos da gordura corporal, da dieta ou podem ser sintetizados na glândula mamária (WALSTRA; JENNESS, 2002). A gordura corporal é a principal fonte de ácidos graxos para o leite e é um dos determinantes do teor de gordura do leite e do perfil de ácidos graxos (BLOWEY; EDMONDSON, 2010). O uso de gordura protegida na dieta das vacas é a principal fonte de ácidos graxos de cadeia longa do leite bovino (BLOWEY; EDMONDSON, 2010; FORSBÄCK, 2010). A síntese de ácidos graxos pela glândula mamária ocorre pela síntese *de novo*, que utiliza o acetato, produto da fermentação ruminal, para a síntese de ácidos graxos de cadeia curta (FORSBÄCK, 2010).

Em vacas com mastite é observada menor síntese de gordura na glândula mamária (FORSBÄCK, 2010) e aumento da síntese de enzimas lipolíticas tanto de origem endógena, pelo aumento do número de leucócitos, quanto de origem bacteriana. No leite oriundo de vacas com mastite, a atividade de enzimas lipolíticas é aumentada. Como resultado, é observada elevação da concentração de ácidos graxos livres, que pode causar alteração sensorial, com surgimento de sabor de ranço (FORSBÄCK et al., 2010b).

O teor de proteína do leite varia entre 3,0% e 3,6% da composição do leite (FORSBÄCK, 2010). As principais proteínas encontradas no leite são as caseínas (α -caseína, β -caseína e κ -caseína) enquanto que no soro do leite, as proteínas predominantes são a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina (ÅKERSTEDT et al., 2012). As caseínas são sintetizadas na glândula mamária pelas células alveolares a partir de aminoácidos transportados pela corrente sanguínea para o úbere (BLOWEY; EDMONDSON, 2010).

As infecções bacterianas podem afetar a composição do leite de forma direta e indireta (ÅKERSTEDT et al., 2012). Diretamente, as bactérias podem secretar enzimas extracelulares, as quais hidrolisam os componentes do leite. Indiretamente, podem ativar o sistema imune da vaca, o qual resulta no aumento da passagem de componentes do sangue para o leite (LEITNER et al., 2006).

No leite de vacas com mastite é observada diminuição da relação entre o teor de caseína e o teor de proteína total (FORSBÄCK et al., 2009). Isto ocorre devido à redução na concentração de caseínas, pela diminuição da síntese e pela degradação por enzimas proteolíticas de origem endógena e bacteriana (FORSBÄCK et al., 2010b; ÅKERSTEDT et al., 2012), e ao aumento dos níveis de proteínas séricas como resultado do aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos (MOTTRAM et al., 2007).

A composição proteica do leite pode ser influenciada pelos diferentes patógenos causadores da mastite (LEITNER et al., 2006). O leite de vacas infectadas com *Streptococcus uberis* e *Streptococcus agalactiae* apresenta maior degradação da caseína em relação às vacas infectadas por outros patógenos da mastite (ÅKERSTEDT et al., 2012). Isto pode ocorrer, pois estas bactérias causam grande elevação na CCS (DENIS et al., 2009), o que resulta em maior degradação da caseína (FORSBÄCK et al., 2010b).

O teor de lactose pode variar de 4,7% a 5,1% no leite de vacas sadias dependendo da raça da vaca (JENSEN, 1995). A principal função da lactose é a regulação osmótica do leite e apresenta teor estável, porém, pode ser alterado em casos de mastite clínica ou subclínica (FORSBÄCK et al., 2010a). No leite oriundo de vacas com mastite é observado menor teor de lactose devido à redução de síntese (FORSBÄCK et al., 2010b) e ao aumento da permeabilidade dos capilares sanguíneos (MOTTRAM et al., 2007).

O leite bovino também é importante fonte de minerais e vitaminas (HAUG et al., 2007). Os principais minerais presentes no leite são o potássio, o cálcio, o sódio e o magnésio, além dos íons cloreto, sulfato, carbonato, fosfato e citrato. Embora presentes em pequena quantidade (entre 0,6% e 0,8%), os minerais possuem papel fundamental para a estabilização das micelas de caseína e auxiliam no equilíbrio osmótico do leite. Todas as vitaminas estão presentes no leite, no entanto, as vitaminas A e do complexo B são as que estão presentes em maior concentração (FORSBÄCK, 2010).

Diante disso, são importantes estudos que avaliam a composição do leite de tanque, uma vez que alterações na composição do leite afetam negativamente a produção de derivados lácteos. Mudanças na composição do leite afetam toda a cadeia agroindustrial, uma vez que com a diminuição dos teores de sólidos no leite, é observado menor rendimento para produção de queijo devido à menor coagulação do leite e à maior perda de gordura e caseína no soro (SANTOS et al., 2003; FORSBÄCK et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção dos rebanhos e coleta das amostras de leite

Para a realização do estudo foram selecionados rebanhos fornecedores de leite de um laticínio localizado na região Sul de Minas Gerais. O laticínio realizava um programa de pagamento por qualidade do leite, o que exigia monitoramento constante da composição e da contagem bacteriana total do leite. O sistema de pagamento do leite era baseado na média geométrica da CBT, da CCS e do teor de proteína da coleta de cinco amostras mensais do leite de tanque de todos os rebanhos. Além disso, o laticínio contava com um programa de treinamento e capacitação do motorista do caminhão para coleta de amostras de leite.

Durante o período de dois anos foram selecionados aleatoriamente, 230 rebanhos (115 em cada ano) com base na média geométrica da CCS de cinco amostras do leite de tanque. As coletas do segundo ano foram realizadas na mesma época do ano que a primeira fase do experimento (de agosto a novembro). Os rebanhos selecionados foram distribuídos em três grupos:

- a) Baixa CCS <250.000 células/mL (n = 84 rebanhos);
- b) Média CCS > 250.001 e <750.000 células/mL (n = 79 rebanhos);
- c) Alta CCS >750.001 células/mL (n = 67 rebanhos).

Durante o período de coleta de amostras de leite, os rebanhos selecionados foram amostrados duas vezes ao mês, durante três meses, totalizando seis coletas por rebanho, resultando em 1380 amostras durante todo o estudo (690 amostras em cada ano). As amostras de leite foram coletadas diretamente do tanque de expansão pelos motoristas de caminhão da empresa, após 5 a 10 minutos de agitação, em frascos estéreis sem conservantes para as análises microbiológicas (CBT, CP e CC) e em frascos com conservante bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol) para as análises de composição (gordura, proteína, sólidos totais e extrato seco desengordurado) e CCS. Após a coleta na fazenda, todas as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas a 4° C e levadas para o local de recepção das amostras do laticínio. As amostras de leite sem conservante foram congeladas a -20° C e levadas ao Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite da FMVZ – USP (Qualileite) para realização de análises microbiológicas em um período máximo de sete dias a partir da data da coleta na

fazenda. As amostras para análises de composição e CCS foram enviadas ao Laboratório de Fisiologia da Lactação da ESALQ – USP (Clínica do Leite) Piracicaba-SP.

3.2 Análises microbiológicas do leite

Para a determinação da CBT e da CP, as amostras de leite foram descongeladas e mantidas a 4° C. Após agitação vigorosa em vortex por 15 segundos, as amostras foram diluídas em água peptonada tamponada 1% (Peptone Water Buffered, Merck) na proporção 1:10 (Figura 1). Foram inoculadas alíquotas de 50 µL em placas de Petri com meio PCA (Plate Count Agar, OXOID CM0325), meio de cultura padrão para contagem, utilizando-se o sistema de plaqueamento automático (Spiral Plater-ID-DS Plus, Interscience, França) (LAIRD et al., 2004) (Figura 2). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 32° C ($\pm 1^\circ$ C) por 48 horas (± 2 horas) para determinação da CBT e a 12° C por sete dias para a determinação da CP (FDA, 2001; LAIRD et al., 2004). Para determinação da CBT e da CP foram contadas todas as colônias das placas em contador de colônias automático (SCAN 1200-ID, Interscience, França) (Figura 3).

Figura 1 - Diluição de amostras para plaqueamento automático para determinação da CBT e da CP

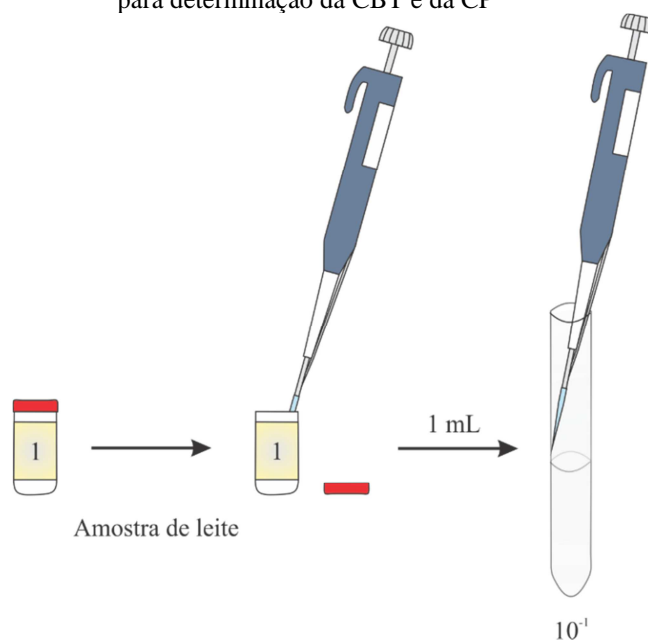


Figura 2 - (A) Placas com meio PCA inoculadas; (B) e (C) equipamento para plaqueamento automático Spiral Plater-ID-DS Plus, Interscience, França; (D) inoculação automática no equipamento Spiral Plater – ID-DS Plus

