CRISTINA SIMÕES CORTINHAS

Qualidade do leite cru e práticas de manejo em fazendas leiteiras

Pirassununga

2013

CRISTINA SIMÕES CORTINHAS

Qualidade do leite cru e práticas de manejo em fazendas leiteiras

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

Pirassununga
2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2906
FMVZ

Cortinhas, Cristina Simões

Qualidade do leite cru e práticas de manejo em fazendas leiteiras / Cristina Simões Cortinhas. --
2013.

125 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Leite de tanque. 2. Contagem bacteriana total. 3. Contagem de células somáticas. 4. Patógenos
causadores de mastite. I. Título.

ERRATA

CORTINHAS, C. S. **Qualidade do leite cru e práticas de manejo em fazendas leiteiras.** 2013. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Página Ficha catalográfica	Onde se lê	Leia-se
	1. Leite de tanque. 2. Contagem bacteriana total. 3. Contagem de células somáticas. 4. Patógenos causadores de mastite.	1. Leite de tanque. 2. Contagem bacteriana total. 3. Qualidade higiênica do leite. 4. Contagem de células somáticas. 5. Patógenos causadores de mastite.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Qualidade do leite cru e práticas de manejo em fazendas leiteiras”, protocolado sob o nº 2299/2011, utilizando amostras de leite bovino, 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 “Quality of raw milk and management practices on dairy farms”, protocol number 2299/2011, utilizing bovine milk samples, 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 julho de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CORTINHAS, Cristina Simões

Título: **Qualidade do leite cru e práticas de manejo em fazendas leiteiras**

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*À minha querida família e
aos meus grandes amigos.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo apoio financeiro institucional, sem a qual a realização desse sonho acalentado por tantos anos teria sido apenas sonho.

Ao Professor Dr. Marcos Veiga dos Santos pela confiança, pelos ensinamentos, pela amizade e pelo exemplo profissional. À Dra. Pamela Ruegg (professor, dairy science; extension milk quality specialist- University of Wisconsin) pela oportunidade e todos os ensinamentos durante cinco meses de estágio na Universidade de Wisconsin, EUA.

Ao laticínio e a todos os técnicos e produtores de leite que auxiliaram durante o período experimental, sem eles não seria possível a realização do experimento que não passaria de sonho.

Ao professor Augusto Gameiro e todo o corpo docente do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP), por sempre estarem dispostos a ajudar. A todos os funcionários da Universidade de São Paulo por me acolherem durante meus seis anos de pós-graduação.

Ao funcionário José Franchini pela paciência, bom-humor e, apoio e dedicação. À Carol Hulland, técnica do laboratório em Wisconsin, pelas técnicas de laboratório que me ensinou, pelo companheirismo e pela paciência em me entender, principalmente durante meus primeiros dias nos EUA.

Aos meus amigos Susana, Lucinéia, Alessandra e Bruno que acompanharam toda a minha trajetória de doutorado, sempre me incentivando, auxiliando em análises e coletas e dando muitos conselhos, sem eles este trabalho não teria sido concretizado.

Aos colegas de Pós-Graduação Juliana Barreiro, Juliano, Cristian, Marina, Camila, Tiago, Aline, Nara, Daniele, Marcos e todos com quem convivi durante minha pós-graduação. Aos pós-graduandos do dairy Science- Wisconsin, Leane, Maria José, Zé, Roxanne, Rob e Ana Carolina, que me acolheram e me ensinaram como sobreviver à -30°C, num local onde a qualquer momento pode ocorrer alguma “Snow Storm”.

Aos meus irmãos, Renata, Fernanda, Márcia e Neto, pelo incentivo, apoio, amizade, carinho e, principalmente, por compreender minhas ausências em momentos importantes de suas vidas.

Aos meus amigos Joselaine, Joseli, Dú e Lú por estarem presentes nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo apoio por vocês me mostrarem a vida por vários prismas diferentes.

Por fim, à Jú, sem a qual essa tese talvez não tivesse sido concluída. Obrigada por seu companheirismo, dedicação, por estar presente nos momentos mais difíceis, por seus conselhos, sua força, seu socorro e sua compreensão.

*"Nossa recompensa se encontra no esforço e não no resultado. Um esforço total é
uma vitória completa."*

Mahatma Ghandi

RESUMO

CORTINHAS, C. S. **Qualidade do leite cru e práticas de manejo em fazendas leiteiras.** [Quality of raw milk and management practices in dairy farms]. 2013. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

O objetivo geral do estudo foi avaliar os fatores de risco associados com práticas de manejo e a qualidade higiênica do leite cru, e caracterizar o nível de conhecimento e opiniões de produtores de leite sobre controle de mastite e qualidade do leite. Os objetivos específicos foram avaliar os fatores de risco associados com a qualidade higiênica do leite, determinar o efeito do tipo de agente causador de mastite sobre a qualidade do leite cru, e avaliar a associação entre o nível de conhecimento dos produtores e a contagem de células somáticas (CCS) do leite de tanque. O presente estudo foi dividido em três experimentos. No experimento 1, para avaliação de práticas de manejo associadas à qualidade higiênica do leite cru em rebanhos leiteiros, foram selecionados 120 rebanhos de acordo com a média geométrica da contagem bacteriana total (CBT) de 10 amostras de leite/ rebanho coletadas durante dois meses consecutivos, para compor dois grupos: 60 com alta CBT ($1,11 \times 10^4$ UFC/mL) e 60 com baixa CBT ($4,4 \times 10^3$ UFC/mL). Após a seleção, amostras de leite foram coletadas uma vez por semana durante dois meses para determinação da CBT, contagem do leite com incubação preliminar (CIP), contagem do leite pasteurizado (CLP), contagem de coliformes (CC), CCS e de concentrações de gordura, proteína e sólidos totais. Após a realização das análises, 63 rebanhos foram selecionados e visitados para aplicação de questionário sobre: a) informações gerais de manejo do rebanho; b) manejo de ordenha; c) procedimentos de limpeza de equipamento de ordenha e utensílios; d) programa de controle da mastite; e) condições de limpeza do úbere. Para o experimento 2, o nível de conhecimento e as opiniões dos produtores de leite sobre mastite e qualidade do leite, foram avaliados em 63 rebanhos selecionados e distribuídos de acordo com as médias geométricas da CCS (8 coletas semanais consecutivas durante dois meses) em três grupos: a) baixa CCS: ≤ 250.000 céls/mL ($n = 16$); b) média CCS: $>250.000 \leq 400.000$ céls/mL ($n = 24$); c) alta CCS: > 400.000 céls/mL ($n = 23$). Nos rebanhos selecionados, foram aplicados questionários aos responsáveis pelo manejo do rebanho, com questões sobre: características socioeconômicas, conhecimentos a respeito de CCS, CBT e mastite e comportamentos dos produtores com relação a práticas de

prevenção da mastite. No experimento 3, para avaliação da associação entre patógenos causadores de mastite e qualidade do leite, foram selecionados 90 rebanhos com base na CCS do tanque de 10 amostras/ rebanho coletadas durante dois meses consecutivos, para compor os seguintes grupos: a) ≤ 250.000 céls/mL (n = 30); b) $>250.000 \leq 600.000$ céls/mL (n = 30); c) >600.000 céls/mL (n = 30). As amostras do leite de tanque foram coletadas, a cada 15 dias por um período de 3 meses, para determinação da contagem de *Staphylococcus aureus*, contagem de *Streptococcus agalactiae*, contagem de estafilococos coagulase-negativa, contagem de estreptococos ambientais, contagem de *Escherichia coli*, contagem de coliformes totais, CBT, CCS e de concentrações de gordura, proteína e sólidos totais. A alta quantidade de matéria orgânica presente na válvula de saída do tanque de expansão é um fator de risco para a qualidade higiênica do leite cru; o uso do desinfetante de tetos pré e pós-ordenha são práticas de manejo que reduzem a contagem dos principais indicadores de qualidade higiênica do leite e a prática de ordenha com o bezerro ao pé da vaca está associada ao aumento de CBT, CIP e CC. Outros fatores socioeconômicos como ter o leite como principal atividade econômica na propriedade, o tipo de ordenha utilizada no rebanho, o uso de métodos para detecção de mastite e o conhecimento das exigências legais de CCS e CBT foram fatores associados à CCS do leite de tanque. Adicionalmente, altas contagens de *Streptococcus agalactiae* reduzem a qualidade do leite de tanque por estarem correlacionadas com o aumento de CCS.

Palavras-chave: Leite de tanque. Contagem bacteriana total. Qualidade higiênica do leite. Contagem de células somáticas. Patógenos causadores de mastite.

ABSTRACT

CORTINHAS, C. S. **Quality of raw milk and management practices in dairy farms.** [Qualidade do leite cru e práticas de manejo em fazendas leiteiras]. 2013. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

The overall objective of this study was to evaluate risk factors associated with management practices and hygienic raw milk quality, and to characterize the farmer's knowledge and opinions about mastitis control and milk quality. The specific objectives were to evaluate the risk factors associated with hygienic milk quality, to determine the effect of mastitis pathogens on raw milk quality and to assess the association between farmer's knowledge about mastitis control and somatic cell count (SCC) of bulk tank. Therefore, we proposed three experiments. For experiment 1, to evaluate management practices associated with hygienic quality of raw milk in dairy farms, 120 dairy herds were selected according to the geometric mean of the total bacterial count (TBC) from 10 milk samples collected during two consecutive months, which were distributed in two groups: high TBC (1.11×10^4 CFU / mL, n = 60) and low TBC (4.4×10^3 CFU / mL, n = 60). After selection of herds, milk samples were collected weekly for two months to perform analyzes of TBC, preliminary incubation count (PIC), laboratory pasteurization count (LPC), coliform count (CC), somatic cell count (SCC) and fat, protein and total solids concentrations. After laboratory analysis, 63 herds were visited for on-farm data collection by a questionnaire about: a) general aspects of farm management; b) milking management; c) milking equipment and utensils cleaning procedures; d) mastitis control; e) udder cleaning conditions. For experiment 2, to evaluate the knowledge and opinions of dairy farmers about mastitis control and milk quality, 63 herds were selected and distributed according to geometric means of SCC (8 weekly milk sampling during two consecutive months) into three groups: a) low SCC: $\leq 250,000$ cells / mL (n = 16); b) medium SCC: $>250,000 \leq 400,000$ cells / mL (n = 24); c) high SCC: $> 400,000$ cells / mL (n = 23). Previously formulated questionnaires were submitted to the herd manager, with questions about the following topics: socioeconomic characteristics, knowledge about SCC, TBC, mastitis and mastitis prevention practices. For experiment 3, to evaluate the association between mastitis pathogens, SCC and TBC, 90 herds were selected based on the SCC of 10 milk samples collected during two consecutive months, to compose the following groups: a) $\leq$

250,000 cells / mL (n = 30), b) >250,000 ≤600,000 cells / mL (n = 30), c) > 600,000 cells / mL (n = 30). Bulk Tank milk samples were collected every 15 days for a period of three months, for *Staphylococcus aureus* count, *Streptococcus agalactiae* count, coagulase-negative staphylococci count, environmental streptococci count, *Escherichia coli* count, coliform count, TBC, SCC and fat, protein and total solids concentrations. The high amount of organic matter in the bulk tank outlet valve is a risk factor for the raw milk hygienic quality, the use of pre and post teat dipping is associated with a reduction of major indicators of raw milk hygienic quality and the presence of suckling calves before milking was associated with increased TBC, PIC and CC. Other social and economical factors, such as the milk as main economic activity in the farm, type of milking procedures used, the use of methods for mastitis detection and knowledge about legal requirements for SCC and TBC were correlated with CCS in bulk tank milk. Additionally, high *Streptococcus agalactiae* counts is associated with reduced bulk tank milk quality because of increased SCC.