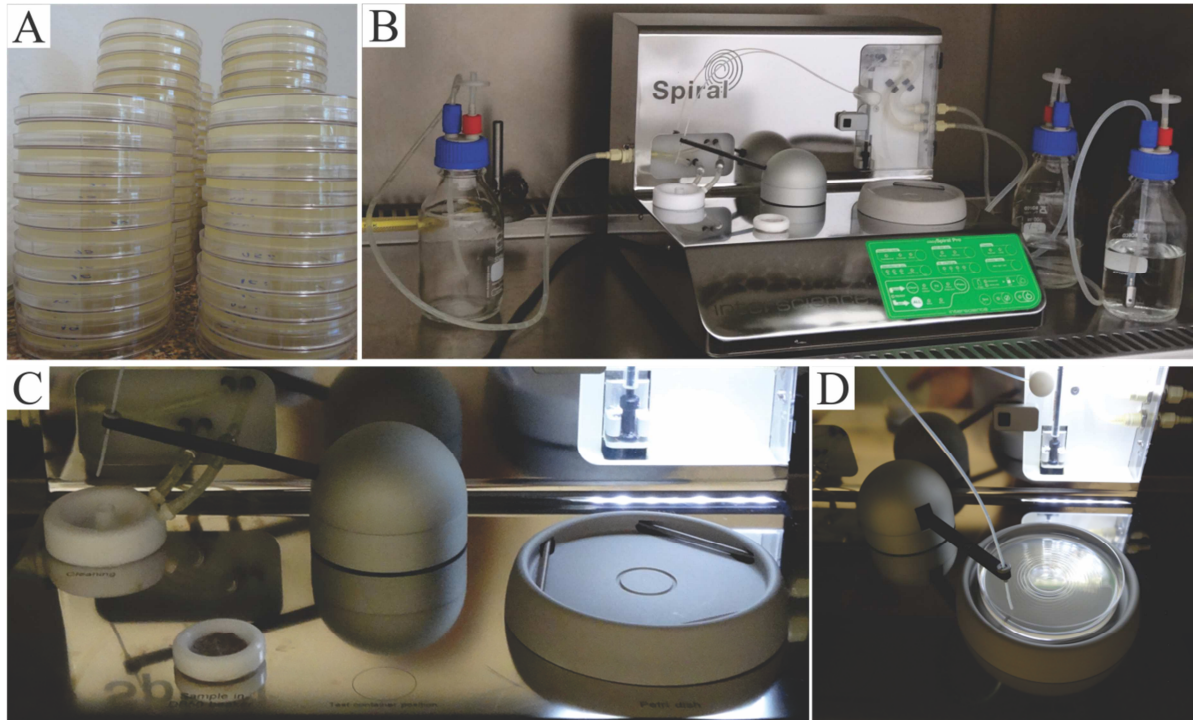
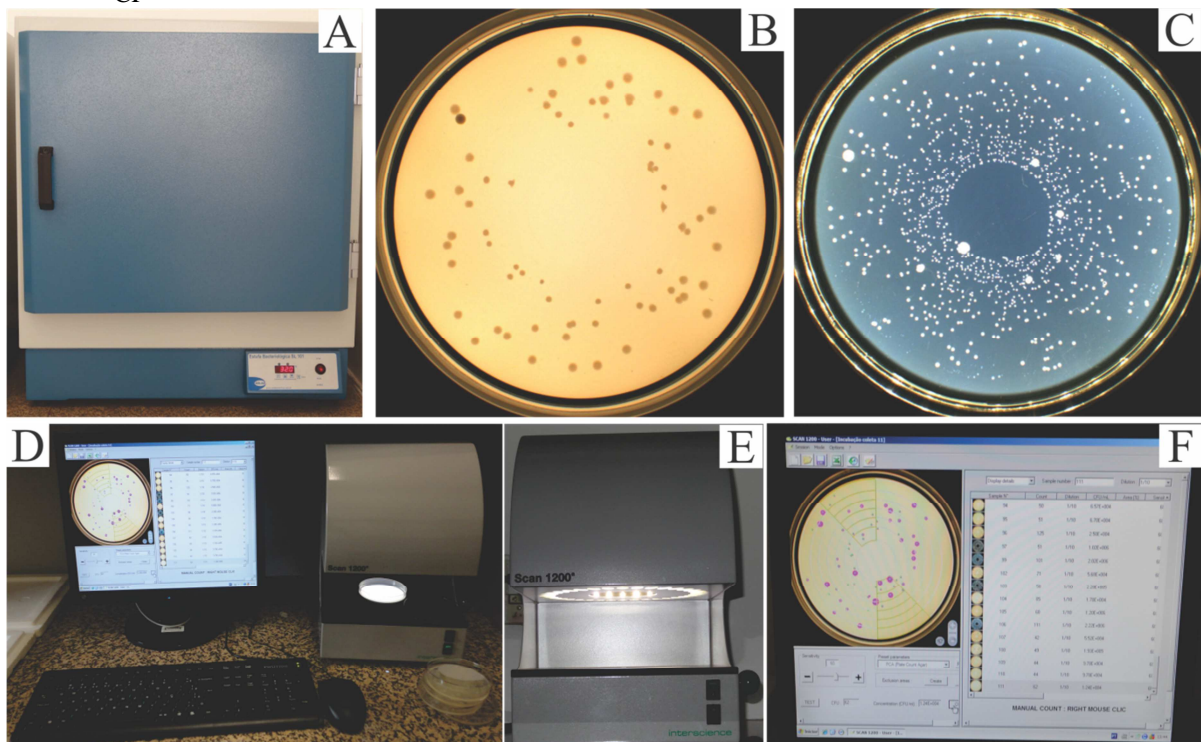


Figura 3 - (A) Estufa bacteriológica; (B) Placa com meio PCA para determinação da CBT; (C) Placa com meio PCA para determinação da PC; (D) Leitura das placas de CBT e CP; (E) Leitor automático de colônias SCAN 1200-ID, Interscience, França; (F) Imagem gerada para leitura das placas de CBT e CP



A contagem de coliformes totais foi determinada por semeadura de 1 mL da amostra em placas tipo Petrifilm (3M™ Petrifilm™ CC Count Coliform), após diluição em água peptonada tamponada 1% (Peptone Water Buffered, Merck) na proporção de 1:10, conforme metodologia descrita por Elmoslemany (2009b) (Figura 4). As amostras inoculadas em Petrifilm foram incubadas em estufa bacteriológica a 32°C por 24 horas (\pm 2 horas). A leitura foi realizada em um contador manual de colônias (Figura 5) e foram consideradas como coliformes totais todas as colônias vermelhas produtoras de gás (LAIRD et al., 2004).

Figura 4 - Inoculação das amostras em placas Petrifilm (3M™ Petrifilm™ CC Count Coliform) para contagem de coliformes totais

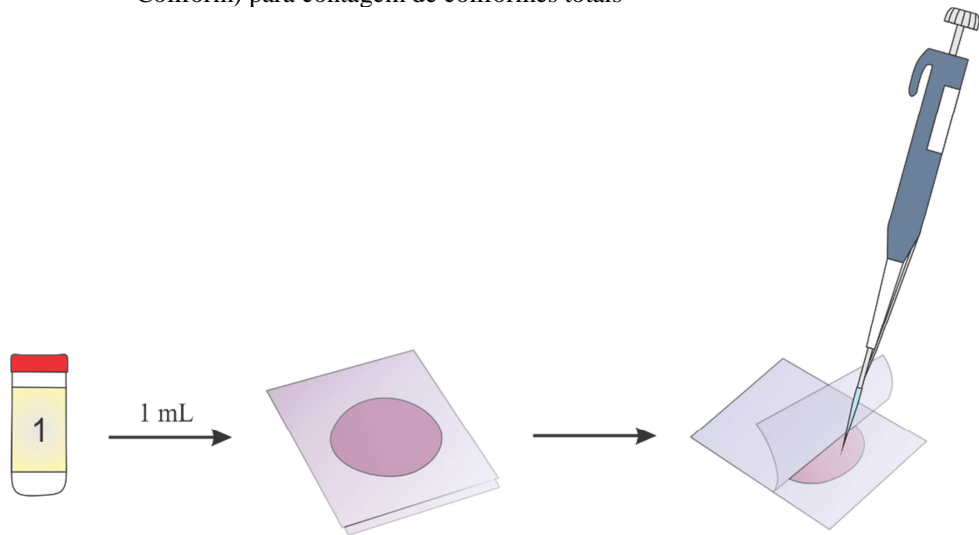
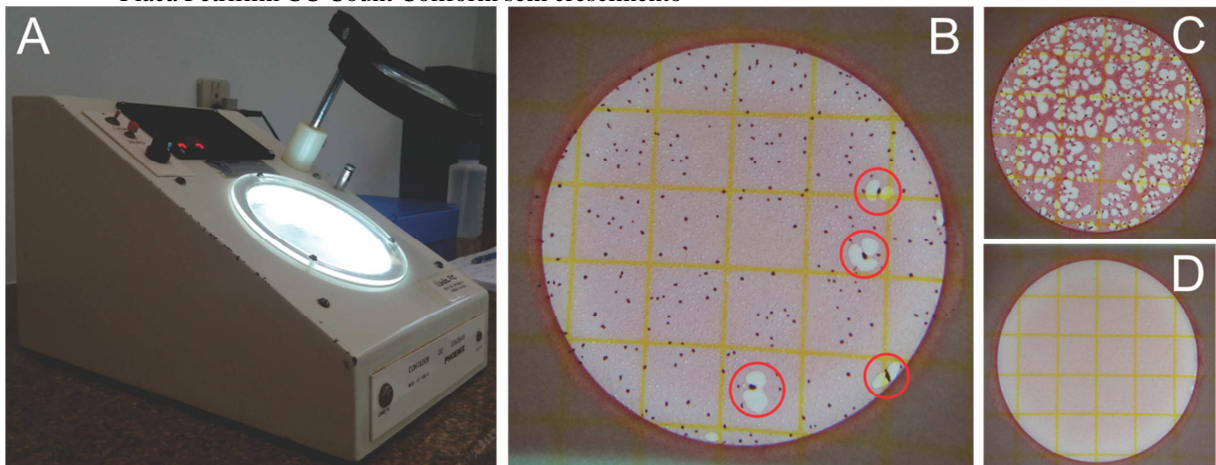


Figura 5 - (A) Contador de colônias manual; (B) 4 colônias de coliformes totais em placa Petrifilm CC Count Coliform; (C) Incontáveis colônias de coliformes totais em placa Petrifilm CC Count Coliform; (D) Placa Petrifilm CC Count Coliform sem crescimento



3.3 Determinação da composição do leite e contagem de células somáticas

Para as análises de composição do leite (gordura, proteína, sólidos totais e extrato seco desengordurado) e contagem de células somáticas as amostras coletadas em frascos contendo conservante bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol) foram enviadas ao Laboratório de Fisiologia da Lactação da ESALQ – USP (Clínica do Leite) num período máximo de cinco dias após a coleta na fazenda.

As concentrações de gordura, proteína, sólidos totais e extrato seco desengordurado foram analisados por absorção infravermelha, utilizando o equipamento MilkoScan FT+ (FOSS North America, Eden Praire, MN, USA). A contagem de células somáticas foi determinada por citometria de fluxo, no equipamento Fossomatic FC (Foss Eletric A/S. Hillerod, Denmark).

3.4 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados pelo programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2004), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo Teste F. Os resultados das análises microbiológicas (CBT, CP e CC) e de CCS foram convertidos para escala logarítmica. O efeito do tempo de coleta foi analisado pelo PROC MIXED do SAS. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Scheffé, que pode ser aplicado a qualquer número de contrastes e não exige balanceamento amostral. Foi utilizado um nível de significância de 5% para todos os testes realizados. Foi utilizado o seguinte modelo estatístico:

$$Y = \mu + CCS + T + e$$

Onde: Y = variável dependente;

μ = média da variável em questão;

CCS = efeito do nível de CCS: baixa CCS (< 250.000 células/mL), média CCS (> 250.001 e < 750.000 células/mL) ou alta CCS (> 750.001 células/mL);

T = Efeito do tempo de coleta

e = erro residual.

Foi utilizado o PROC CORR do SAS para avaliação da correlação de Pearson entre os indicadores de higiene (CBT, CP e CC) e as variáveis de composição do leite (gordura, proteína, sólidos totais e extrato seco desengordurado).

4 RESULTADOS

Os rebanhos selecionados eram predominantemente de baixa e média produção de leite, com número de animais em lactação bastante variável: de 10 até 750 vacas em lactação. No entanto, em aproximadamente 58% das fazendas havia até 50 vacas em lactação e em apenas 5% dos rebanhos havia mais de 400 vacas em produção. Na maioria dos rebanhos, as vacas eram das raças Holandesa e Girolanda. A produção média variou de 100 a mais de 10.000 kg por dia em média, sendo que aproximadamente 35% das fazendas tinham produção diária média de 500 a 1.000 kg e em apenas 5% a produção diária média era superior a 5.000 kg. Em aproximadamente 90% das fazendas as vacas eram alojadas em sistema de semi confinamento e em 10% das fazendas era utilizado o sistema de confinamento total. As vacas eram ordenhadas duas vezes ao dia em 83% dos rebanhos e em 9% das fazendas eram realizadas três ordenhas diárias. Quanto ao tipo de ordenha, em aproximadamente 70% das fazendas a ordenhadeira era do tipo canalizada, em 25% era do tipo balde ao pé e em 5% era realizada ordenha manual. Em 35% das fazendas havia 4 conjuntos de ordenha e em 20% havia mais de 8 conjuntos.

4.1 Análises microbiológicas do leite de tanque

As amostras de leite de tanque de 230 rebanhos leiteiros foram coletadas para avaliar o efeito da mastite subclínica bovina sobre a CBT, a CP e a CC. Nos rebanhos com CCS < 250.000 células/mL foram observadas menores CBT ($P = 0,0387$) e CC ($P = 0,0072$) em comparação com os rebanhos com CCS > 250.001 células/mL. Para a CP, não houve diferença entre os grupos de baixa, média e alta CCS. Foi observado efeito do tempo de coleta para todos os indicadores de higiene estudados (CBT: $P < 0,0001$; CP: $P < 0,0001$; CC: $P < 0,0001$) e para a CCS ($P = 0,0211$). Para a CBT ($P = 0,0305$) e a CC ($P = 0,0497$) foi observado efeito de interação entre grupo (baixa, média e alta CCS) e tempo de coleta (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias da contagem bacteriana total (CBT), contagem de psicotróficos (CP), contagem de coliformes (CC) e contagem de células somáticas (CCS) do leite de tanques de acordo com a CCS

Variável	n	CCS (x 1.000 células/mL)*			EPM	P		
		<250	>250 e <750	>750		CCS	T	CCS*T
Log CBT**	1180	4,44 ^a (129,9)	4,57 ^b (203,7)	4,66 ^b (159,4)	0,0218	0,0387	<0,0001	0,0305
Log CP **	1162	4,14 (83,0)	4,34 (144,2)	4,26 (160,9)	0,0246	0,0919	<0,0001	0,4441
Log CC ***	1190	1,00 ^a (163,0)	1,32 ^b (268,4)	1,28 ^b (323,4)	0,0295	0,0072	<0,0001	0,0497
Log CCS****	1235	2,25 ^a (204,6)	2,61 ^b (457,3)	2,94 ^c (974,4)	0,0097	<0,0001	0,0211	0,5817

EPM: Erro padrão da média; Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Scheffé ($\alpha=5\%$); CCS: classes de baixa, média e alta CCS; T: tempo de coleta; CCS*T: interação entre grupo e tempo de coleta.

*log₁₀ (dados não transformados); **10³ UFC/mL; ***UFC/mL; ****10³ células/mL

4.2 Composição do leite de tanque

Os teores de gordura, proteína, sólidos totais e extrato seco desengordurado foram determinados para a avaliação da influência da mastite subclínica bovina sobre a composição do leite de tanques. Os rebanhos com CCS > 250.001 células/mL apresentaram maiores teores de gordura ($P = 0,0048$), proteína ($P = 0,0029$) e sólidos totais ($P = 0,0173$) que os rebanhos com CCS < 250.000 células/mL. Foi observado efeito do tempo de coleta para todas as variáveis de composição do leite analisadas (gordura: $P < 0,0001$; proteína: $P < 0,0001$; sólidos totais: $P < 0,0001$; e ESD: $P = 0,0010$). Não foi observado efeito de interação entre os grupos de CCS (baixa, média e alta) e o tempo de coleta (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito do nível de CCS sobre as médias da composição do leite de tanques de rebanhos leiteiros

Variável (%)	n	CCS (x 1.000 células/mL)			EPM	P		
		<250	>250 e <750	>750		CCS	T	CCS*T
Gordura	1222	3,55 ^b	3,72 ^a	3,70 ^a	0,0099	0,0048	<0,0001	0,9499
Proteína	1230	3,16 ^b	3,22 ^a	3,23 ^a	0,0043	0,0029	<0,0001	0,5202
Sólidos totais	1225	12,28 ^b	12,45 ^a	12,39 ^a	0,0132	0,0173	<0,0001	0,9849
ESD	1232	8,73	8,73	8,68	0,0055	0,3745	0,0010	0,5408

EPM: Erro padrão da média; ESD: Extrato seco desengordurado; Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Scheffé ($\alpha=5\%$); CCS: classes de baixa, média e alta CCS; T: tempo de coleta; CCS*T: interação entre grupo e tempo de coleta.

4.3 Análise de correlação entre as variáveis de composição e os indicadores de higiene do leite de tanque

Para a avaliação da correlação entre os indicadores de higiene e a composição do leite de tanques foi calculado o coeficiente de correlação linear de Pearson, considerando-se $|r| > 0,7$: correlação alta; $0,3 < |r| < 0,7$: correlação média; e $|r| < 0,3$: correlação baixa. Houve correlação média e positiva nas comparações entre CBT e CP ($r = 0,6215$) (Figura 8) e entre CP e CC ($r = 0,3692$) (Figura 10). Foram obtidos coeficientes de correlação baixos e positivos para as comparações entre CCS e CBT ($r = 0,1632$) (Figura 9), CCS e CC ($r = 0,0681$), CCS e gordura ($r = 0,2217$) (Figura 6), CCS e proteína ($r = 0,2346$), CCS e sólidos totais, ($r = 0,1328$) (Figura 7) e entre CBT e CC ($r = 0,2949$) (Figura 8). Foram observadas correlações baixas e negativas para as comparações entre CCS e ESD ($r = -0,0818$), CBT e gordura ($r = -0,0585$) (Figura 9), CP e ST ($r = -0,0662$) e entre CP e gordura ($r = -0,0688$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Coeficientes de correlação entre os indicadores de higiene e de composição de leite de tanques

Variáveis		Log CBT	Log CP	Log CC	Log CCS	Gordura	Proteína	ST	ESD
Log CBT	r	-	0,6215	0,2949	0,1632	-0,0585	0,0098	-0,0488	-0,0172
	P	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0479	0,7396	0,0989	0,5602
Log CP	r	0,6215	-	0,3692	0,0511	-0,0688	-0,0160	-0,0662	-0,0414
	P	<0,0001	-	<0,0001	0,0848	0,0208	0,5902	0,0261	0,1630
Log CC	r	0,2949	0,3692	-	0,0681	-0,0478	-0,0360	-0,0549	-0,0313
	P	<0,0001	<0,0001	-	0,0204	0,1054	0,2213	0,0624	0,2878
Log CCS	r	0,1632	0,0511	0,0681	-	0,2217	0,2346	0,1328	-0,0818
	P	<0,0001	0,0848	0,0204	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0042
Gordura	r	-0,0585	-0,0688	-0,0478	0,2217	-	0,5306	0,9170	0,3713
	P	0,0479	0,0208	0,1054	<0,0001	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Proteína	r	0,0098	-0,0160	-0,0360	0,2346	0,5869	-	0,7232	0,7729
	P	0,7396	0,5902	0,2213	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001	<0,0001
ST	r	-0,0488	-0,0662	-0,0549	0,1328	0,9282	0,7232	-	0,6891
	P	0,0989	0,0261	0,0624	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001
ESD	r	-0,0172	-0,0414	-0,0313	0,1102	0,0042	0,7729	0,6891	-
	P	0,5602	0,1630	0,2878	0,1174	0,3713	<0,0001	<0,0001	-

CBT: contagem bacteriana total; CP: contagem de psicrotóxicos; CC: contagem de coliformes; CCS: contagem de células somáticas; ST: sólidos totais; ESD: extrato seco desengordurado.

Figura 6 - Correlação entre CCS e CC e entre CCS e o teor de gordura em leite de tanques

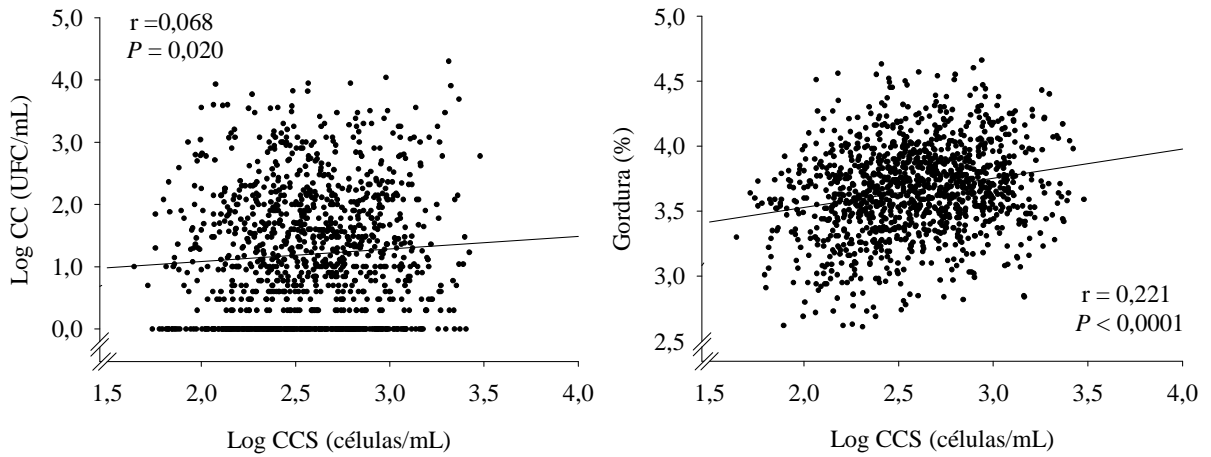


Figura 7 - Correlação entre CCS e o teor de proteína e entre CCS e o teor de sólidos totais em leite de tanques