Keywords: Bulk tank milk. Total bacterial count. Hygienic quality. Somatic cell count. Mastitis pathogens.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Teoria do Comportamento Planejado	42
Figura 2 - Correlação entre as contagens (em unidades logarítmicas) de células somáticas (CCS) e de <i>Streptococcus agalactiae</i> ($R^2 = 0,24$)	101
Quadro 1 - Limites máximos de contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) para o leite de tanque (propriedade ou tanque comunitário) estabelecidos na IN62/2011	22
Quadro 2 - Principais espécies de bactérias isoladas do leite de tanque	33
Quadro 3 - Vantagens e desvantagens dos principais estudos analíticos	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação entre CCS do tanque, porcentagem de quartos infectados e porcentagem de perdas de produção de leite	40
Tabela 2 – Prêmio ou penalização recebida (R\$/kg de leite entregue) de acordo com a contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS)	50
Tabela 3 – Contagem bacteriana total (CBT), contagem do leite com incubação preliminar (CIP), contagem do leite pasteurizado (CLP), contagem de coliformes totais (CC), e contagem de células somáticas (CCS) dos rebanhos com alta (n=28) e baixa (n=35) CBT, alta (n=38) e baixa (n=25) CIP, alta (n=32) e baixa (n=31) CLP e alta ((n=26) e baixa (n=37) CC (média aritmética).....	57
Tabela 4 - Frequências das variáveis qualitativas relacionadas aos procedimentos de manejo e higiene (respostas binomiais) utilizados nos rebanhos com alta ($1,2 \times 10^5$ UFC/mL) e baixa ($4,2 \times 10^4$ UFC/mL) contagem bacteriana total (CBT), alta ($4,5 \times 10^5$ UFC/mL) e baixa ($7,3 \times 10^4$ UFC/mL) contagem do leite com incubação preliminar (CIP), alta ($8,2 \times 10^3$ UFC/mL) e baixa ($4,5 \times 10^3$ UFC/mL) contagem do leite pasteurizado (CLP), alta ($1,1 \times 10^3$ UFC/mL) e baixa ($9,3 \times 10^1$ UFC/mL) contagem de coliformes (CC).....	60
Tabela 5 - Frequências das variáveis qualitativas relacionadas aos procedimentos de higienização (respostas binomiais e trinomiais) utilizados nos rebanhos com alta ($1,2 \times 10^5$ UFC/mL) e baixa ($4,2 \times 10^4$ UFC/mL) contagem bacteriana total (CBT), alta ($4,5 \times 10^5$ UFC/mL) e baixa ($7,3 \times 10^4$ UFC/mL) contagem do leite com incubação preliminar (CIP), alta ($8,2 \times 10^3$ UFC/mL) e baixa ($4,5 \times 10^3$ UFC/mL) contagem do leite pasteurizado (CLP), alta ($1,1 \times 10^3$ UFC/mL) e baixa ($9,3 \times 10^1$ UFC/mL) contagem de coliformes (CC).....	62
Tabela 6 - Características da água (dureza e pH) e quantidade de filme orgânico (média geométrica de ATP na teteira, filtro da unidade final ou balde ao pé, saída do tanque de expansão e copo coletor) após os procedimentos de limpeza dos equipamentos de ordenha dos grupos com alta ($1,2 \times 10^5$ UFC/mL) e baixa ($4,2 \times 10^4$ UFC/mL) contagem bacteriana total (CBT), alta ($4,5 \times 10^5$ UFC/mL) e baixa ($7,3 \times 10^4$ UFC/mL) contagem do leite com incubação preliminar (CIP), alta ($8,2 \times 10^3$ UFC/mL) e baixa ($4,5 \times 10^3$ UFC/mL) contagem do leite pasteurizado (CLP), alta ($1,1 \times 10^3$ UFC/mL) e baixa ($9,3 \times 10^1$ UFC/mL) contagem de coliformes (CC)	64

Tabela 7 - Nível de significância do modelo final de regressão logística para a contagem bacteriana total (CBT), contagem do leite com incubação preliminar (CIP), contagem do leite pasteurizado (CLP) e contagem de coliformes (CC).....	66
Tabela 8 - Contagem bacteriana total (CBT), contagem do leite com incubação preliminar (CIP), contagem do leite pasteurizado (CLP), contagem de coliformes totais (CC) e contagem de células somáticas (CCS), agrupados pela contagem de células somáticas (grupos baixa, média e alta CCS)	80
Tabela 9 - Características dos produtores (grau de escolaridade, renda) e da propriedade (atividades, importância econômica do leite, produção de leite, tipo de ordenha e assistência técnica) nos grupos baixa, média e alta CCS	82
Tabela 10 - Práticas de prevenção e controle de mastite nos rebanhos com baixa, média e alta CCS.....	83
Tabela 11 - Conhecimento com relação à mastite dos entrevistados nos grupos baixa, média e alta CCS.....	85
Tabela 12 - Conhecimento com relação à contaminação bacteriana e legislação, opinião sobre qualidade do leite e capacitação dos entrevistados nos grupos baixa, média e alta CCS	87
Tabela 13 - Estatística descritiva das contagens de patógenos causadores de mastite e da contagem bacteriana total de acordo com a CCS do leite de tanque.....	99
Tabela 14 - Contagens de <i>Staphylococcus aureus</i> , estafilococos coagulase-negativos (ECN), <i>Streptococcus agalactiae</i> e estreptococos ambientais, de acordo com a CCS do tanque de rebanhos leiteiros	100
Tabela 15 - Coeficientes de correlação de Pearson entre a CCS, a CBT e as contagens de patógenos causadores de mastite	100

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Qualidade do leite cru refrigerado no Brasil.....	21
2.2	Monitoramento da qualidade do leite cru	23
2.3	Determinação de contagem bacteriana no leite (CBT).....	28
2.4	Contagem com incubação preliminar (CIP)	29
2.5	Contagem do leite pasteurizado (CLP).....	29
2.6	Contagem de coliformes totais (CC)	30
2.7	Contagem de células somáticas (CCS).....	31
2.8	Classificação dos principais micro-organismos causadores de mastite.....	32
2.9	Contagem diferencial de micro-organismos causadores de mastite no leite de tanque..	37
2.10	Interpretação de análises do leite de tanque.....	38
2.11	Atitudes e conhecimentos sobre qualidade do leite	41
2.12	Análises epidemiológicas	43
3	PRÁTICAS DE MANEJO ASSOCIADAS À QUALIDADE DO LEITE CRU EM REBANHOS LEITEIROS.....	46
3.1	Introdução	48
3.2	Material e Métodos	49
3.2.1	Seleção dos rebanhos leiteiros e coleta de amostras.....	49
3.2.2	Análises microbiológicas do leite	51
3.2.3	Determinação da composição e contagem de células somáticas do leite	52
3.2.4	Coleta de dados nas fazendas leiteiras	52
3.2.5	Determinação da dureza e pH da água	53
3.2.6	Estimativa do escore de condição de limpeza do úbere	53
3.2.7	Análises estatísticas	53
3.3	Resultados.....	56
3.3.1	Caracterização dos rebanhos leiteiros quanto à microbiologia e composição do leite...	56
3.3.2	Caracterização dos rebanhos quanto às práticas de manejo utilizadas	58
3.3.3	Fatores de risco para a qualidade do leite cru	65

3.4	Discussão	67
3.4.1	Práticas de manejo associadas à contagem bacteriana total	67
3.4.2	Práticas de manejo associadas à contagem do leite com incubação preliminar	70
3.4.3	Práticas de manejo associadas à contagem do leite pasteurizado	72
3.4.4	Práticas de manejo associadas à contagem de coliformes	72
3.5	Conclusão	74
4	PERFIL SOCIOECONÔMICO, ATITUDES E CONHECIMENTO DE PRODUTORES DE LEITE EM RELAÇÃO À MASTITE E À QUALIDADE DO LEITE	75
4.1	Introdução	76
4.2	Material e Métodos	78
4.2.1	Seleção dos rebanhos leiteiros e análises laboratoriais.....	78
4.2.2	Coleta de dados na fazenda leiteira	78
4.2.3	Análises estatísticas	79
4.3	Resultados	80
4.4	Discussão	88
4.5	Conclusão	92
5	ASSOCIAÇÃO ENTRE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL EM REBANHOS LEITEIROS	93
5.1	Introdução	94
5.2	Material e Métodos	96
5.2.1	Seleção dos rebanhos leiteiros e análises laboratoriais.....	96
5.2.2	Análises microbiológicas do leite	96
5.2.3	Análises estatísticas	97
5.3	Resultados	98
5.4	Discussão	102
5.5	Conclusão	105
6	CONCLUSÃO GERAL.....	106
	REFERÊNCIAS	107
	APÊNDICES	118

1 INTRODUÇÃO

A produção de matérias primas de alta qualidade é um dos principais desafios para o aumento da competitividade do sistema agroindustrial do leite. Dentro deste contexto, a qualidade do leite cru é um dos principais pré-requisito para otimizar o processamento, rendimento e aceitabilidade dos derivados lácteos.

A produção de leite cru com baixa contagem bacteriana depende de diversos fatores, tais como: a saúde e higiene da vaca, a higiene dos equipamentos de ordenha, o tempo e a temperatura de armazenamento do leite. Para monitorar a qualidade higiênica do leite é possível utilizar análises microbiológicas de amostras de leite coletado diretamente do tanque de expansão. Estas análises indicam, quando realizadas rotineiramente, e interpretadas em associação com as práticas de manejo utilizadas na fazenda, a saúde do rebanho e as condições ambientais de produção e armazenamento do leite (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). Para avaliação da qualidade do leite de tanque são utilizadas, atualmente, análises como: a contagem bacteriana total (CBT), a contagem no leite com incubação preliminar (CIP), a contagem de leite pasteurizado (CLP) e a contagem de coliformes (CC). A CBT é a mais utilizada e mais indicada para avaliação da condição higiênica geral durante o processo de produção do leite (ELMOSLEMANY et al., 2009b).

Além das análises microbiológicas, outras ferramentas utilizadas para avaliação da qualidade do leite cru de tanques de expansão são a contagem de células somáticas (CCS), uma vez que há relação entre a prevalência de mastite do rebanho e condições higiênicas de produção do leite na fazenda, e a composição do leite (RYSANEK et al., 2007). A CCS do leite de tanque permite estimar a porcentagem de quartos mamários infectados por micro-organismos causadores de mastite (RYSANEK et al., 2007). As avaliações do leite do tanque devem ser realizadas considerando-se três ou mais resultados ao longo de um período de tempo, uma vez que a CCS é influenciada pela prevalência de patógenos específicos e pela prevalência das infecções da glândula mamária (RYSANEK et al., 2009a).

A importância da identificação dos agentes causadores e determinação da prevalência de mastite em rebanhos ocorre em razão desta doença resultar em inúmeros prejuízos à cadeia agroindustrial do leite, pois além de ser uma das causas de aumento da CBT (SOUTO et al., 2008), reduz também a produção de leite por vaca, causa alterações na composição dos produtos lácteos e aumenta custos com medicamentos e descarte do leite com resíduos de antibióticos. A caracterização do tipo de micro-organismo predominante no leite de tanque é

de grande relevância na implantação de programas de controle da mastite e melhoria da qualidade do leite (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). A contagem de micro-organismos a partir do leite de tanque é mais rápida, barata e conveniente do que a realizada por meio de coletas de leite por vaca ou quarto mamário, quando utilizada com os objetivos de identificação dos principais agentes causadores de mastite no rebanho (JAYARAO; WOLFGANG, 2003).

Um dos pontos críticos para implantação de programas de melhoria da qualidade higiênica do leite é a avaliação do conhecimento técnico e das opiniões dos produtores de leite sobre as causas, prejuízos e medidas de controle da mastite bovina e para a melhoria da qualidade do leite. Este tipo de avaliação deve ser regionalizada para auxiliar na determinação da forma que novos conhecimentos podem ser apresentados aos produtores, buscando um referencial de avaliação de mudanças no conhecimento e sensibilização dos produtores frente a novos conceitos (MCLEOD, 2008). Segundo McLeod (2008), ainda são escassas informações sobre conhecimentos dos produtores em relação as causas da mastite e protocolos de prevenção e tratamento mais adequados.

Apesar de alguns estudos prévios terem avaliado fatores de risco associados à alta contagem de CCS no tanque em rebanhos na região da Zona da Mata mineira (SOUZA et al., 2005) e em pequenos rebanhos leiteiros na região nordeste (semiárido) (OLIVEIRA et al., 2011), são escassos os estudos sobre práticas de manejo associadas com a qualidade do leite cru em rebanhos submetidos a programas de pagamento por qualidade do leite. A relação entre a CCS, a CBT e a contagem de agentes causadores de mastite no leite de tanque foi descrita por alguns autores (ZADOKS et al., 2004; RYSANEK et al., 2009b), no entanto, a dinâmica populacional destes agentes varia com a região ou país estudado. No Brasil, alguns estudos correlacionaram a contagem de micro-organismos causadores de mastite com a CCS em amostras de leite coletadas por quarto mamário ou por vaca (SOUZA, G.N. et al., 2009; LOPES et al., 2012), mas nenhum estudo correlacionou as contagens de micro-organismos causadores de mastite com a CCS e a CBT do leite de tanque.

Com relação ao nível de conhecimento de produtores sobre mastite e qualidade do leite, alguns estudos (JANSEN et al., 2009; JANSEN et al., 2010b) foram realizados para avaliar a relação entre o nível de conhecimento, a CCS e a incidência de mastite na Holanda. No entanto, não há estudos que avaliem a influência do conhecimento e opiniões dos produtores no Brasil sobre a CCS e qualidade higiênica do leite de tanque em programas de pagamento por qualidade do leite.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar os fatores de risco associados com a qualidade higiênica do leite, estimar a contribuição relativa da contagem de patógenos causadores de mastite sobre a qualidade higiênica do leite cru e avaliar o nível de conhecimento e opiniões dos produtores sobre mastite e qualidade do leite de rebanhos leiteiros submetidos a programas de pagamento por qualidade em Minas Gerais e São Paulo.

Os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar os fatores de risco associados com a qualidade higiênica do leite;
- b) Determinar a associação entre práticas de manejo de ordenha e de limpeza de equipamentos e a qualidade higiênica do leite;
- c) Determinar o efeito da contagem de agentes causadores de mastite sobre a qualidade higiênica do leite cru;
- d) Estimar a associação entre a CCS e os indicadores de contagem de micro-organismos causadores de mastite em amostras de tanque;
- e) Avaliar o nível de conhecimentos técnicos dos produtores de leite, estratificados segundo a CCS;
- f) Estabelecer associação entre nível de conhecimento, indicadores de qualidade higiênica do leite e contagem de células somáticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Qualidade do leite cru refrigerado no Brasil

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), entende-se por leite cru refrigerado “o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, refrigerado e mantido nas temperaturas constantes com limites máximos de 7° C na propriedade rural e 10° C no estabelecimento processador” (BRASIL, 2011).

No final da década de 1990 e início do século XXI, o cenário de competitividade do setor agroindustrial do leite no Brasil foi marcado por mudanças nas relações entre produtores e laticínios, uma vez que houve incentivo por parte da indústria para que produtores incorporassem novas tecnologias para aumento de produtividade e melhoria da qualidade do leite cru. Além disso, em 2002 o MAPA publicou a Instrução Normativa (IN) nº 51 (BRASIL, 2002) que, dentre suas principais características, determinou o resfriamento obrigatório do leite na fazenda e estabeleceu limites máximos para a CCS, CBT e para resíduos de antibióticos no leite. Para monitorar a qualidade do leite (CCS, CBT e ausência de resíduos), em 2002 foi criada pelo MAPA (IN37/2002) a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL), que hoje é composta por 10 laboratórios credenciados distribuídos em sete estados do Brasil. Dessa forma, a qualidade do leite cru refrigerado passou a ser uma exigência legal e incentivada pela indústria laticionista.

Desde a implantação da IN 51, em 2002, modificações em relação aos limites legais de critérios de qualidade do leite cru refrigerado estão em andamento, devido a diferenças entre características de produção nas diversas regiões do país (NERO et al., 2009). Recentemente, a IN 51/2002 foi substituída pela IN 62/2011 (BRASIL, 2011), a qual estabeleceu novos prazos para a implantação de limites legais de CCS e CBT do leite cru (Quadro 1).

Quadro 1 - Limites máximos de contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) para o leite de tanque (propriedade ou tanque comunitário) estabelecidos na IN62/2011

Sul, Sudeste e Centro-Oeste	Até 31/12/2011	Até 30/06/2014	Até 30/06/2016	01/07/2016
Norte e Nordeste	Até 31/12/2012	Até 30/06/2015	Até 30/06/2017	01/07/2017
CBT (UFC/mL)	$7,5 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
CCS ¹ (CS/mL)	$7,5 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$

¹Uma análise mensal com média geométrica dos últimos três meses.

Fonte: (BRASIL, 2011)

A entrada em vigor de novas legislações de qualidade do leite cru (IN 51 e IN 62) demandou por parte dos produtores a estocagem e refrigeração do leite cru na própria fazenda. O resfriamento do leite na propriedade e o transporte granelizado em caminhões isotérmicos inibem o crescimento bacteriano, diminuindo perdas econômicas com a acidificação e prolongando o armazenamento do leite na propriedade, desta forma, evita perda de qualidade e reduz custos com transporte (PINTO et al., 2006). As enzimas produzidas com o crescimento bacteriano causam alterações físico-químicas no leite, resultando em perdas econômicas pela queda no rendimento industrial, problemas no processamento, produção de derivados lácteos mais instáveis, de pior qualidade e com menor vida de prateleira (VINHOLIS; BRANDÃO, 2009). Além disso, o rápido crescimento bacteriano pode produzir toxinas bacterianas termo-estáveis, freqüentemente associadas a surtos de toxinfecção alimentar (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

A legislação vigente é considerada como alicerce para a qualidade do leite no Brasil, mas seus objetivos se limitam a definir critérios mínimos, os quais passam a ser obrigação de quem produz e processa o leite. Neste cenário, antes mesmo da implantação de novos critérios de qualidade do leite pelo MAPA (IN 51 e IN 62), alguns laticínios implantaram programas de pagamento, com incentivos e penalização com base em critérios e objetivos de qualidade do leite (ROMA JÚNIOR et al., 2009). Segundo Botaro et al. (2013), em programas de pagamento por qualidade, a combinação entre penalidade e incentivos financeiros tem impacto positivo sobre a qualidade do leite. No Brasil, ainda há grande variação com relação aos incentivos e estruturação dos programas de pagamento por qualidade entre indústrias e cooperativas, mas, de forma geral, a CCS e CBT são os principais quesitos utilizados para avaliar a qualidade do leite (ROMA JÚNIOR et al., 2009). Adicionalmente, segundo Paiva et al. (2010) em programas de qualidade é necessário monitorar e avaliar constantemente os

critérios utilizados, de forma a obter melhora contínua nos processos produtivos e índices econômicos (PAIVA et al., 2010).

Segundo dados atuais publicados pela RBQL, em 2012 foram analisadas 2,8 milhões de amostras de leite no Brasil. Destas amostras 71% tiveram CCS abaixo dos limites de 600.000 céls/mL e apenas 60% das amostras apresentaram resultado de CBT abaixo de 600.000 UFC/mL (limites estabelecidos até junho de 2014 nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste). No entanto, somente 48% e 29% das amostras estariam em conformidade com os limites de 400.000 céls/mL para a CCS e 100.000 UFC/mL, respectivamente, impostos pela IN/62 (BRASIL, 2011) para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste em 2016 e para as regiões Norte e Nordeste em 2017 (SANTOS, 2013).

Neste contexto, surgiu a necessidade de se criar um programa nacional com foco na melhoria da qualidade do leite produzido no Brasil para capacitação de um grande número de produtores de leite. Desta forma, em 2013 foi criado o Programa Leite Legal pelo sistema CNA/SENAR (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil/ Serviço Nacional de Aprendizagem Rural) em parceria com o SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas), para capacitar mais de 81 mil produtores. O Programa é composto por 16 horas de treinamento teórico em qualidade do leite, uma visita técnica inicial a cada fazenda e, uma segunda visita técnica após três meses, somente para produtores que não se adequaram aos limites estabelecidos pelo MAPA. Segundo Roberto Alvin, diretor da FAEMG (Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Minas Gerais), é importante que a capacitação inclua produtores, transportadores, coletadores de amostras para análise, laboratórios, departamentos de logística, entre outros. Além disso, Rodrigo Alvim comenta que a remuneração do leite é fundamental para o avanço da produção de leite de qualidade (MILK POINT, 2013).

2.2 Monitoramento da qualidade do leite cru

O leite, pela elevada concentração de lactose, proteínas, gordura, sais minerais e vitaminas, é um excelente meio de cultura para bactérias e outros micro-organismos, e, por este motivo, deve ser resfriado imediatamente após a ordenha até o momento do transporte para a indústria (MARTINS et al., 2008). Medidas como o resfriamento do leite logo após a ordenha e a coleta granelizada são importantes para reduzir a multiplicação de bactérias e

garantir a qualidade do leite (SILVA et al., 2009). No entanto, o resfriamento do leite em tanques de expansão e a coleta granelizada não são suficientes para mantê-lo com baixa contagem bacteriana, pois a contaminação do leite pode ter origem na própria glândula mamária de vacas com mastite, na pele dos tetos (lame, esterco, contaminação ambiental), no contato com as mãos dos ordenhadores, na limpeza deficiente dos equipamentos de ordenha, bem como na água utilizada durante as diversas etapas do manejo de ordenha (KELLY et al., 2009).

De forma geral, a contagem de micro-organismos e de células somáticas presentes no leite do tanque de expansão indica o nível de higiene das práticas de manejo de ordenha e de controle de mastite (GUERREIRO et al., 2005). Por este motivo, análises do leite de tanque podem ser utilizadas para contagem de micro-organismos encontrados e detectar espécies de interesse para o controle de mastite. Diferentes análises microbiológicas como a CBT, CLP, CIP, CC e contagem diferencial de patógenos (*Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., principalmente) do leite de tanque, podem ser utilizadas para identificar as origens e as possíveis soluções para problemas de alta contaminação microbiana do leite cru em nível de fazenda (EDMONDSON, 2005; KEEFE, 2009).

Estudos foram realizados por Barkema et al. (1999); Jayarao et al. (2004); Rodrigues et al. (2005); Rodrigues e Ruegg, (2005); Souza et al. (2005); Van Schaik et al. (2005); Rysanek et al. (2007); Elmoslemany et al. (2009a,b,c, 2010); Kelly et al. (2009); Nero et al. (2009); Rysanek et al. (2009); Bava et al. (2011) e Oliveira et al. (2011) com o objetivo de avaliar a relação entre as práticas de manejo utilizadas na produção de leite e a qualidade do leite de tanque.