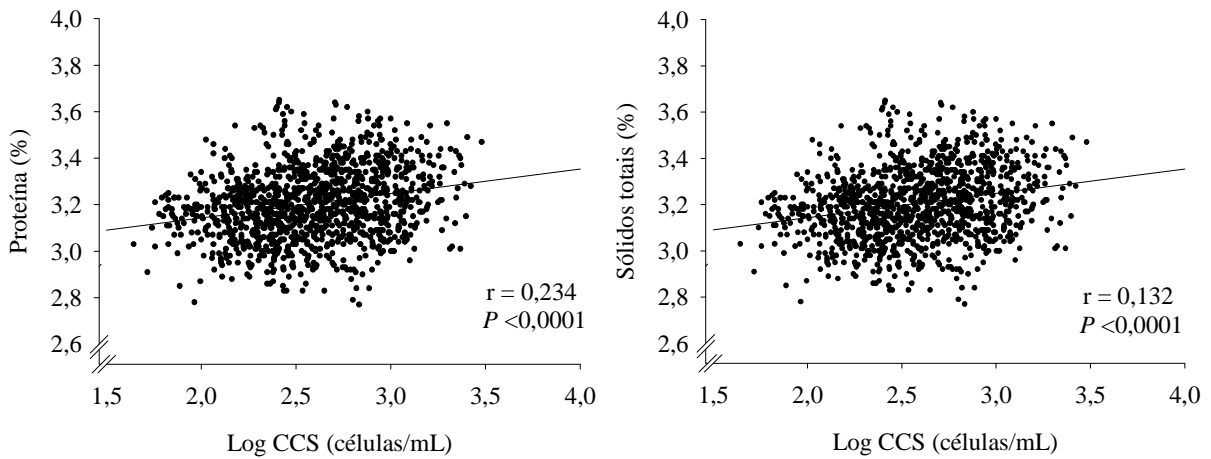


Figura 8 - Correlação entre CBT e CP e entre CBT e CC em leite de tanques

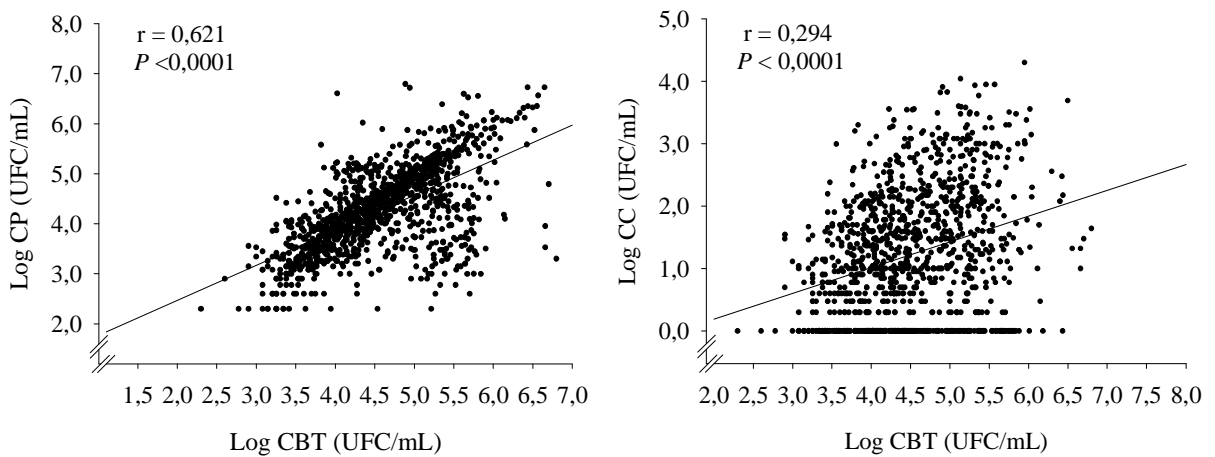


Figura 9 - Correlação entre CBT e CCS e entre CBT e o teor de gordura em leite de tanques

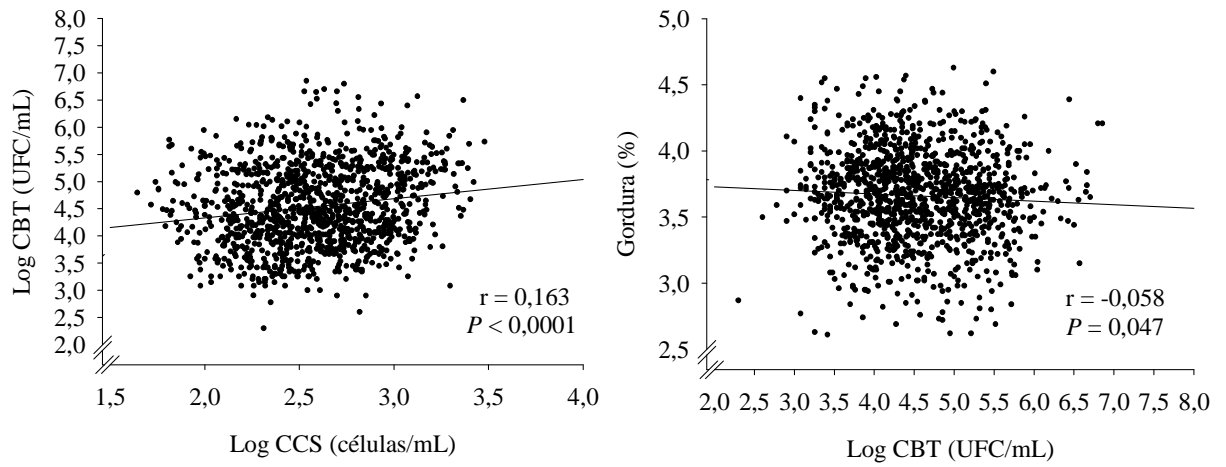
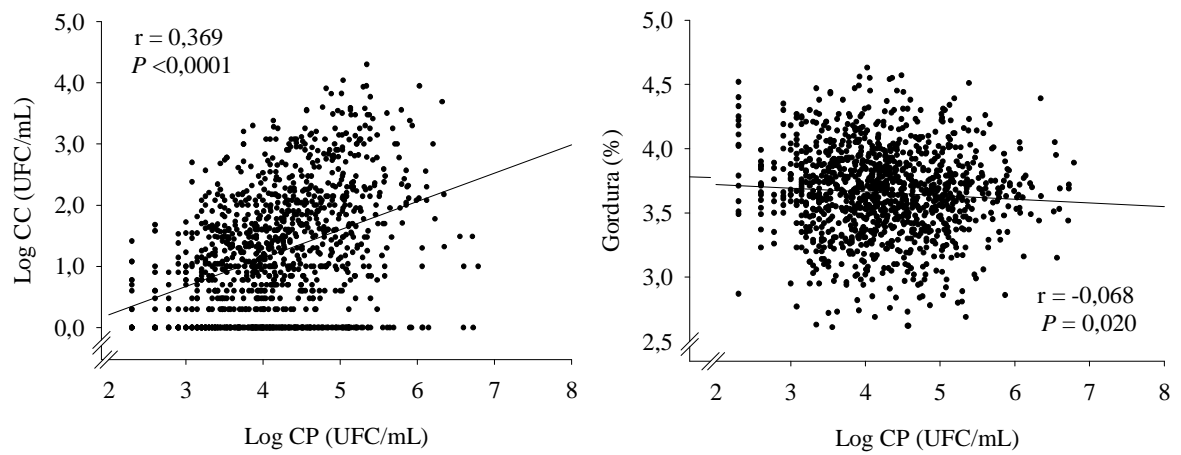


Figura 10 - Correlação entre CP e CC e entre CP e o teor de gordura em leite de tanques



5 DISCUSSÃO

5.1 Análises microbiológicas do leite de tanque

A análise dos indicadores de higiene do leite de tanque é uma importante ferramenta para a avaliação da qualidade do leite (ZUCALI et al., 2011). A qualidade higiênica do leite é determinada pela CBT do leite cru (PANTOJA et al., 2012), que está relacionada com a higiene do equipamento de ordenha e do tanque, com a presença de animais com mastite no rebanho (HAYES et al., 2001; BERRY et al., 2006) e com o escore de higiene dos tetos e úbere antes da ordenha (SCHREINER; RUEGG, 2003). Zucali et al. (2011) relataram que 50% das vacas com escore de higiene 3 (moderadamente sujo) e 4 (coberto com sujeira) apresentaram maiores CBT, CP e CC do leite de tanque em relação ao grupo de animais que apresentavam melhor escore de limpeza dos tetos e úbere.

Embora a mastite seja um dos fatores que contribua para a contaminação do leite de tanque, a falta de higiene durante a produção e o processamento do leite tem maior influência sobre os indicadores higiênicos do que a contaminação causada pelos micro-organismos oriundos da glândula mamária (SOUTO et al., 2008).

No presente estudo, os rebanhos foram distribuídos de acordo com três classes de CCS do leite de tanque: < 250.000 células/mL; > 250.001 e 750.000 células/mL; e > 750.001 células/mL. Os rebanhos com CCS < 250.000 células/mL apresentaram menor média de CBT em relação aos demais rebanhos (grupos com CCS entre 250.001 e < 750.000 células/ml e > 750.001 células/mL) que apresentaram aumento proporcional da CBT com a elevação da CCS. Jayarao et al. (2004) também relataram que a CBT aumentou proporcionalmente com a elevação da CCS: CBT = $2,3 \times 10^3$ para rebanhos com CCS < 200.000 células/mL, CBT = $4,1 \times 10^3$ para rebanhos com CCS do tanque entre 200.000 e 400.000 células/mL e CBT = $5,9 \times 10^3$ para rebanhos com CCS ≥ 400.000 células/mL.

No presente estudo, não houve diferença ($P = 0,0919$) entre os grupos de baixa, média e alta CCS para a CP. No entanto, Jayarao et al. (2004) relataram valores médios de CP proporcionais ao aumento da CCS: CP = $6,5 \times 10^3$ para os rebanhos com CCS < 200.000 células/mL, CP = $10,4 \times 10^3$ para os rebanhos com CCS do tanque entre 200.000 e 400.000 células/mL, e CP = $14,9 \times 10^3$ para os rebanhos com CCS do tanque ≥ 400.000 células/mL. De

acordo com Cempírková; Mikulová (2009), o aumento da CP com a elevação da CCS pode ocorrer em casos de mastite causada por bactérias psicotróficas.