Barkema et al. (1999), com o objetivo de avaliar a associação entre diferentes formas de manejo com a CCS e a incidência de mastite clínica, selecionaram 300 rebanhos leiteiros e os classificaram nas seguintes categorias: ≤ 150.000 céls/mL (baixa), 151.000 a 250.000 céls/mL (média) e 251.000 a 400.000/mL céls/mL (alta). Rebanhos com baixa CCS (≤ 150.000 céls/mL) foram manejados por produtores mais jovens, com filhos que possuíam maior grau de escolaridade, e mais dispostos a investir em novas tecnologias, quando comparados com rebanhos classificados com alta CCS (251.000 a 400.000/mL céls/mL). Os produtores do grupo de baixa CCS gastavam mais tempo em práticas como o uso de desinfetante pré e pós-ordenha e a terapia da vaca seca, do que os produtores com alta CCS (BARKEMA et al., 1999).

Jayarao et al. (2004) avaliaram o leite de tanque de 26 fazendas no estado da Pennsylvania (EUA) e categorizaram as seguintes variáveis em baixa, média e alta: CCS (<

200.000, $200.000 \geq 400.000$ e > 400.000 céls/mL, respectivamente), CBT (< 5.000 , $5.000 \geq 10.000$ e > 10.000 UFC /mL, respectivamente), CIP (< 10.000 , $10.000 \geq 20.000$ e > 20.000 UFC /mL, respectivamente), CLP (< 100 , $100 \geq 200$ e > 200 UFC /mL, respectivamente), CC (< 50 , $50 \geq 100$ e > 100 UFC /mL, respectivamente), *Streptococcus* ambientais (< 500 , $500 \geq 1000$ e > 1000 UFC /mL, respectivamente), *Staphylococcus* coagulase negativo (< 500 , $500 \geq 1000$ e > 1000 UFC /mL, respectivamente) e bactérias gram negativas não coliformes (< 200 , $200 \geq 400$ e > 400 UFC /mL, respectivamente).

Adicionalmente, Jayarao et al. (2004) analisaram as correlações entre estas variáveis, as práticas de manejo e o tamanho do rebanho. O tamanho do rebanho e determinadas práticas de manejo (uso cama de areia para animais em confinamento, uso de desinfetante pré e pós-ordenha) interferiram sobre a CCS e CBT, no entanto, houve também baixa correlação entre as contagens bacterianas (CIP, CLP, CC) obtidas (JAYARAO et al., 2004).

No Brasil, Souza et al. (2005) avaliaram e classificaram 175 rebanhos na região da Zona da Mata (Minas Gerais) com os objetivos de identificar e quantificar fatores relacionados às características de rebanho, procedimentos de manejo e higienização na ordenha que influenciam a CCS. Os fatores associados à alta CCS foram: a não adoção de linha de ordenha, a alimentação durante a ordenha e a ausência de desinfecção dos tetos após a ordenha.

Van Schaik et al. (2005) avaliaram o leite de tanque de 150 pequenos produtores chilenos (fazendas com no máximo 100 hectares e 42 vacas em lactação) para identificar os fatores que interferem na qualidade do leite. No modelo logístico utilizado, foram selecionados como fatores de risco para a alta CBT: a falta de higienização dos latões após a ordenha de vacas com mastite, a falta de resfriamento do leite, o tipo de piso utilizado no curral de espera (terra ou cascalho *versus* cimento) e a utilização de baldes de plástico para ordenha (VAN SCHAİK et al., 2005). O uso de CMT e a ordenha de vacas com mastite ao final da ordenha foram associados com a redução da CCS do leite de tanque de 2×10^6 para $4,6 \times 10^4$ (VAN SCHAİK et al., 2005).

Com o objetivo de caracterizar rebanhos leiteiros de Wisconsin (EUA), assistidos por um programa de qualidade do leite, Rodrigues et al. (2005) analisaram as práticas de manejo associadas à alta CCS. A contagem de CCS, a CBT a incidência de mastite clínica e a prevalência de mastite subclínica foram positivamente correlacionadas com o número de vacas descartadas por mastite e a estimativa de perdas financeiras atribuídas à mastite (RODRIGUES et al., 2005). Em outro estudo, Rodrigues e Ruegg (2005) avaliaram os resultados de medidas implantadas pelo programa estadual de qualidade do leite em

Wisconsin, EUA, durante quatro anos (2001 a 2004). Rebanhos que iniciaram o programa estadual de qualidade do leite de Wisconsin com alta CCS passaram por um processo de melhoria na qualidade do leite, resultando em grande redução da CCS e das perdas atribuídas à mastite.

Rysanek et al. (2007) estudaram a relação entre agentes causadores de mastite (*Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) e a CCS utilizando modelo de regressão logística binária. Estes autores descreveram que a probabilidade de encontrar agentes patogênicos causadores de mastite em rebanhos com 400.000 céls/mL é de 63%. Por outro lado a probabilidade de encontrar estes agentes em rebanhos com 100.000 céls/mL é de 20%. A alta percentagem de agentes causadores de mastite encontrada em rebanhos com baixa CCS indica que houve fonte de contaminação ambiental.

Kelly et al. (2009) avaliaram os fatores de risco associados à alta CBT de 400 rebanhos irlandeses em regime de pastejo. Os fatores associados à redução da CBT foram: o corte dos pêlos da cauda (este procedimento reduz o espalhamento de matéria orgânica pela cauda da vaca durante a ordenha), disponibilidade de água aquecida na sala de ordenha e a utilização de programas de gerenciamento de dados do rebanho (KELLY et al., 2009).

Nero et al. (2009) selecionaram 60 rebanhos da região de Viçosa (Minas Gerais, Brasil) com o objetivo de avaliar o efeito de práticas de manejo sobre a qualidade do leite cru (contagens de micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos). Neste estudo (Nero et al., 2009), a maioria das propriedades foi caracterizada como pequena (< 15 vacas em lactação e produção de leite < 50 L / dia); o monitoramento sistemático de mastites pelo CMT não era realizado pela maior parte dos produtores; a refrigeração foi o procedimento identificado como mais significativo para manter a qualidade do leite. Estes autores ainda observaram que o uso de CMT e de desinfetante de tetos pré e pós-ordenha era mais frequente em fazendas com produção de leite superior a 100L.

Elmoslemany et al. (2009a) determinaram a CBT, CIP, CLP e CC e avaliaram as correlações entre as variáveis analisadas e a alteração sazonal em 237 rebanhos, durante dois anos, na Ilha do Príncipe Edward (Canadá). Houve moderada correlação (0,57) entre a CBT e CIP e baixa correlação (< 0,26) entre as demais variáveis avaliadas (ELMOSLEMANY et al., 2009a). Com relação aos efeitos sazonais, houve tendência de menor contagem de todas as variáveis analisadas durante o inverno; a CC e a CCS foram mais altas no verão; a CBT tendeu a ser menor no verão; e os efeitos sazonais foram atribuídos a alterações nas práticas de manejo utilizadas (ELMOSLEMANY et al., 2009a).

Elmoslemany et al. (2009b,c) utilizaram delineamento tipo “caso” e “controle” para estimar os fatores de risco associados à alta CBT, CIP, CLP e CC. Neste tipo de estudo (“caso” e “controle”) o investigador busca no passado (retrospectivo) a presença ou ausência do fator de exposição a partir de indivíduos casos (com doença, i.e) e indivíduos controle (sem doença). Estes autores observaram que a deficiência de higiene das extremidades dos tetos e a alta alcalinidade da água de limpeza foram fatores de risco para a alta CBT (ELMOSLEMANY et al., 2009b). A lavagem dos tetos e a não utilização do desinfetante pré-ordenha e o acúmulo de sujeira nos tetos foram associados à alta CBT e CIP; além disso, a baixa temperatura da solução de limpeza, a alta dureza da água e a alta alcalinidade da solução detergente foram fatores associados à alta CLP e CC (ELMOSLEMANY et al., 2009c).

Elmoslemany et al. (2010) descreveram outros fatores que interferem na CBT, CLP, CIP e CC, por meio de análise longitudinal (análise que associa o efeito de um ou mais fatores ao longo do tempo), tais como: a limpeza manual do tanque de expansão, a utilização de detergentes específicos para cada etapa de limpeza, a secagem dos tetos após o uso do desinfetante pré-ordenha e a retirada dos pelos do úbere.

Bava et al. (2011) correlacionaram as características dos procedimentos de limpeza dos equipamentos de ordenha à CBT do leite de tanque de 22 rebanhos na Itália. A contaminação por bactérias psicotróficas no leite do tanque e a CC nas linhas do equipamento de ordenha foram correlacionadas com a temperatura das soluções detergentes e de enxágue (BAVA et al., 2011). Estes autores ainda concluíram que a inspeção e adequação da temperatura da água durante a limpeza dos equipamentos pode ser uma medida simples e efetiva no controle dos fatores de risco para a qualidade higiênica do leite de tanque.

Oliveira et al. (2011) avaliaram fatores de risco associados à qualidade do leite cru no nordeste do Brasil quanto à CCS e à CBT. O estudo foi realizado em 50 pequenas (produção de leite < 50L /dia) e médias propriedades (produção entre 50 e 100L/dia). Considerando os limites legais de CBT e CCS na região Nordeste em 2008 (1.000.000 UFC /mL para a CBT e 1.000.000 células/mL para a CCS), 88% das propriedades atenderam os limites legais de CBT e 94% de CCS. No modelo logístico utilizado foram identificados como fatores associados à redução na CBT e contagem de *Staphylococcus aureus*: a lavagem dos tetos pré-ordenha e o uso de desinfetante pós-ordenha (OLIVEIRA et al., 2011).

O emprego de diferentes análises microbiológicas do leite de tanque representa uma alternativa tecnológica para produtores e laticínios identificarem origens e possíveis soluções para problemas de alta contaminação microbiana do leite cru em nível de fazenda.

2.3 Determinação de contagem bacteriana no leite (CBT)

O método referência para determinar a CBT é a contagem padrão em placas, que estima o número total de colônias de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas presentes no leite (WEHR; FRANK, 2004). A execução da metodologia de CBT é simples, pois consiste no plaqueamento de alíquotas da amostra, homogeneizada e diluída, em meio de cultura padrão para contagem (WEHR; FRANK, 2004). Após um período de incubação de 48 horas a 32° C, o número de colônias presente na placa é contado e o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) (WEHR; FRANK, 2004). As limitações da contagem padrão em placas para determinação de CBT são o custo elevado e a o maior tempo para do processamento das amostras à obtenção dos resultados (48 horas) em comparação com os métodos automatizados (GUNASEKERA et al., 2003; HOLM et al., 2004).

As placas Petrifilm[®] representam uma alternativa para metodologia de referência de CBT e tem como vantagem a eliminação da etapa do preparo dos meios de cultura. As placas Petrifilm[®] AC são compostas por ágar padrão, agente geleificante solúvel em água fria e indicador tetrazólico cloreto trifênil (TTC), utilizado para facilitar a visualização das colônias (SANT'ANA et al., 2002). Como desvantagem, a utilização do Petrifilm[®] limita o crescimento de algumas espécies de bactérias devido ao meio de cultura utilizado. Além disso, o valor da análise com estas placas é mais elevado em comparação com o valor da análise por meio da metodologia referência.

A CBT também pode ser determinada pela metodologia de citometria de fluxo, em equipamentos automatizados, por meio da medição de características celulares das bactérias, quando suspensas em meio líquido (BARRIENTOS et al., 2000). Nesta metodologia, são utilizados corantes específicos, como o brometo de etídio, que se ligam ao DNA e RNA celular e, por meio de radiação captada pelo equipamento, são transformadas em impulsos elétricos usados para estimar a contagem individual de bactérias (CASSOLI et al., 2010). Como a citometria de fluxo determina a contagem individual de bactérias (CIB), existe a necessidade de transformação dos resultados de CIB para UFC, utilizando-se uma equação de correlação (SIERRA et al., 2009).