A presença de coliformes no leite, geralmente, é indicativa de falhas de higiene durante a ordenha e na higienização dos equipamentos de ordenha e do tanque, porém a ocorrência de casos de mastite por coliforme também pode elevar a CC do tanque. Além disso, a CC é usada como um indicador de contaminação por micro-organismos de origem fecal (BAVA et al., 2011). No presente trabalho, os rebanhos com CCS > 250.001 células/mL apresentaram maior CC em comparação com os rebanhos com CCS < 250.000 células/mL, assim como observado por Pantoja et al. (2011), que observaram que a CC foi maior nos rebanhos com maior CCS. De acordo com Pantoja et al. (2011), este resultado sugere que a ocorrência de vacas com mastite por coliformes pode elevar a CC do leite de tanque. Da mesma forma, Jayarao et al. (2004) observaram que a CC aumentou com a elevação da CCS do tanque. Entretanto, os resultados de CC apresentados por Jayarao et al. (2004) foram menores em relação ao presente estudo, uma vez que os rebanhos de alta (>750.000 células/mL), média (>250.001 e <750.000 células/mL) e baixa (<250.000 células/mL) CCS do tanque do presente estudo apresentaram média de CC, respectivamente, 5,4; 4,4 e 4,6 vezes maior (163, 268 e 323 UFC/mL), em relação a média observada por Jayarao et al. (2004). Estes valores de CC superiores observados no presente estudo podem ter ocorrido devido a falhas no equipamento de ordenha e a não adoção de práticas de higiene no manejo e na ordenha que podem elevar a CC do leite de tanque (JAYARAO et al., 2004; PANTOJA et al., 2011). Adicionalmente, segundo Elmoslemany et al. (2009a) a temperatura da solução utilizada na limpeza do equipamento de ordenha e a baixa qualidade da água também são fatores que afetam negativamente a qualidade higiênica do leite, pois favorecem a proliferação de bactérias na superfície interna do equipamento de ordenha e podem contaminar o leite de tanque.

No presente trabalho, foi observado efeito do tempo de coleta para todos os indicadores de higiene analisados (CBT, CP e CC) e foi observado efeito de interação entre os grupos de baixa, média e alta CCS e o tempo de coleta para a CBT e a CC. Alterações na CBT, CP e CC podem ocorrer pela contaminação do leite de tanque pela presença de bactérias na pele dos tetos e úbere, pela contaminação dos equipamentos de ordenha causada por falhas na higienização da ordenhadeira, e pela ocorrência de animais com mastite no rebanho (OLECHNOWICZ; JAKOWSKI, 2012). Além disso, a estação do ano e o clima podem interferir tanto na qualidade higiênica, quanto na CCS do leite de tanque (FOX, 2009). Em épocas quentes e com mais chuvas a elevação da temperatura e da umidade favorece a

proliferação de micro-organismos no ambiente e eleva o risco de infecções intramamárias e de contaminação do leite de tanque (GREEN et al., 2006; ARCHER et al., 2013). Embora não tenham sido avaliadas as variáveis climáticas, as coletas foram realizadas nos meses de agosto a novembro, período que compreende o final do inverno e a primavera, dessa forma, além de falhas de higiene durante a ordenha e na limpeza do equipamento de ordenha, o efeito do tempo de coleta pode ter ocorrido pela influência do clima.

5.2 Composição do leite de tanque

Embora seja descrito que ocorra diminuição dos teores dos principais componentes do leite quando há aumento da CCS (AULDIST et al., 1998), no presente estudo, os rebanhos com CCS > 250.001 células/mL apresentaram maiores teores de gordura e proteína. Najafi et al. (2009) observaram que com o aumento da CCS houve diminuição do teor de gordura e aumento do teor de proteína. De acordo com Najafi et al. (2009), o aumento do teor de proteína pode ocorrer pela elevação da concentração de proteínas séricas em vacas com elevada CCS. Quando há ocorrência de mastite, embora possa ser observada elevação do teor de proteína verdadeira do leite, há diminuição no teor de caseína (NAJAFI et al., 2009). Machado et al. (2000) e Ribas et al. (2004) observaram aumento dos teores de gordura e proteína no leite com maior CCS. Estes estudos relataram que este aumento pode ocorrer pela diminuição da produção de leite que ocorre com o aumento da CCS. Se a redução da produção de leite for mais acentuada que o decréscimo da produção de gordura e proteína, ocorre concentração dos sólidos totais do leite de tanque (RIBAS et al., 2004). Apesar do presente estudo não ter avaliado a produção individual de leite para avaliar se a maior concentração de sólidos se deveu a diminuição de produção, esta é uma possível justificativa para o aumento dos teores de gordura e proteína observado nos rebanhos com CCS > 250.000 células/mL. Além disso, embora a CCS seja o indicador de saúde da glândula mamária mais comumente usado, há outros fatores não associados com a mastite, tais como o estágio de lactação e a frequência de ordenha, que podem alterar a composição do leite de tanque (WICKSTRÖM et al., 2010).

O teor de sólidos totais foi maior nos rebanhos com CCS > 250.000 células/mL. Resultados similares foram relatados por Ribas et al. (2004) que observaram aumento do teor de sólidos totais em rebanhos com maior CCS. De acordo com Ribas et al. (2004), o aumento

do teor de sólidos pode ser explicado pela elevação do teor de gordura com o aumento da CCS, tendo em vista a alta correlação entre os teores de gordura e sólidos totais, também observado no presente estudo. No entanto, Machado et al. (2000) relataram que não houve diferença para os teores de sólidos totais com o aumento da CCS do leite de tanque.

No presente estudo foi observado efeito do tempo de coleta sobre os teores de gordura ($P < 0,0001$), proteína ($P < 0,0001$), sólidos totais ($P < 0,0001$) e ESD ($P = 0,0010$) e não houve efeito de interação entre os grupos de baixa, média e alta CCS e o tempo de coleta. Forsbäck et al. (2010a) relataram que mesmo em vacas saudáveis, os teores de gordura e proteína do leite variam diariamente durante a lactação, sendo que o teor de gordura é o que mais se altera. De acordo com estes autores, isto ocorre, pois a composição do leite de cada vaca pode variar de acordo com a alimentação, a capacidade genética e a ordem e o estágio de lactação. Além disso, segundo Forsbäck et al. (2009) a alteração da composição do leite em nível de vaca pode interferir na composição do leite de tanque, o que pode justificar o efeito do tempo de coleta observado no presente estudo.

5.3 Análise de correlação entre as variáveis de composição e os indicadores de higiene do leite de tanque

Dentre os indicadores de higiene do leite de tanque, foi observada correlação positiva ($r = 0,6215$) entre a CBT e a CP. Este resultado corrobora com os relatados por Jayarao et al. (2004), que relataram correlação média e positiva ($r = 0,619$) entre CBT e CP do tanque. Entretanto, Cempírková (2002) relatou resultado superior ao do presente estudo, com correlação alta e positiva ($r = 0,92$) ao correlacionar a CP com a CBT de leite de tanque. De acordo com este autor, a alta correlação entre a CBT e a CP não justificaria a determinação da CP para a avaliação da qualidade higiênica do leite. No entanto, além do efeito negativo da CP sobre a composição do leite, o armazenamento do leite em temperatura de refrigeração por tempo superior a 48 horas pode elevar em até 100% a contagem de micro-organismos psicrotóxicos no leite cru, o que demonstra a importância do monitoramento da CP (CEMPÍRKOVÁ, 2002; BAVA et al., 2011).

Foi observada correlação média e positiva entre CBT e CC ($r = 0,2949$), e entre CP e CC ($r = 0,3692$). Arcuri et al. (2006) também observaram correlação média e positiva ($r = 0,61$) entre a CBT e a CC. Como a presença de coliformes é um indicativo de contaminação

fecal e do ambiente (ZUCALI et al., 2011), a correlação entre CBT e CC demonstra a importância da contribuição da higiene no momento da ordenha para a CBT do leite cru. Por outro lado, a CP pode estar relacionada com a CC, pois alguns coliformes, tais como *Citrobacter* e *Klebsiella* são também micro-organismos psicotróficos e podem contribuir para a elevação da CP do leite de tanque (MARTIN et al., 2011).

Najafi et al. (2009) ao avaliarem o efeito da CCS sobre a gordura e a proteína em leite de tanque observaram que houve correlação baixa e negativa ($r = -0,13$) entre CCS e gordura, e correlação média e positiva ($r = 0,39$) para as comparações entre CCS e proteína, diferente do presente estudo quanto a correlação entre CCS e gordura ($r = 0,2217$) e similar quanto a CCS e proteína ($r = 0,2346$). O aumento do teor de proteína com a elevação da CCS pode ser explicado pela alteração na permeabilidade dos capilares sanguíneos como resposta à inflamação, e consequente aumento da concentração de proteínas séricas no leite (NAJAFI et al., 2009). Machado et al. relataram que o leite de tanques com $CCS > 1.500.000$ células/mL apresentaram maior teor de gordura em relação aos rebanhos com $CCS < 1.000.000$ células/mL. Os rebanhos com $CCS < 500.000$ células/mL apresentaram maior teor de proteína em relação aos rebanhos com $CCS > 500.000$ células/mL.

No presente estudo, foi observada correlação baixa e positiva entre a CCS e os indicadores de higiene (CBT e CC) e foi observada correlação baixa e positiva entre a CCS e a composição do leite (gordura, proteína, sólidos totais) de tanque. A CCS é um indicador da saúde da glândula mamária, pois a ocorrência de infecção intramamária pode ser a causa do aumento da contagem de diferentes grupos de bactérias no leite de tanque (LAKIC et al., 2011). A ocorrência de casos de mastite no rebanho eleva a CCS e pode elevar a CBT e a CC do leite de tanque. Entretanto, o efeito da CCS sobre os indicadores de higiene depende da relação entre o número de vacas saudáveis e com mastite (HAYES et al., 2001) e de outros fatores, tais como a adoção de boas práticas de manejo e higiene em todo o sistema produtivo, adequada preparação dos animais para a ordenha e correta higienização do tanque e dos equipamentos de ordenha (BERRY et al., 2006; ZUCALI et al., 2011).

A produção do leite dos rebanhos não foi mensurada, e esta variável poderia auxiliar no entendimento da influência da CCS sobre os sólidos do leite. Segundo Hayes et al. (2001) e Jayarao et al. (2004), o efeito da CCS sobre a CBT depende do tamanho do rebanho e do número de vacas com mastite. Entretanto, no presente estudo não foi avaliado tamanho de rebanho e nem a frequência de casos de infecção intramamária. Alguns estudos (HARRIS; KOLVER, 2001; BOUYAI et al., 2012; KOECK et al., 2012) sugerem que a informação do tipo de raça seria outro fator que interfere na composição e produção do leite de tanque sobre

algumas variáveis avaliadas no presente estudo (CBT, CCS e composição), no entanto não foram registrados características raciais dos animais de nenhum rebanho estudado.

6 CONCLUSÃO

Rebanhos com CCS > 250.001 células/mL apresentam maiores teores de gordura, proteína e sólidos totais. Por outro lado, rebanhos com CCS < 250.000 células/mL apresentam maior qualidade higiênica do leite de tanque. Há correlação linear entre os indicadores de higiene (CBT, CP e CC) e o teor de gordura e entre a CCS e as variáveis de composição do leite (gordura, proteína, sólidos totais e ESD).