As vantagens da metodologia por citometria de fluxo são a maior precisão, o baixo custo e o elevado rendimento analítico (rapidez na execução das análises). Portanto, o uso de métodos automatizados para determinação da CBT é uma opção viável para ser utilizada em

programas de pagamento por qualidade e no Programa Nacional de Qualidade do Leite (CASSOLI et al., 2010).

2.4 Contagem com incubação preliminar (CIP)

A CIP é usada para estimar o grupo de bactérias psicrotróficas, que se multiplica em temperaturas abaixo de 7°C (WEHR; FRANK, 2004). Este grupo de bactérias está frequentemente associado à redução da vida de prateleira do leite devido à ação de proteases e lipases que hidrolisam a proteína e a gordura do leite, respectivamente (JONES; SUMNER, 1999). Para determinação da CIP, as amostras são incubadas por 18 horas a 12,8°C e, na sequência, passam pelos mesmos procedimentos realizados para contagem padrão em placas (JONES; SUMNER, 1999; JAYARAO; WOLFGANG, 2003).

Jones e Sumner (1999) listam algumas possíveis causas de alta CIP: falhas durante o processo de limpeza dos equipamentos de ordenha, resfriamento lento ou insuficiente do leite após a ordenha, deficiência na higienização das vacas pré-ordenha, contaminação da água utilizada para limpeza (especialmente por coliformes), funcionamento deficiente dos equipamentos de ordenha e mastite por *Streptococcus agalactiae* e outros estreptococos.

2.5 Contagem do leite pasteurizado (CLP)

O processamento térmico (62,8°C por 30 minutos) de amostras de leite, realizado antes dos procedimentos de contagem padrão em placas, permite a contagem de bactérias termodúricas e mesófilas, que sobrevivem ao processo de pasteurização (JONES; SUMNER, 1999; JAYARAO; WOLFGANG, 2003; BAVA et al., 2011). Este grupo de bactérias causa deterioração e reduz a vida de prateleira do leite, mesmo após os processos de pasteurização (ELMOSLEMANY et al., 2010).

A CLP está diretamente relacionada à formação de biofilmes por falhas no processo de limpeza, como: temperatura e dureza inadequadas da água de limpeza dos equipamentos e tanque; agitação insuficiente; baixa concentração ou baixa qualidade dos detergentes e desinfetantes utilizados; partes de borracha do equipamento em más condições de

conservação ou com excessiva temperatura (JONES; SUMNER, 1999; JAYARAO; WOLFGANG, 2003).

2.6 Contagem de coliformes totais (CC)

A CC é utilizada em programas de controle de qualidade como indicador de contaminação por matéria orgânica, principalmente de origem fecal, a qual ocorre a partir do exterior do úbere e tetos dos animais e equipamentos de ordenha (EDMONDSON, 2005; ELMOSLEMANY et al., 2010). Os coliformes são compostos por bacilos gram negativos, aeróbicos e anaeróbicos facultativos que fermentam a lactose e produzem gás, originados da decomposição da matéria orgânica ou de origem fecal (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). A baixa temperatura da água durante os ciclos de limpeza do equipamento de ordenha e os resíduos de leite presentes nestes equipamentos, entre as ordenhas, são fatores relacionados com a alta CC (VILLAR et al., 1996).

A determinação da CC é realizada pela inoculação da amostra em meio de cultura MacConkey, seguida por um período de incubação de 48 horas a 32°C e posterior leitura para contagem das colônias características, expressas em UFC/mL (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). Outra metodologia utilizada para a determinação da CC são as placas Petrifilm® - que possuem como vantagens: a eliminação do preparo dos meios de cultura e a redução no tempo de realização das análises, por ter menor tempo de incubação das amostras (24 h a 32 °C) (ELMOSLEMANY et al., 2010). As placas Petrifilm® para coliformes são compostas por meio vermelho violeta bile lactose e indicador cloreto tetrazólico trifênil (TTC), que dá coloração vermelho escuro à colônia.

Os coliformes totais podem, ainda, serem determinados pelo método presuntivo, metodologia do número mais provável (NMP) (WEHR; FRANK, 2004). O método NMP consiste na inoculação de diluições seriadas da amostra em caldo lauril sulfato triptose (LST) com tubo Durham invertido, em triplicata, por 24hs e 48hs a 35°C. Após a incubação, a leitura é realizada anotando-se como resultado positivo a presença de gás nos tubos Durham. Os resultados presuntivamente positivos são confirmados em Caldo Verde Bile Brillante 2 % (VBB) por 24hs a 35°C. O resultado é calculado com o auxílio de tabelas e dado em número mais provável de colônias de coliformes (WEHR; FRANK, 2004).

2.7 Contagem de células somáticas (CCS)

Após a invasão de patógenos na glândula mamária, inicia-se um processo inflamatório que tem como consequência a migração e aumento do número de leucócitos (principalmente de neutrófilos polimorfonucleares) na glândula mamária (CARNEIRO et al., 2009). Células somáticas são células do sistema imune, que migram da corrente sanguínea (linfócitos, macrófagos e neutrófilos) e de descamação da própria glândula mamária, presentes no leite. Assim, a contagem de células somáticas do tanque tem relação direta com a prevalência de infecções mamárias (mastite) em rebanhos leiteiros (BRITO et al., 1997).

Mesmo após o processo de pasteurização do leite, ocorre a ação de lipases provenientes dos neutrófilos e macrófagos sobre os triglicerídios do leite. Assim, a alta CCS altera a composição e a vida de prateleira do leite e derivados, além de reduzir o rendimento e promover perdas de gordura e caseína durante a fabricação de queijos (BARBANO et al., 2006). Após o surgimento de métodos automatizados, a CCS do leite de tanque tornou-se um critério de qualidade mundialmente utilizado por laticínios, produtores e órgãos governamentais (SANTOS; FONSECA, 2006).

A CCS do leite de tanques de expansão é um excelente indicador da saúde da glândula mamária e da qualidade do leite, especialmente em rebanhos com mastite contagiosa (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). Para a maioria dos pesquisadores, a CCS acima de 250.000 cel/mL indica elevado percentual de vacas com mastite subclínica no rebanho (JAYARAO; WOLFGANG, 2003; SCHUKKEN et al., 2003).

A microscopia direta foi padronizada por Prescott e Breed (1910) e até hoje é o método de referência utilizado para a determinação da CCS no leite (IDF, 1991; APHA, 1992). Outro método que pode ser utilizado para a CCS é a contagem eletrônica por meio da citometria de fluxo que, devido a sua praticidade, rapidez e precisão, bem como pela possibilidade de conservação da amostra em temperatura ambiente, é o mais utilizado em programas de pagamento por qualidade e pelo PNMQL (SILVEIRA et al., 2005). No Brasil, os equipamentos mais utilizados para a CCS são o Fossomatic (Foss Electric A/S. Hillerød, Denmark) e o Somacount 300[®] (BENTLEY, Instruments Inc), que determinam a CCS por citometria de fluxo.

2.8 Classificação dos principais micro-organismos causadores de mastite

A mastite bovina é definida como a inflamação da glândula mamária, causada por mais de 140 tipos diferentes de micro-organismos (Quadro 2), traumas ou substâncias químicas (PHILPOT; NICKERSON, 2002). A inflamação da glândula mamária é um processo de resposta imunológica cujos objetivos são reestabelecer as funções normais deste órgão e eliminar o agente patogênico (AITKEN et al., 2011).

A primeira linha de defesa contra a mastite é o canal do teto que possui musculoso esfíncter, que deve estar fechado entre as ordenhas e durante o período seco. Além do esfíncter, o canal do teto também tem como barreira contra a penetração de micro-organismos a produção de queratina, que preenche o canal do teto entre as ordenhas e durante o período seco. A queratina é produzida pelo epitélio estratificado que reveste o canal do teto, contém ácidos graxos (esterificados e não esterificados) e proteínas capazes de se ligar à parede dos micro-organismos invasores tornando-os susceptíveis a alterações na pressão osmótica (RAINARD; RIOLLET, 2006). Os principais meios pelos quais os micro-organismos ultrapassam os mecanismos de defesa presentes no teto são a multiplicação ao longo do canal do teto e a propulsão, que ocorre em casos de flutuação do vácuo na ponta do teto com a utilização de equipamentos de ordenha mal utilizados (ZHAO; LACASSE, 2008).

Quadro 2 - Principais espécies de bactérias isoladas do leite de tanque

Grupo de bactérias	
Staphylococci	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus caprae</i> , <i>Staphylococcus chromogenes</i> , <i>Staphylococcus cohnii</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Staphylococcus hyicus</i> , <i>Staphylococcus intermedius</i> , <i>Staphylococcus lentus</i> , <i>Staphylococcus simulans</i> , <i>Staphylococcus warneri</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>
Streptococci	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus alivarius</i> , <i>Streptococcus alactolyticus</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>Streptococcus equinus</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus saachrolyticus</i> , <i>Enterococcus avium</i> , <i>Enterococcus durans</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Enterococcus malodoratus</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Streptococcus equi</i> , <i>Streptococcus equisimilis</i> , <i>Streptococcus zooepidemicus</i> , <i>Streptococcus downei</i> , <i>Streptococcus acidominimus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Coliformes	<i>Citrobacter spp</i> , <i>Enterobacter spp</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp</i>
Bactérias gram negativas não coliformes	<i>Acinetobacter</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Serratia</i>

Fonte: Adaptado de Jayarao e Wolfgang (2003).

Quando o micro-organismo invasor ultrapassa as barreiras do teto da vaca, penetra na cisterna do úbere onde é combatido por fatores solúveis (peptídeos, proteínas, enzimas) produzidos pelo sistema imune humoral da vaca. Entre estes fatores estão a lactoferrina, complemento, lisozimas, citoquinas, e imunoglobulinas com ação bactericida e bacteriostática (AITKEN et al., 2011). Neste local, quando ocorre o reconhecimento de padrões moleculares (PAMPs), presentes nas membranas dos micro-organismos patogênicos (peptídeos glicanos, polissacarídes e monossacarídeos presentes na membrana do patógeno), por receptores para o padrão de reconhecimento (PRRs), presentes na superfície de macrófagos e neutrófilos, inicia-se o processo inflamatório. Com o reconhecimento dos

PAMPs ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, principalmente citocquinas pró-inflamatórias, que induzem uma resposta inflamatória em cascata, promovendo a migração de leucócitos (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) e aumento da permeabilidade vascular (AITKEN et al., 2011). O grau de recuperação da infecção está relacionado com a velocidade de migração dos neutrófilos para o sítio de infecção e com sua capacidade de fagocitar e eliminar a bactéria (RABOT et al., 2007).

Quando o micro-organismo não é eliminado durante o processo inflamatório, ocorre multiplicação e o epitélio mamário é danificado pela liberação de compostos celulares e extracelulares dos micro-organismos patogênicos, por enzimas lisossomais liberadas por fagócitos e produtos do estresse oxidativo e por proteases e citocquinas liberadas durante o processo inflamatório. Com a persistência da infecção, o número de células somáticas no leite aumenta e, concomitantemente, os danos no epitélio mamário tornam-se agravados. Neste estágio, os alvéolos na glândula começam a perder a integridade estrutural e a barreira sangue-leite é violada, o que provoca alterações visíveis no leite e no úbere características de mastite clínica (ZHAO; LACASSE, 2008). A mastite clínica é diagnosticada pelos sintomas de inflamação na glândula mamária (inchaço, rubor, aumento de temperatura e dor) e por alterações no leite como a coagulação (CONTRERAS; RODRIGUEZ, 2011).

A mastite subclínica é resultado da rápida migração de células de defesa para a glândula mamária, principalmente neutrófilos, sem o aparecimento dos sintomas de infecção. Estas células de defesa no leite são denominadas células somáticas, desta forma, o aumento da CCS no leite é utilizado como indicativo de mastite subclínica (CONTRERAS; RODRIGUEZ, 2011). Em vacas leiteiras estabeleceu-se um limite de células somáticas de 200.000 cels/mL para se considerar um quarto mamário infectado (SCHUKKEN et al., 2003). Considerando-se todos os casos de mastite em um rebanho leiteiro, a mastite subclínica tem representa 90 a 95% destes casos e a mastite clínica apenas 5 a 10% (SANTOS; FONSECA, 2006).

A mastite é a doença mais comum e mais onerosa do gado leiteiro, para a qual o tratamento e o controle constituem grandes desafios (BRADLEY, 2002). Por ser uma doença de causa multifatorial, a mastite pode ainda ser classificada em função da forma de transmissão no rebanho como mastite contagiosa e ambiental (HUIJPS et al., 2010). Classicamente, a mastite contagiosa é caracterizada por ser causada por micro-organismo cuja transmissão ocorre entre vacas ou quartos, enquanto que os micro-organismos ambientais são caracterizados por transmissão do ambiente para a vaca (SCHUKKEN et al., 2012). Além disso, os patógenos contagiosos são considerados micro-organismos adaptados ao hospedeiro pois

dependem da glândula mamária para a sobrevivência e multiplicação, enquanto que os ambientais são considerados invasores oportunistas da glândula mamária não adaptados a sobreviver no hospedeiro. Os micro-organismos ambientais vivem preferencialmente no habitat da vaca, em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas, e quando invadem a glândula mamária, se multiplicam, produzem a resposta imune no hospedeiro e rapidamente são eliminados, pois sobrevivem e se multiplicam tanto no ambiente quanto na glândula mamária (BRADLEY, 2002).

Dentro desta clássica definição, os principais representantes do grupo de patógenos contagiosos são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, os quais são transmitidos entre vacas ou entre quartos mamários por meio das mãos dos ordenhadores, equipamentos de ordenha ou toalhas de uso comum (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). Para controle de mastite contagiosa, um programa deve ser focado na prevenção de novas infecções intramamárias e ser constituído por práticas de manejo como o uso de desinfetante de tetos pós-ordenha, segregação e descarte de vacas infectadas, tratamento de vacas com sinais clínicos e tratamento durante o período seco (BARLOW, 2011). Os micro-organismos contagiosos estão mais associados a infecções subclínicas, embora tenham potencial de causar infecções clínicas, caracterizadas por um típico aumento na CCS do leite de tanque associado à redução na produção de leite (SCHUKEN et al., 2012).

No grupo de patógenos ambientais, os principais representantes são as bactérias do gênero *Streptococcus*, com exceção de *Streptococcus agalactiae*, e as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Klebsiella spp*) (RUEGG, 2012). A mastite ambiental está mais frequentemente associada às infecções clínicas de curta duração, que resultam em queda acentuada na produção e podem causar até a morte da vaca. As infecções intramamárias ambientais ocorrem frequentemente durante o período seco, embora ocorram também no período de lactação, e tem alta incidência em rebanhos com baixa CCS (SCHUKEN et al., 2012). Segundo Ruegg (2012), o controle da mastite ambiental é mais complexo do que o controle da mastite contagiosa, pois no último caso os micro-organismos causadores têm como reservatórios os materiais de cama das vacas, a umidade, a lama e o esterco. Desta forma, classicamente o foco dos programas de controle da mastite ambiental tem sido baseado na redução da exposição da glândula mamária aos agentes patogênicos ambientais, com as vacas sendo alojadas em ambiente mais limpo e confortável possível e utilização de práticas para redução da contaminação na glândula mamária no momento da ordenha, como o uso de desinfetantes de tetos pré-ordenha (RUEGG, 2012).

Devido o potencial de transmissão entre vacas ou entre quarto mamários infectados, a grande maioria das infecções intramamárias contagiosas é causada pela mesma cepa de patógeno infectante, em contrapartida, a maioria das infecções intramamárias ambientais é causada por diferentes cepas de bactérias, devido a transmissão ter origem em diferentes fontes de infecção no ambiente (ZADOKS; SCHUKKEN, 2006). Neste contexto, com a evolução das metodologias de diagnóstico para métodos mais precisos que tem a capacidade de fazer a identificação em nível de subespécie, como o *fingerprintings* de DNA e outras metodologias moleculares, a clássica divisão de patógenos contagiosos (*Staphylococcus aureus* e os *Streptococcus agalactiae*) ou ambientais (principalmente *Streptococcus spp.* exceto *Strep. agalactiae*) têm se demonstrado insuficiente (RUEGG, 2012; SCHUKEN et al., 2012). Um exemplo disso foi a ocorrência de um surto por *Klebsiella*, que tem características clássicas de agente ambiental, sendo causado por uma única cepa de *Klebsiella pneumoniae* isolada do leite de vacas infectadas, na teteira, nas fezes e na cama das vacas, cujas características foram avaliadas por meio da amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) – PCR (MUNOZ et al., 2007). Após a implementação de medidas de controle de mastite contagiosa e ambiental não foram observados novos casos de mastite causada por esta mesma cepa de *Klebsiella pneumoniae* nos rebanhos afetados (MUNOZ et al., 2007).

Segundo Zadoks et al. (2011), algumas cepas de bactérias dentro de uma mesma espécie tem um comportamento padrão contagioso, enquanto que outras cepas dentro desta mesma espécie podem ter o comportamento do padrão ambiental. Como consequências disso, os programas de controle da mastite não devem considerarsomente a espécie de patógeno, mas sim o comportamento de transmissão das cepas do patógeno causador da infecção intramamária. Nos rebanhos leiteiros, o comportamento de transmissão pode ser avaliado pela utilização de três fontes de informação: a) análise da CCS e dos casos de mastite clínica; b) análise dos fatores de risco da mastite na região (dados de literatura); c) identificação do perfil das infecções intramamárias pela cultura microbiológica e tipificação das cepas de algumas bactérias selecionadas no rebanho (SCHUKEN et al., 2012). Baseado no diagnóstico do tipo de transmissão do patógeno causador de mastite predominante no rebanho, programas de controle e prevenção mais específicos podem ser propostos. Estes motivos fazem com que os veterinários estejam cada vez mais engajados em estabelecer programas de controle de mastite em nível de rebanho com itens de ação específicos e uma definição clara dos responsáveis pela execução deste plano (RUEGG, 2012).

2.9 Contagem diferencial de micro-organismos causadores de mastite no leite de tanque

O início da identificação de micro-organismos causadores de mastite no leite de tanque se deu na Califórnia durante a década de 1970 (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). A cultura microbiológica do leite de tanque foi extensivamente estudada na última década (ZADOKS et al., 2004; RIEKERINK et al., 2006; RYSANEK et al., 2007) por ser uma forma economicamente mais acessível, mais conveniente e rápida no rastreamento dos principais agentes causadores de mastite e aumento da CCS em rebanhos leiteiros (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). Apesar da cultura microbiológica do leite de tanque ter seu valor no monitoramento dos agentes contagiosos de mastite, não pode ser utilizada para determinar a incidência e prevalência destes agentes no rebanho (NMC, 1999). Além disso, de acordo com os novos conceitos sobre o comportamento de transmissão dos patógenos causadores de mastite, para se estabelecer programas de controle de mastite em nível de rebanho de forma eficiente é necessária a utilização de métodos de diagnóstico mais específicos.

Atualmente, não existe uma metodologia padrão para a cultura microbiológica do leite de tanque (NMC, 2004). O intervalo de amostragem também é variável e o que se recomenda é a coleta de amostras em dias ou semanas consecutivas (NMC, 2004). Para a cultura microbiológica são utilizados meios de cultura seletivos para uma espécie bacteriana ou para um grupo de bactérias com uma mesma característica, como por exemplo, bactérias Gram positivas.

Os procedimentos para a análise microbiológica em leite de tanque incluem a inoculação de 0,1 à 0,2 mL da amostra em toda a superfície da placa. Como não existe uma metodologia padrão para a cultura microbiológica, diversos meios de cultura podem ser utilizados. Para isolamento de *Staphylococcus* spp. alguns pesquisadores (JAYARAO et al., 2004; RYSANEK et al., 2009b) utilizaram o meio de cultura Baird Parker e, para a contagem de *Staphylococcus aureus*, as colônias sugestivas desta bactéria foram contadas e algumas testadas para a produção de coagulase, produção de catalase, prova da acetoina e teste do API-STAPH para a confirmação do *Staphylococcus aureus*. Outros autores (ZADOKS et al., 2004) utilizaram o meio de cultura Vogel Johnson para a contagem de *Staphylococcus aureus*. Jarayao et al. (2004) utilizaram o Baird Parker para isolamento de *Staphylococcus* spp., seguindo com a diferenciação em *Staphylococcus* coagulase negativos por meio da contagem de colônias sugestivas desta bactéria e confirmação pelas provas da coagulase, Gram e

catalase. Outra opção para identificar *Staphylococcus aureus* é por meio de petrifilmes (3MTM PetrifilmTM STX), que contém o meio de cultura Baird Parker e um agente geleificante solúvel em água (SILVA et al., 2005; MCCARRON et al., 2009). Para facilitar a leitura das placas Petrifilm STX utiliza-se o Disco Petrifilm Staph Express[®], que contém um indicador e um ácido desoxirribonucleico (DNA) que reagem com a desoxirribonuclease (DNase) e produzem um halo rosado.

Para a identificação de *Streptococcus* spp., alguns estudos (JAYARAO et al., 2004; ZADOKS et al., 2004; RYSANEK et al., 2009a; OLIVEIRA et al., 2011) utilizaram o meio de cultura Edward's Modificado. As colônias sugestivas de *Streptococcus agalactiae* são confirmadas por outros testes como a produção de catalase, Gram, prova de CAMP, produção de esculina, teste do API 20 Strep e tipificação dos grupos de Lancerfield (aglutinação em látex).

Bactérias Gram negativas foram identificadas por (RYSANEK et al., 2009b) em ágar MacConkey e as colônias sugestivas de *Escherichia coli* confirmadas pelas provas da produção de oxidase, utilização de citrato, lactose, fermentação da dextrose e teste da motilidade. Outras metodologias que podem ser utilizadas para a identificação da *Escherichia coli* são as placas Petrifilm EC[®] (contagem de *Escherichia coli* e coliformes) e a metodologia do NMP (número mais provável). As placas Petrifilm para contagem de *E. coli*/ coliformes contêm nutrientes do meio Vermelho Violeta Bile (VRB) e um indicador de atividade glicuronidásica que reage com a beta-glicuronidase produzida pela *Escherichia coli* formando um precipitado azul. Para a metodologia do NMP, após a realização da análise de determinação de coliformes totais, os tubos com VBB positivos são replicados para tubos com caldo *E. coli* suplementado com 4 metil umbeliferil β -D glucoronideo (EC-MUG), incubados por 24hs a 44,5°C e observados sob luz ultravioleta ($\lambda=365\text{nm}$), considerando-se positivos para *E. coli* os que apresentaram fluorescência azul (APHA, 1992).

2.10 Interpretação de análises do leite de tanque

Atualmente, ainda não existem padrões amplamente aceitos para a interpretação dos resultados das análises microbiológicas do leite de tanque. Apesar disso, valores sugeridos por alguns autores podem ser utilizados como guias para auxiliar na tomada de decisões (JONES; SUMNER, 1999; JAYARAO et al., 2004; EDMONDSON, 2005).