REFERÊNCIAS

- AKERS, R. M.; NICKERSON, S. Mastitis and its Impact on Structure and Function in the Ruminant Mammary Gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 275-289, 2011.
- ÅKERSTEDT, M.; WREDLE, E.; LAM, V.; JOHANSSON, M. Protein degradation in bovine milk caused by *Streptococcus agalactiae*. **Journal of Dairy Research**, v. 79, n. 3, p. 297-303, 2012.
- ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Medicina Bovina: Doenças e Criação de Bovinos**. São Paulo: Roca, 2008, 2.ed. 1080 p.
- ARCHER, S. C.; MC COY, F.; WAPENAAR, W.; GREEN, M. J. Association of season and herd size with somatic cell count for cows in Irish, English, and Welsh dairy herds. **The Veterinary Journal**, v. 196, n. 3, p. 515-521, 2013.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.
- AULDIST, M. J.; WALSH, B. J.; THOMSON, N. A. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. **Journal of Dairy Research**, v. 65, n. 1, p. 401-411, 1998.
- BAGHERI, M.; MIRAIE-ASHTIANI, R.; MORADI-SHAHRBABA, M.; NEJATI-JAVAREMI, A.; PAKDEL, A.; VON BORSTEL, U. U.; PIMENTEL, E. C. G.; KÖNIG, S. Selective genotyping and logistic regression analyses to identify favorable SNP-genotypes for clinical mastitis and production traits in Holstein dairy cattle. **Livestock Science**, v. 151, n. 2-3, p. 140-151, 2013.
- BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **Journal of dairy science.**, v. 89, n., p. E15-19, 2006. Supplement, 1.
- BARKEMA, H. W.; GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J.; ZADOKS, R. N. Invited review: The role of contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4717-4729, 2009.
- BARKEMA, H. W.; DE VliegHER, S.; PIEPERS, S.; ZADOKS, R. N. Herd level approach to high bulk milk somatic cell count problems in dairy cattle. **Veterinary Quarterly**, v. 33, n. 2, p. 82-93, 2013.
- BARTOSZEWICZ, M.; HANSEN, B. M.; SWIECICKA, I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. **Food Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 588-596, 2008.
- BAVA, L.; ZUCALI, M.; SANDRUCCI, A.; BRASCA, M.; VANONI, L.; ZANINI, L.; TAMBURINI, A. Effect of cleaning procedure and hygienic condition of milking equipment

on bacterial count of bulk tank milk. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 2, p. 211-219, 2011.

BERRY, D. P.; O'BRIEN, B.; O'CALLAGHAN, E. J.; SULLIVAN, K. O.; MEANEY, W. J. Temporal Trends in Bulk Tank Somatic Cell Count and Total Bacterial Count in Irish Dairy Herds During the Past Decade. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 4083-4093, 2006.

BLOWEY, R. W.; EDMONDSON, P. **Mastitis control in dairy herds**. London: CAB International, 2010, 2.ed. 266 p.

BLUM, S.; HELLER, E. D.; KRIFUCKS, O.; SELA, S.; HAMMER-MUNTZ, O.; LEITNER, G. Identification of a bovine mastitis *Escherichia coli* subset. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 1-2, p. 135-148, 2008.

BOTARO, B. G.; GAMEIRO, A. H.; SANTOS, M. V. Quality based payment program and milk quality in dairy cooperatives of Southern Brazil: an econometric analysis. **Scientia Agricola**, v. 70, n., p. 21-26, 2013.

BOUYAI, D.; DUANGJINDA, M.; PATTARAJINDA, V.; KATAWATIN, S.; SANITCHON, J.; BULAKUL, C.; BOONKUM, W. Detection of quantitative trait loci for clinical mastitis in crossbred Holsteins in the tropics. **Livestock Science**, v. 150, n. 1-3, p. 22-30, 2012.

BRADLEY, A. J. Bovine Mastitis: An Evolving Disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.

BRANDT, M.; HAEUSSERMANN, A.; HARTUNG, E. Invited review: Technical solutions for analysis of milk constituents and abnormal milk. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 427-436, 2010.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 51**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Tipo B, do Leite Tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União, p. 13, 20/09/2002.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 62**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite Cru Refrigerado, do Leite Pasteurizado e Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União, p. 1, 29/12/2011.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; DE SOUZA, H. M.; VARGAS, O. L. Evaluation of the sensitivity of bulk tank milk cultures for the isolation of contagious bovine mastitis pathogens. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 39-44, 1998.

BRITTEN, A. M. The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 187-202, 2012.

CAMUSSONE, C. M.; CALVINHO, L. F. Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus* asociados con infecciones mamarias en bovinos: relevancia y rol como agentes inmunógenos. **Revista argentina de microbiología**, v. 45, n., p. 119-130, 2013.

CARAVIELLO, D. Z.; WEIGEL, K. A.; SHOOK, G. E.; RUEGG, P. L. Assessment of the Impact of Somatic Cell Count on Functional Longevity in Holstein and Jersey Cattle Using Survival Analysis Methodology. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 2, p. 804-811, 2005.

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

CAVERO, D.; TÖLLE, K. H.; HENZE, C.; BUXADÉ, C.; KRIETER, J. Mastitis detection in dairy cows by application of neural networks. **Livestock Science**, v. 114, n. 2-3, p. 280-286, 2008.

CEJNA, V.; CHLÁDEK, G. The importance of monitoring changes in milk fat to milk protein ratio in Holstein cows during lactation. **Journal of Central European Agriculture**, v. 6, n. 4, p. 539-546, 2005.

CEMPÍRKOVÁ, R. Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. **Veterinarni Medicina**, v. 47, n. 8, p. 227-233, 2002.

CEMPÍRKOVÁ, R.; MIKULOVÁ, M.; TRAVNICEK, J. Counts of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk samples from the aspect of technological quality. **Journal of Agrobiology**, v. 26, n. 2, p. 113-121, 2009.

CEMPÍRKOVÁ, R.; MIKULOVÁ, M. Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. **Czech Journal of Animal Science**, v. 54, n. 2, p. 65-73, 2009.

CHRISTIANSSON, A.; BERTILSSON, J.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n., p. 305-314, 1999.

COTON, M.; DELBÉS-PAUS, C.; IRLINGER, F.; DESMASURES, N.; LE FLECHE, A.; STAHL, V.; MONTEL, M.-C.; COTON, E. Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. **Food Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 88-98, 2012.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age Gelation of UHT Milk—A Review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 79, n. 4, p. 197-210, 2001.

DAVIDSON, P. M.; ROTH, L. A.; GAMBREL-LENARZ, S. A. Coliform and Other Indicator Bacteria. In: Wehr, H. M. e Frank, J. F. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. Washington DC: APHA, 2004. chap. 17, p.187.

DE PINHO MANZI, M.; NÓBREGA, D. B.; FACCIOLI, P. Y.; TRONCARELLI, M. Z.; MENOZZI, B. D.; LANGONI, H. Relationship between teat-end condition, udder cleanliness and bovine subclinical mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 430-434, 2012.

DENIS, M.; WEDLOCK, D. N.; LACY-HULBERT, S. J.; HILLERTON, J. E.; BUDDLE, B. M. Vaccines against bovine mastitis in the New Zealand context: What is the best way forward? **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, n. 3, p. 132-140, 2009.

DUFOUR, S.; FRÉCHETTE, A.; BARKEMA, H. W.; MUSSELL, A.; SCHOLL, D. T. Invited review: Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 2, p. 563-579, 2011.

EDWARDS, J. P.; O'BRIEN, B.; LOPEZ-VILLALOBOS, N.; JAGO, J. G. Overmilking causes deterioration in teat-end condition of dairy cows in late lactation. **Journal of Dairy Research**, v. 80, n. 03, p. 344-348, 2013.

ELIAS, A. O.; CORTEZ, A.; BRANDÃO, P. E.; DA SILVA, R. C.; LANGONI, H. Molecular detection of *Streptococcus agalactiae* in bovine raw milk samples obtained directly from bulk tanks. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 34-38, 2012.

ELMOSLEMANY, A. M.; KEEFE, G. P.; DOHOO, I. R.; JAYARAO, B. M. Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in prince edward Island dairy herds. Part 1: Overall risk factors. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2634-2643, 2009a.

ELMOSLEMANY, A. M.; KEEFE, G. P.; DOHOO, I. R.; JAYARAO, B. M. Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 2: Bacteria count-specific risk factors. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2644-2652, 2009b.

ELMOSLEMANY, A. M.; KEEFE, G. P.; DOHOO, I. R.; WICHTEL, J. J.; STRYHN, H.; DINGWELL, R. T. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, n. 1-2, p. 32-40, 2010.

ERCOLINI, D.; RUSSO, F.; FERROCINO, I.; VILLANI, F. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 228-231, 2009.

FDA. **Bacteriological Analytical Manual**. Silver Spring: Center of Food Safety and Applied Nutrition, 2001. Disponível em:
<<http://www.911emg.com/Ref%20Library%20ERG/FDA%20Bacteriological%20Analysis.pdf>>. Acesso em: 03/07/2013.

FERNANDES, A. M.; OLIVEIRA, C. A. F.; LIMA, C. G. Effects of somatic cell counts in milk on physical and chemical characteristics of yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 2, p. 111-115, 2007.

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MÅNSSON, H.; ANDRÉN, A.; ÅKERSTEDT, M.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Udder quarter milk composition at different levels of somatic cell count in cow composite milk. **Animal**, v. 3, n. 05, p. 710-717, 2009.

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MÅNSSON, H.; ANDRÉN, A.; ÅKERSTEDT, M.; ANDRÉE, L.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Day-to-day variation in milk yield and milk composition at the udder-quarter level. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 3569-3577, 2010a.

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MÅNSSON, H.; ANDRÉN, A.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K. Evaluation of quality changes in udder quarter milk from cows with low-to-moderate somatic cell counts. **Animal**, v. 4, n. 04, p. 617-626, 2010b.

FORSBÄCK, L. **Bovine udder quarter milk relation to somatic cell count**. 2010. 70 p. Tese (Doutorado). Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Switzerland, 2010.

FORSBÄCK, L.; LINDMARK-MÅNSSON, H.; SVENNERSTEN-SJAUNJA, K.; BACH LARSEN, L.; ANDRÉN, A. Effect of storage and separation of milk at udder quarter level on milk composition, proteolysis, and coagulation properties in relation to somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 11, p. 5341-5349, 2011.

FOX, L. K. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 82-88, 2009.

FRANCOZ, D.; BERGERON, L.; NADEAU, M.; BEAUCHAMP, G. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Quebec. **Canadian Veterinary Journal**, v. 53, n. 10, p. 1071-1078, 2012.

FRANK, J. F.; YOUSEF, A. E. Tests for Groups of Microorganisms. In: Wehr, H. M. e Frank, J. F. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. Washington DC: APHA, 2004. chap. 17, p.227.

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

FRICKER, M.; SKÅNSENG, B.; RUDI, K.; STESSL, B.; EHLING-SCHULZ, M. Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. SUPPL. 1, p. S24-S30, 2011.

GARCÍA-ARMESTO, M. R.; SUTHERLAND, A. D. Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk. **Journal of Dairy Research**, v. 64, n. 02, p. 261-270, 1997.

GAUCHER, I.; BOUBELLOUTA, T.; BEAUCHER, E.; PIOT, M.; GAUCHERON, F.; DUFOUR, E. Investigation of the effects of season, milking region, sterilisation process and storage conditions on milk and UHT milk physico-chemical characteristics: a multidimensional statistical approach. **Dairy Science & Technology**, v. 88, n. 3, p. 291-312, 2008.