No monitoramento do leite de tanque, valores de CBT < 5.000 UFC/mL podem ser alcançados em rebanhos bem manejados, com vacas sadias e condições adequadas de ordenha e armazenamento (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). Contudo, de forma realista, valores de CBT < 10.000 UFC/mL podem ser atingidos pela maioria dos produtores (JAYARAO et al., 2004; EDMONDSON, 2005). No Brasil, de acordo com a Rede Brasileira de Laboratórios de Qualidade do Leite (RBQL), foram analisadas 2.706.626 amostras de leite em 2012 e apenas 29% apresentaram CBT abaixo de 100.000 UFC/mL. A alta CBT ocorre quando o leite tem alta carga microbiana inicial ou resfriamento deficiente, e pode ser atribuída à ordenha de vacas com tetos sujos, alta incidência de mastite (por coliformes, estreptococos ambientais e estafilococos coagulase-negativos), falhas na limpeza de equipamentos de ordenha e deficiência no resfriamento rápido do leite.

Segundo Jayarao et al. (2004), para avaliar a CIP do leite de tanque, valores menores que 10.000 UFC/mL podem ser considerados baixos; entre 10.000 e 20.000 UFC/mL podem ser considerados médios; e, acima de 20.000 UFC/mL, altos. De forma geral, a CIP está relacionada com higiene durante a ordenha e como referência sugere-se que a CIP não ultrapasse em quatro vezes a CBT (JAYARAO et al., 2004).

Com relação à contagem do leite pasteurizado, valores até de 100 UFC/mL são considerados baixos, médios entre 100 e 200 UFC/mL e altos acima de 200 UFC/mL (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). A alta CLP está relacionada à deficiência na limpeza ou funcionamento dos equipamentos de ordenha.

A CC é resultado de uma série de medidas de higiene adotadas durante a produção de leite. No tanque de expansão, para efeito de referência a contagem é considerada baixa quando atinge valores até 50 UFC/mL, média com valores entre 50 e 100 UFC/mL e alta acima de 100 UFC/mL (JAYARAO et al., 2004). A alta CC pode ocorrer quando a higiene na ordenha é deficiente, quando há contaminação da água, ou mastite causada por coliformes.

Como critério para o monitoramento da qualidade do leite de tanque, valores de CCS < 200.000 céls/mL podem ser considerados baixos, entre 200.000 e 400.000 céls/mL médio e > 400.000 céls/mL alto (JAYARAO et al., 2004). Devido à relação que existe entre CCS e quartos mamários infectados, a CCS do leite de tanque também pode ser utilizada para estimar o número de quartos infectados no rebanho e perdas de produção de leite (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação entre CCS do tanque, porcentagem de quartos infectados e porcentagem de perdas de produção de leite

CCS do tanque (céls/mL)	% de quartos mamários infectados	% de perdas de produção de leite
200.000	6	0
500.000	16	6
1.000.000	32	18
1.500.000	48	29

Fonte: NMC (1996).

Com relação à contagem diferencial de patógenos, poucas são as orientações interpretativas sobre a origem e a inter-relação entre os diferentes grupos de bactérias encontradas no leite de tanque. Segundo (EDMONDSON, 2005) rebanhos com bom controle de mastite devem ter como objetivo contagens de *Staphylococcus aureus* menores que 10 UFC/mL. De acordo com Jayarao e Wolfgang (2003), o ideal é que o *Staphylococcus aureus* não esteja presente em três ou quatro amostras consecutivas do leite de tanque e, se estiver presente, pode representar falhas no manejo que podem resultar em a maior transmissão desta bactéria como: reutilização de papel toalha para secagem dos tetos, falhas no uso do desinfetante pré e pós-ordenha, ordenhar vacas com injúrias nas extremidades dos tetos e ordenhar vacas sem luvas. Quando se trata de bactérias ambientais (*Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Streptococcus* ambientais) no leite de tanque, alta contagem pode ser devido à contaminação durante o processo de ordenha e armazenamento do leite (NMC, 2004). Segundo (RYSANEK et al., 2009a), existe alta correlação entre a CBT e a contagem de bactérias ambientais causadoras de mastite no leite de tanque.

De fato, para a interpretação da cultura microbiológica do leite de tanque deve-se considerar as características dos micro-organismos isoladamente, para que consiga identificar a origem das fontes de contaminação. A presença de bactérias contagiosas no leite de tanque, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (patógenos obrigatórios da glândula mamária), indica que as fontes de contaminação são infecções intramamárias (NMC, 2004). Para as bactérias ambientais, o estabelecimento de padrões de interpretação torna-se ainda mais complexo, pois existem diferentes fontes de contaminação a partir do ambiente.

2.11 Atitudes e conhecimentos sobre qualidade do leite

Alguns estudos (BARKEMA et al., 1999; RYSANEK; Babak, 2005; RYSANEK et al., 2007; ELMOSLEMANY et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011) analisaram os fatores que interferem na qualidade do leite e na ocorrência de mastite de forma quantitativa. No entanto, nestes estudos não foi considerado a influência do fator humano e, por isso, só explicam parte da grande variação na qualidade do leite e da incidência de mastite entre fazendas. Dentro deste contexto, Barkema et al. (1999) avaliaram as causas pelas quais alguns produtores de leite não implementaram práticas de manejo efetivas para o controle da mastite de forma permanente, mesmo que estas práticas sejam capazes de melhorar consideravelmente seus resultados econômicos. Na produção de leite, o estilo de gestão do produtor, as crenças e as atitudes frente a diferentes formas de tratamento e prevenção da mastite são fatores determinantes tanto do sucesso do produtor na atividade quanto da qualidade do leite produzido (JANSEN et al., 2009).

A análise do impacto do fator humano é complexa e deve ser realizada de forma interdisciplinar. Nas ciências sociais, o comportamento é amplamente estudado pela análise de atitudes, conhecimentos, crenças, valores, objetivos e intenções (JANSEN et al., 2009). Atitude é um termo utilizado em ciências sociais descrito como “[...] experiências subjetivas que incluem necessariamente uma dimensão avaliativa ao fazer referência a um objeto, fato ou pessoa” (BARBARÁ et al., 2006). Alternativamente, atitudes “[...] são predisposições aprendidas e relativamente duradouras para responder favorável ou desfavoravelmente a um fenômeno” (BARBARÁ et al., 2006). Assim, a atitude pode predizer e explicar diferenças no comportamento do produtor (JANSEN et al., 2009).

Em psicologia social modelos teóricos têm sido propostos, como a Teoria do Comportamento Planejado (TCP) que focaliza a intenção comportamental que antecede imediatamente o comportamento real e, dessa forma, pode prognosticá-lo (PINTO, 2007). No modelo de TCP proposto por Ajzen (1985), decisões são tomadas, de forma eminentemente racional, por indivíduos que utilizam informações disponíveis, considerando as implicações de suas ações antes de decidirem executá-las. Neste modelo, segundo Pinto (2007) o comportamento humano é guiado por três tipos de crenças: comportamentais, normativas e de controle (Figura 1).

Figura 1 - Teoria do Comportamento Planejado

Fonte: Adaptado de Pinto (2007)

Para Jansen et al. (2010a), as crenças, atitudes e a teoria que explica o impacto do fator humano na agricultura e produção de leite, podem ser sumarizados em “mentalidade” do agricultor ou produtor de leite. Jansen et al. (2009) relataram que o conhecimento técnico e percepções (mentalidade) sobre qualidade de leite são fatores que interferem nas atitudes dos produtores que podem determinar a CCS e a incidência de mastite clínica. Neste estudo, 17% da variação na incidência da mastite clínica e 47% da variação na contagem de células somáticas do leite de tanque, foram atribuídos à mentalidade do produtor (JANSEN et al., 2009). Contudo, a análise do conhecimento e comportamento do produtor não leva em consideração fatores externos, como a remuneração e fatores institucionais (regulamentações), e por isso não explica 100% das variações em um programa de controle de mastite (JANSEN et al., 2010a).

O conhecimento dos elementos envolvidos com o comportamento humano, os quais interferem na mentalidade do produtor, tem especial importância durante a implantação de programas de controle de mastite. Nestes programas, muito esforço é colocado em desenvolver materiais de divulgação, tais como: ferramentas informativas, fichas que ilustrem os protocolos de tratamento, e práticas de gestão específicas como o uso luvas durante a ordenha. O conhecimento do comportamento e da mentalidade do produtor pode auxiliar na avaliação da eficácia desses métodos de comunicação empregados (CHASE et al., 2006). Segundo Jansen et al. (2010a), existem várias formas de interagir com os produtores mais resistentes à absorção de conhecimentos, desde que as estratégias de comunicação sejam adaptadas às necessidades específicas de cada produtor.

De forma geral, há falta de compreensão, por parte dos produtores, sobre as causas da mastite e sobre quais os protocolos de tratamento mais adequados. Além disso, a absorção de conhecimentos torna-se dificultada frente a determinadas crenças e atitudes por parte dos produtores (MCLEOD, 2008). Outro fator que dificulta a implantação de programas de controle de mastite é a percepção dos produtores de que as medidas de prevenção contra a mastite não são simples e muito menos práticas (BRADLEY, 2002).

2.12 Análises epidemiológicas

A epidemiologia é o estudo da distribuição de fatores determinantes de doenças em populações (WOODWARD, 2005). Atualmente, a utilização deste termo não está restrita somente às populações humanas e em seu conceito foi incorporada a aplicação desses estudos para controlar problemas de saúde (WOODWARD, 2005). Em epidemiologia a linha de raciocínio predominante é a lógica indutiva, na qual parte-se de um determinado número de dados e estabelece-se uma proposição mais geral (PEREIRA, 2005).

Os estudos epidemiológicos são classificados em observacionais e experimentais. Os estudos experimentais correspondem aos de intervenção que, na prática dificilmente podem ser realizados, principalmente por razões éticas, sendo considerado como modelo para derivação de outros tipos de estudo (SILVA; FORMIGLI, 1994). De forma geral, os estudos observacionais são classificados em descritivos e analíticos. Neste contexto, os estudos descritivos fornecem informações quantitativas sobre a distribuição de um evento na população (Incidência ou Prevalência) e os analíticos testam hipóteses ou estabelecem associações e inferências (estudos de causa e efeito, exposição e doença) (LIMA-COSTA; BARRETO, 2003).

Dentro dos estudos analíticos, os principais delineamentos são: a) ecológico; b) seccional (transversal); c) caso-controle (caso-referência); e d) “coorte” (prospectivo). Nos estudos ecológicos compara-se a ocorrência da doença e a exposição de interesse entre agregados de indivíduos, não existem informações sobre a doença e exposição do indivíduo, mas do grupo populacional (LIMA-COSTA; BARRETO, 2003).

Nos estudos de corte transversal os efeitos são medidos em um único ponto no tempo ou no decorrer de um curto intervalo de tempo, são independentes da exposição ou desfecho de uma situação e, em geral, são utilizados para determinar a prevalência de uma doença em

uma população especificada (LIMA-COSTA; BARRETO, 2003). Nos estudos de “coorte” indivíduos são classificados (ou selecionados) por grau de exposição (expostos e não expostos) a um possível fator de risco, sendo acompanhados para avaliação da incidência da doença em cada um dos grupos por um determinado período de tempo (OLIVEIRA; PARENTE, 2010). Nos estudos caso-controle, primeiro os indivíduos são caracterizados como casos (portadores de doença, por exemplo) ou controles (sem doença), para efeito de comparação, depois, determina-se (mediante entrevista, por exemplo) qual foi a probabilidade de presença/ausência do fator de exposição (causa) (LIMA-COSTA; BARRETO, 2003). Dentro dos estudos analíticos, quando há ausência de áreas controles para comparação externa, uma alternativa é a comparação interna por meio de um delineamento híbrido dos estudos seccional e coorte, denominado estudo de painel (CARNEIRO, 2002). Os estudos de painel são caracterizados pela realização de uma série de estudos seccionais em uma mesma população ou amostras desta população, em diferentes intervalos de tempo (CARNEIRO, 2002). Cada tipo de estudo analítico apresenta vantagens e desvantagens na sua utilização (Quadro 3) e cabe ao pesquisador analisar estes pontos para decidir qual é o delineamento que melhor se adequa à sua pesquisa.