GLEESON, D.; O'BRIEN, B.; JORDAN, K. The effect of using nonchlorine products for cleaning and sanitising milking equipment on bacterial numbers and residues in milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 66, n. 2, p. 182-188, 2013.

GODIČ TORKAR, K.; GOLC TEGER, S. The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. **Acta Agriculturae Slovenica**, v. 92, n. 1, p. 61-74, 2008.

GOMASHE, A. V.; DHARMIK, P. G.; ZADE, B. N. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Innovations in Bio-Sciences**, v. 2, n. 3, p. 100-103, 2012.

GREEN, M. J.; BRADLEY, A. J.; NEWTON, H.; BROWNE, W. J. Seasonal variation of bulk milk somatic cell counts in UK dairy herds: Investigations of the summer rise. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 74, n. 4, p. 293-308, 2006.

GROENENDAAL, H.; GALLIGAN, D. T.; MULDER, H. A. An Economic Spreadsheet Model to Determine Optimal Breeding and Replacement Decisions for Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 7, p. 2146-2157, 2004.

HARRIS, B. L.; KOLVER, E. S. Review of Holsteinization on Intensive Pastoral Dairy Farming in New Zealand. **Journal of Dairy Science**, v. 84, Supplement, n. 0, p. E56-E61, 2001.

HAUG, A.; HØSTMARK, A.; HARSTAD, O. Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids in Health and Disease**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2007.

HAYES, M. C.; RALYEA, R. D.; MURPHY, S. C.; CAREY, N. R.; SCARLETT, J. M.; BOOR, K. J. Identification and Characterization of Elevated Microbial Counts in Bulk Tank Raw Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 1, p. 292-298, 2001.

HEINRICHS, A. J.; COSTELLO, S. S.; JONES, C. M. Control of heifer mastitis by nutrition. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 172-176, 2009.

HILL, B.; SMYTHE, B.; LINDSAY, D.; SHEPHERD, J. Microbiology of raw milk in New Zealand. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 305-308, 2012.

HOGAN, J.; SMITH, K. L. Coliform mastitis. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 507-519, 2003.

HOGAN, J.; SMITH, K. L. Managing environmental mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 217-224, 2012.

HOGVEEN, H.; HUIJPS, K.; LAM, T. Economic aspects of mastitis: New developments. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 59, n. 1, p. 16-23, 2011.

HORTET, P.; SEEGERS, H. Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 37, n. 1–4, p. 1-20, 1998.

INGHAM, S. C.; HU, Y.; ANÉ, C. Comparison of bulk-tank standard plate count and somatic cell count for Wisconsin dairy farms in three size categories. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 8, p. 4237-4241, 2011.

JACOBSSON, K. A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 103-113, 2003.

JAMROZIK, J.; SCHAEFFER, L. R. Test-day somatic cell score, fat-to-protein ratio and milk yield as indicator traits for sub-clinical mastitis in dairy cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 129, n. 1, p. 11-19, 2012.

JANSEN, J.; VAN SCHAİK, G.; RENES, R. J.; LAM, T. The effect of a national mastitis control program on the attitudes, knowledge, and behavior of farmers in the Netherlands. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5737-5747, 2010.

JAYARAO, B. M.; WOLFGANG, D. R. Bulk-tank milk analysis - A useful tool for improving milk quality and herd udder health. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 75-92, 2003.

JAYARAO, B. M.; PILLAI, S. R.; SAWANT, A. A.; WOLFGANG, D. R.; HEGDE, N. V. Guidelines for Monitoring Bulk Tank Milk Somatic Cell and Bacterial Counts. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3561-3573, 2004.

JAYARAO, B. M.; DONALDSON, S. C.; STRALEY, B. A.; SAWANT, A. A.; HEGDE, N. V.; BROWN, J. L. A Survey of Foodborne Pathogens in Bulk Tank Milk and Raw Milk Consumption Among Farm Families in Pennsylvania. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2451-2458, 2006.

JENSEN, R. G. **Handbook of milk composition**. San Diego: Academic Press, 1995. 919 p.

JENSEN, R. G. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 295-350, 2002.

KAIPAINEN, T.; POHJANVIRTA, T.; SHPIGEL, N. Y.; SHWIMMER, A.; PYÖRÄLÄ, S.; PELKONEN, S. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 37-46, 2002.

KANDASAMY, S.; GREEN, B. B.; BENJAMIN, A. L.; KERR, D. E. Between-cow variation on dermal fibroblast response to lipopolysaccharide reflected in resolution of inflammation during *Escherichia coli* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 5963-5975, 2011.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 203-216, 2012.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 38, n., p. 429-437, 1997.

KELLY, A. L. Milk biochemistry. In: Griffiths, W. **Improving the safety and quality of milk: milk production and processing**. Cambridge: Woodhead, 2010. chap. 1, p.2-26.

KELLY, P. T.; O'SULLIVAN, K.; BERRY, D. P.; MORE, S. J.; MEANEY, W. J.; O'CALLAGHAN, E. J.; O'BRIEN, B. Farm management factors associated with bulk tank total bacterial count in Irish dairy herds during 2006/07. **Irish Veterinary Journal**, v. 62, n. 1, p. 36-42, 2009.

- KOECK, A.; MIGLIOR, F.; KELTON, D. F.; SCHENKEL, F. S. Alternative somatic cell count traits to improve mastitis resistance in Canadian Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 1, p. 432-439, 2012.
- LAIRD, D. T.; GAMBREL-LENARZ, S. A.; SCHER, F. M.; GRAHAM, T. E.; REDDY, R.; MATURIN, L. J. Microbiological Count Methods. In: Wehr, H. M. e Frank, J. F. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. [S.I]: APHA, 2004. chap. b6, v., p.153.
- LAKIC, B.; SVENNERSTEN SJAUNJA, K.; NORELL, L.; DERNFALK, J.; ÖSTENSSON, K. The effect of a single prolonged milking interval on inflammatory parameters, milk composition and yield in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 140, n. 1-2, p. 110-118, 2011.
- LAM, T. J. G. M.; VAN DEN BORNE, B. H. P.; JANSEN, J.; HUIJPS, K.; VAN VEERSEN, J. C. L.; VAN SCHAIK, G.; HOGEVEEN, H. Improving bovine udder health: A national mastitis control program in the Netherlands. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 2, p. 1301-1311, 2013.
- LANDI, H.; BARROS, L.; MICHEO, C. Evaluation of the dairy cow biotype through milk composition, nutrition and grazing management. **Livestock Research for Rural Development**, v. 23, n. 4, p., 2011.
- LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; MARTINS, P. Y. F.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 12, n. 31, p. 1059-1065, 2011.
- LE MARÉCHAL, C.; THIÉRY, R.; VAUTOR, E.; LE LOIR, Y. Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—a review. **Dairy Science & Technology**, v. 91, n. 3, p. 247-282, 2011.
- LEITNER, G.; SHOSHANI, E.; KRIFUCKS, O.; CHAFFER, M.; SARAN, A. Milk Leucocyte Population Patterns in Bovine Udder Infection of Different Aetiology. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, n. 8, p. 581-589, 2000.
- LEITNER, G.; KRIFUCKS, O.; MERIN, U.; LAVI, Y.; SILANIKOVE, N. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 648-654, 2006.
- LERICHE, F.; FAYOLLE, K. No seasonal effect on culturable pseudomonads in fresh milks from cattle herds. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2299-2306, 2012.
- MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRIES, G. A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1883-1886, 2000.
- MADOUASSE, A.; HUXLEY, J. N.; BROWNE, W. J.; BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. Somatic cell count dynamics in a large sample of dairy herds in England and Wales. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 96, n. 1-2, p. 56-64, 2010.

MARCHAND, S.; COUDIJZER, K.; HEYNDRIKX, M.; DEWETTINCK, K.; DE BLOCK, J. Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 5, p. 514-519, 2008.

MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied dairy microbiology**. New York: Marcel Dekker, 2001, 2.ed. 744 p.

MARTIN, N. H.; MURPHY, S. C.; RALYEA, R. D.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 3176-3183, 2011.

MOTTRAM, T.; RUDNITSKAYA, A.; LEGIN, A.; FITZPATRICK, J. L.; ECKERSALL, P. D. Evaluation of a novel chemical sensor system to detect clinical mastitis in bovine milk. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 11, p. 2689-2693, 2007.

NAJAFI, M. N.; MORTAZAVI, S. A.; KOOCHEKI, A.; KHORAMI, J.; REKIK, B. Fat and protein contents, acidity and somatic cell counts in bulk milk of Holstein cows in the Khorasan Razavi Province, Iran. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 1, p. 19-26, 2009.

NASCIMENTO, G. V.; CARDOSO, E. A.; BATISTA, N. L.; SOUZA, B. B.; CAMBUI, G. B. Indicadores produtivos, fisiológicos e comportamentais de vacas de leite. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 9, n. 4, p. 28-36, 2013.

NICKERSON, S. C. Control of heifer mastitis: Antimicrobial treatment—An overview. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 128-135, 2009.

NIGHTINGALE, C.; DHUYVETTER, K.; MITCHELL, R.; SCHUKKEN, Y. Influence of variable milk quality premiums on observed milk quality. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, p. 1236-1244, 2008.

NORMAN, H. D.; LOMBARD, J. E.; WRIGHT, J. R.; KOPRAL, C. A.; RODRIGUEZ, J. M.; MILLER, R. H. Consequence of alternative standards for bulk tank somatic cell count of dairy herds in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 6243-6256, 2011.

NÖRNBERG, M. D. F. B. L.; MENTGES, M. L.; SILVEIRA, S. T.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. A psychrotrophic *Burkholderia cepacia* strain isolated from refrigerated raw milk showing proteolytic activity and adhesion to stainless steel. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 3, p. 257-262, 2011.

NÖRNBERG, M. F. B. L.; FRIEDRICH, R. S. C.; WEISS, R. D. N.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 1, p. 41-46, 2010.

OLECHNOWICZ, J.; JAKOWSKI, J. M. Somatic Cells Count in Cow's Bulk Tank Milk. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 6, p. 681-686, 2012.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 165-185, 2012.

OUWELTJES, W.; BEERDA, B.; WINDIG, J. J.; CALUS, M. P. L.; VEERKAMP, R. F. Effects of Management and Genetics on Udder Health and Milk Composition in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 229-238, 2007.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCON, J. J.; CAJERO-JUAREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LOPEZ-MEZA, J. E.; BRAVO-PATINO, A.; BAIZABAL-AGUIERRE, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infectology**, v. 54, n. 4, p. 399-409, 2007.

PADUCH, J.-H.; MOHR, E.; KRÖMKER, V. The association between bedding material and the bacterial counts of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and coliform bacteria on teat skin and in teat canals in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Research**, v. 80, n. 02, p. 159-164, 2013.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídios. In: Berchielli, T. T., Pires, A. V. e Oliveira, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2011. chap. 2, p.299-322.

PANTOJA, J. C. F.; REINEMANN, D.; RUEGG, P. L. Associations among milk quality indicators in raw bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4978-4987, 2009.

PANTOJA, J. C. F.; REINEMANN, D. J.; RUEGG, P. L. Factors associated with coliform count in unpasteurized bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 2680-2691, 2011.

PANTOJA, J. C. F.; ROSA, G. J. M.; REINEMANN, D. J.; RUEGG, P. L. Sampling strategies for total bacterial count of unpasteurized bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2326-2335, 2012.

PARK, Y. K.; KOO, H. C.; KIM, S. H.; HWANG, S. Y.; JUNG, W. K.; KIM, J. M.; SHIN, S.; KIM, R. T.; PARK, Y. H. The Analysis of Milk Components and Pathogenic Bacteria Isolated from Bovine Raw Milk in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5405-5414, 2007.

PEARCE, L. E.; SMYTHE, B. W.; CRAWFORD, R. A.; OAKLEY, E.; HATHAWAY, S. C.; SHEPHERD, J. M. Pasteurization of milk: The heat inactivation kinetics of milk-borne dairy pathogens under commercial-type conditions of turbulent flow. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 1, p. 20-35, 2012.

PERKINS, N. R.; KELTON, D. F.; HAND, K. J.; MACNAUGHTON, G.; BERKE, O.; LESLIE, K. E. An analysis of the relationship between bulk tank milk quality and wash water quality on dairy farms in Ontario, Canada. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 8, p. 3714-3722, 2009.

PERKO, B. Effect of prolonged storage on microbiological quality of raw milk. **Mljekarstvo**, v. 61, n. 2, p. 114-124, 2011.

PIEPERS, S.; DE MEULEMEESTER, L.; DE KRUIF, A.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; VliegHER, S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n., p. 478-483, 2007.

- PINTO, C. L. D. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Microbial quality of raw refrigerated milk and isolation of psychrotrophic proteolytic bacteria. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.
- PITKALA, A.; HAVERI, M.; PYORALA, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001 - prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n., p. 2433-2441, 2004.
- PYÖRÄLÄ, S.; HOVINEN, M.; SIMOJOKI, H.; FITZPATRICK, J.; ECKERSALL, P. D.; ORRO, T. Acute phase proteins in milk in naturally acquired bovine mastitis caused by different pathogens. **Veterinary Record**, v. 168, n. 20, p. 535, 2011.
- RENNÓ, F. P.; PEREIRA, J. C.; SANTOS, A. D. F.; ALVES, N. G.; TORRES, C. A. A.; RENNO, L. N.; BALBINOT, P. Z. Efeito da condição corporal ao parto sobre a produção e composição do leite, a curva de lactação e a mobilização de reservas corporais em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 220-233, 2006.
- REYHER, K. K.; DOHOO, I. R. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3387-3396, 2011.
- RIBAS, N. P.; HARTMANN, W.; MONARDES, H. G.; ANDRADE, U. V. C. D. Sólidos totais do leite em amostras de tanque nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n., p. 2343-2350, 2004.
- ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E. Ecology of *Staphylococcus aureus* Isolated from Various Sites on Dairy Farms¹. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 11, p. 3354-3364, 1994.
- ROMA JÚNIOR, L. C.; MONTOYA, J. F. G.; MARTINS, T. T.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Seasonability of protein and others milk components related with quality payment program. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1411-1418, 2009.
- RUEGG, P. L. Investigation of mastitis problems on farms. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, n. 1, p. 47-73, 2003a.
- RUEGG, P. L. Practical Food Safety Interventions for Dairy Production. **Journal of Dairy Science**, v. 86, Supplement, n. 0, p. E1-E9, 2003b.
- RUEGG, P. L. New perspectives in udder health management. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 149-163, 2012.
- RUNCIMAN, D. J.; MALMO, J.; DEIGHTON, M. The use of an internal teat sealant in combination with cloxacillin dry cow therapy for the prevention of clinical and subclinical mastitis in seasonal calving dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p. 4582-4591, 2010.

RYSANEK, D.; ZOUHAROVA, M.; BABAK, V. Major Mammary Pathogens as Contributors to Total Bacterial Counts in Raw Milk. **Acta Veterinaria Brno**, v. 78, n. 3, p. 455-461, 2009.

SAMPIMON, O. C.; BARKEMA, H. W.; BERENDS, I.; SOL, J.; LAM, T. J. G. M. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. **Journal of Dairy Research**, v. 76, n., p. 129-136, 2009.

SANTOS, A.; PIRES, A.; BEHAINE, J.; ARAÚJO, E.; ANDRADE, N.; CARVALHO, A. Effect of Cleaning Treatment on Adhesion of *Streptococcus agalactiae* to Milking Machine Surfaces. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 7, p. 1868-1872, 2013.

SANTOS, M. V.; MA, Y.; BARBANO, D. M. Effect of Somatic Cell Count on Proteolysis and Lipolysis in Pasteurized Fluid Milk During Shelf-Life Storage. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 8, p. 2491-2503, 2003.

SCHREINER, D. A.; RUEGG, P. L. Effects of Tail Docking on Milk Quality and Cow Cleanliness. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2503-2511, 2002.

SCHREINER, D. A.; RUEGG, P. L. Relationship Between Udder and Leg Hygiene Scores and Subclinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 11, p. 3460-3465, 2003.

SCHUKKEN, Y. H.; LEEMPUT, E. S. V. D.; MORONI, P.; WELCOME, F.; GURJAR, A.; ZURAKOWSKI, M.; GUTIERREZ, C.; CEBALLOS, A.; ZADOKS, R. Contagious or environmental - a herd diagnosis. In: XXVII World Buiatrics Congress, 2012, Lisboa: Keynote lectures and round tables proceedings, p. 145-148.

SCHWARZ, D.; DIESTERBECK, U. S.; FAILING, K.; KÖNIG, S.; BRÜGEMANN, K.; ZSCHÖCK, M.; WOLTER, W.; CZERNY, C. P. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hesse, Germany—A longitudinal study. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5716-5728, 2010.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHPIGEL, N. Y.; ELAZAR, S.; ROSENSHINE, I. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 60-65, 2008.

SIIVONEN, J.; TAPONEN, S.; HOVINEN, M.; PASTELL, M.; LENSINK, B. J.; PYÖRÄLÄ, S.; HÄNNINEN, L. Impact of acute clinical mastitis on cow behaviour. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 132, n. 3-4, p. 101-106, 2011.

SIMOJOKI, H.; HYVÖNEN, P.; PLUMED FERRER, C.; TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase-negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection? **Veterinary Microbiology**, v. 158, n. 3-4, p. 344-352, 2012.

SOUTO, L. I. M.; MINAGAWA, C. Y.; TELLES, E. O.; GARBUGLIO, M. A.; AMAKU, M.; DIAS, R. A.; SAKATA, S. T.; BENITES, N. R. Relationship between occurrence of

mastitis pathogens in dairy cattle herds and raw-milk indicators of hygienic-sanitary quality. **Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 1, p. 121-127, 2008.

SRAÏRI, M.; BENHOUDA, H.; KUPER, M.; LE GAL, P. Effect of cattle management practices on raw milk quality on farms operating in a two-stage dairy chain. **Tropical Animal Health and Production**, v. 41, n. 2, p. 259-272, 2009.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS user's guide: statistics**. Versão 9.0. Cary: SAS, 2004.

SURIYASATHAPORN, W.; SCHUKKEN, Y. H.; NIELEN, M.; BRAND, A. Low Somatic Cell Count: a Risk Factor for Subsequent Clinical Mastitis in a Dairy Herd. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 6, p. 1248-1255, 2000.

SVENSSON, B.; MONTHÁN, A.; SHAHEEN, R.; ANDERSSON, M. A.; SALKINOJA-SALONEN, M.; CHRISTIANSSON, A. Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 7, p. 740-749, 2006.

TANCIN, V.; URHRINCAT, M.; MACUHOVÁ, L.; BRUCKMAIER, R. M. Effect of pre-stimulation on milk flow pattern and distribution of milk constituents at a quarter level. **Czech Journal of Animal Science**, v. 52, n. 5, p. 117-121, 2007.

TEH, K. H.; FLINT, S.; PALMER, J.; LINDSAY, D.; ANDREWES, P.; BREMER, P. Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 10, p. 742-747, 2011.

VAN KESSEL, J. S.; KARNS, J. S.; GORSKI, L.; MCCLUSKEY, B. J.; PERDUE, M. L. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and Fecal Coliforms in Bulk Tank Milk on US Dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 9, p. 2822-2830, 2004.

VAN STRATEN, M.; FRIGER, M.; SHPIGEL, N. Y. Events of elevated somatic cell counts in high-producing dairy cows are associated with daily body weight loss in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4386-4394, 2009.

VIGUIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N.; WELBECK, K.; O'KENNEDY, R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 486-493, 2009.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Dairy chemistry and physics**. New York: John Wiley & Sons, 2002. 467 p.

WANG, L.; JAYARAO, B. M. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Bulk Tank Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 6, p. 1421-1429, 2001.

WATTERS, R. D.; SCHURING, N.; ERB, H. N.; SCHUKKEN, Y. H.; GALTON, D. M. The effect of premilking udder preparation on Holstein cows milked 3 times daily. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1170-1176, 2012.

WICKSTRÖM, E.; PERSSON WALLER, K.; LINDMARK-MÅNSSON, H.; STERNESJÖ, Å. Short communication: Relationships between α -lactalbumin and quality traits in bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 10, p. 4577-4581, 2010.

WILLIAMS, H. J.; CRIPPS, P. J.; GROVE-WHITE, D. H. The association between high milk somatic cell counts in the first lactation and somatic cell counts in the second lactation. **The Veterinary Journal**, v. 191, n. 2, p. 183-187, 2012.

WILLIAMSON, J. H.; WOOLFORD, M. W.; DAY, A. M. The prophylactic effect of a dry-cow antibiotic against *Streptococcus uberis*. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 43, n. 6, p. 228-234, 1995.

YAGOUB, S. O.; BELLOW, F. A.; EL ZUBEIR, I. E. M. Effect of temperature and storage period on the constituents of milk inoculated with *Pseudomonas aeruginosa*. **Research Journal of Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 30-34, 2008.

ZADOKS, R. N.; GONZÁLEZ, R. N.; BOOR, K. J.; SCHUKKEN, Y. H. Mastitis-Causing Streptococci Are Important Contributors to Bacterial Counts in Raw Bulk Tank Milk. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 12, p. 2644-2650, 2004.

ZADOKS, R. N.; MIDDLETON, J. R.; MCDUGALL, S.; KATHOLM, J.; SCHUKKEN, Y. H. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 357-372, 2011.

ZUCALI, M.; BAVA, L.; TAMBURINI, A.; BRASCA, M.; VANONI, L.; SANDRUCCI, A. Effects of season, milking routine and cow cleanliness on bacterial and somatic cell counts of bulk tank milk. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 4, p. 436-441, 2011.