Quadro 3 - Vantagens e desvantagens dos principais estudos analíticos

Delineamento do estudo	Vantagens	Desvantagens
Ecológico	Respostas rápidas, pode gerar hipóteses	Dificuldade para controlar confundimentos
Corte Transversal	Permite conhecer a prevalência, é de fácil execução e pode gerar hipóteses	Não permite conhecer o tempo da exposição
“Coorte”	Permite estudos múltiplos de efeitos e exposições raras, menor possibilidade de ocorrências de viés na seleção e nos dados de exposição, pode medir incidência	Possibilidade de ocorrência de viés nos efeitos, caro, exige tempo, inadequado para doenças raras, poucas exposições, perda de indivíduos no n amostral.
Caso-controle	Permite estudos múltiplos de exposição e doenças raras, requer um número amostral relativamente pequeno, logística fácil e rápida, sua execução não requer grandes investimentos financeiros	Difícil seleção de controles, possibilidades de ocorrência de viés nos dados de exposição, a incidência não pode ser medida

Adaptado de (ANN GRISSO, 1993)

Em estudos epidemiológicos as medidas mais comuns são o Risco Relativo (RR) e a razão de chances (“odds ratio”). Estas medidas foram criadas para avaliar a relação entre um fator de risco (variável que possa estar ligada ao desfecho), e o desfecho (evento de interesse na pesquisa) (WAGNER; CALLEGARI-JACQUES, 1998). O RR estima a magnitude da associação entre a exposição ao fator de risco e o desfecho, e nada mais é que sendo a razão da incidência do desfecho (doença, por exemplo) entre os expostos e os não expostos, sendo muito utilizado em experimentos de “coorte” (WAGNER; CALLEGARI-JACQUES, 1998). A razão de chances (“odds ratio”) estima a força de associação entre um fator em estudo e um desfecho, sendo utilizado em estudos tipo caso-controle (WAGNER; CALLEGARI-JACQUES, 1998).

3 PRÁTICAS DE MANEJO ASSOCIADAS À QUALIDADE DO LEITE CRU EM REBANHOS LEITEIROS

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram avaliar práticas de manejo associadas à contagem bacteriana do leite de tanque em rebanhos submetidos a programas de pagamento por qualidade do leite. Foram selecionados 120 rebanhos leiteiros, de acordo com a média geométrica da contagem bacteriana total (CBT) de dez amostras de leite de tanque coletadas em dez semanas consecutivas, para compor dois grupos de 60 rebanhos: alta CBT ($1,1 \times 10^4$ UFC/mL) e baixa CBT ($4,4 \times 10^3$ UFC/mL). Após o período de seleção, oito amostras de leite do tanque de expansão dos rebanhos selecionados foram coletadas, uma vez por semana, durante dois meses, para a realização das análises de CBT, contagem do leite com incubação preliminar (CIP), contagem do leite pasteurizado (CLP), contagem de coliformes (CC), contagem de células somáticas (CCS) e concentrações de gordura, proteína e sólidos totais. Após a realização das análises laboratoriais, 63 rebanhos foram selecionados e visitados para aplicação de questionários sobre: a) aspectos gerais de manejo da fazenda; b) manejo de ordenha; c) procedimentos de limpeza de equipamento de ordenha e utensílios; d) controle da mastite; e) condições de limpeza da vaca. Para selecionar os potenciais fatores de risco associados à alta CBT, alta CIP, alta CLP e alta CC considerou-se um valor de $P \leq 0,2$ obtido pelas análises de frequência, teste exato de Fisher e Cochran-Mantel-Haenszel, e probabilidade $\leq 0,05$ no teste T (variáveis contínuas). Os potenciais fatores de risco selecionados foram incluídos no modelo de regressão logística multivariada (PROC LOGIT – SAS). Foram identificadas associações entre a alta CBT e a ordenha com o bezerro ao pé da vaca, não uso de desinfecção pré-ordenha, não uso de desinfecção pós-ordenha e quantidade de filme orgânico na saída do tanque de expansão. A ordenha com o bezerro ao pé da vaca e o não uso de desinfecção pós-ordenha foram associadas também à alta CIP. A alta CC foi associada à ordenha com o bezerro ao pé da vaca e a quantidade de filme orgânico na saída do tanque de expansão. A prática de ordenha com o bezerro ao pé da vaca, a ausência de desinfetante de tetos pré e pós-ordenha e a quantidade de matéria orgânica na válvula de saída do leite do tanque de expansão são os principais fatores associados à baixa qualidade higiênica do leite cru em rebanhos que recebem pagamento de leite por qualidade.

Palavras-chave: Leite de tanque. Contagem bacteriana total. Contagem do leite com incubação preliminar. contagem do leite pasteurizado. Contagem de coliformes.

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate management practices associated with bacterial count in bulk tank milk of herds with milk quality payment programs. A total of 120 dairy herds were selected according to the geometric mean of total bacterial count (TBC) of ten bulk tank milk samples collected in ten consecutive weeks, to compose two groups of 60 cattle : High TBC (1.1×10^4 CFU / mL) and low TBC (4.4×10^3 CFU / mL). After the selection period, eight bulk tank milk samples were collected once a week during two months, for the analyzes of TBC, preliminary incubation count (PIC), laboratory pasteurization count (LPC), coliform count (CC), somatic cell count (SCC) and fat, protein and total solids concentrations. After laboratory analysis, 63 herds were visited for on-farm data collection by a questionnaire about: a) general aspects of farm management; b) milking management; c) milking equipment and utensils cleaning procedures; d) mastitis control; e) udder cleaning conditions. Potential risk factors associated with high TBC, high PIC, high LPC and high CC were selected considering a P value ≤ 0.2 obtained by frequency analysis (Fisher's exact test and Cochran - Mantel - Haenszel test), and a P value ≤ 0.05 by the T test (continuous variables). The potential risk factors selected were included in a multivariate logistic regression model (PROC LOGIT - SAS). The presence of suckling calves before milking, not using pre and post teat dipping and high amount of organic matter in the bulk tank outlet valve were associated with high TBC. The presence of suckling calves before milking and not using post teat dipping were also associated with high CIP. High CC was associated with the presence of suckling calves before milking high amount of organic matter in the bulk tank outlet valve. The presence of suckling calves before milking, the absence of d pre and post teat dipping and high of organic matter in the bulk tank outlet valve were the main factors associated with poor raw milk hygienic quality in herds with milk quality payment programs.

Keywords: Total bacterial count. Preliminary incubation count. Laboratory pasteurization Coliform count.

3.1 Introdução

A baixa qualidade higiênica do leite cru é uma das principais limitações para o processamento, rendimento e aceitabilidade de derivados lácteos, representando grande impacto econômico negativo na cadeia produtiva do leite. A produção de leite de alta qualidade higiênica depende dos procedimentos utilizados na fazenda, tais como: limpeza e saúde do úbere e higiene dos equipamentos de ordenha e do alojamento das vacas (ELMOSLEMANY et al., 2009c). Com os objetivos de aumentar a aceitabilidade de seus produtos e a eficiência econômica, algumas indústrias iniciaram programas de valorização da qualidade do leite ao produtor rural, utilizando como principais critérios a contagem bacteriana total e a contagem de células somáticas (ROMA JÚNIOR et al., 2009). Atualmente, os programas de pagamento por qualidade são considerados importantes ferramentas de melhoria da qualidade do leite (ROMA JÚNIOR et al., 2009).

No Brasil, a atual legislação sobre qualidade do leite (IN 62/2011 - BRASIL, 2011) definiu como limite máximo de contagem bacteriana 600.000 UFC/mL para o período entre 01/01/2012 e 30/06/2014 nas regiões Centro-Oeste/Sudeste/Sul e a partir de 01/01/2013 até 30/06/2015 nas regiões Norte/Nordeste; e 300.000 UFC/mL a partir de 01/07/2014 nas regiões Centro-Oeste/ Sudeste/Sul e 01/07/2015 nas regiões Norte/Nordeste.

A alta CBT do leite ocorre principalmente por contaminação via superfície externa dos tetos e úberes, superfície dos equipamentos de ordenha e contaminação por micro-organismos causadores de mastite (ELMOSLEMANY et al., 2010). A análise periódica do leite de tanque tem sido utilizada há mais de três décadas para monitorar a qualidade do leite e o estado sanitário da glândula mamária, bem como para identificar possíveis fontes de contaminação (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). Dentre as análises microbiológicas utilizadas no leite de tanque destacam-se: a contagem bacteriana total (CBT) - que estima o número total de colônias de bactérias aeróbias presentes no leite; a contagem com incubação preliminar (CIP) - utilizada para estimar a contagem de bactérias psicrotróficas; a contagem do leite pasteurizado (CLP) - que quantifica a contagem de bactérias termodúricas; e a contagem de coliformes (CC) - indicador de contaminação fecal (BAVA et al., 2011).

Estudos anteriores realizados por Elmoslemany et al. (2009b, 2010); Kelly et al. (2009); Nero et al. (2009); Bava et al. (2011) e Oliveira et al. (2011) avaliaram a relação entre as práticas de manejo e a qualidade do leite de tanque. Kelly et al. (2009) relataram que práticas de manejo como a utilização de água quente na sala de ordenha, o corte de pelos da cauda ao

menos uma vez por ano e a limpeza frequente da sala de ordenha foram altamente associadas com a baixa contagem bacteriana, em rebanhos irlandeses mantidos a pasto. Elmoslemany et al (2009b) avaliaram os fatores de risco associados à alta CBT, CIP, CLP, e CC, na Ilha de Príncipe Edward, Canadá. Elmoslemany et al. (2009b) identificaram a inadequada limpeza da extremidade dos tetos e a alta concentração da solução de detergente alcalino (>500 ppm), utilizada para limpeza dos equipamentos, como fatores de risco para a alta contagem bacteriana. A identificação de fatores de riscos específicos para a alta CBT, CIP, CLP e CC foi realizada por Elmoslemany et al. (2009c), na qual a alta CBT e CIP foram associados à limpeza dos tetos e à ausência de desinfetante pré-ordenha. A alta CLP e CC foram associadas à baixa temperatura da água de limpeza dos equipamentos de ordenha, com a dureza da água, e com a alta concentração da solução detergente alcalino.

No Brasil, Nero et al. (2009) avaliaram a relação entre procedimentos de ordenha e a qualidade higiênica do leite e relataram que a refrigeração do leite até 7° C foi o principal procedimento para manter baixa a CBT, em estudo conduzido na região de Viçosa (Minas Gerais). Oliveira et al. (2011) identificaram a ausência de desinfetante pré e pós-ordenha como potenciais fatores de risco para a alta contaminação do leite de tanque por bactérias mesófilas e *Staphylococcus aureus*, ao avaliarem rebanhos no estado da Paraíba. Embora estudos anteriores de Nero et al. (2009) e Oliveira et al. (2011) tenham avaliado práticas de manejo como fatores de risco para a qualidade do leite cru no Brasil, são escassos os estudos sobre práticas de manejo associadas com a qualidade do leite cru em rebanhos submetidos a programas de pagamento do leite por qualidade.

Os objetivos do presente estudo foram identificar e analisar práticas de manejo associadas à contagem bacteriana do leite de tanque em rebanhos submetidos a programas de pagamento por qualidade do leite.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Seleção dos rebanhos leiteiros e coleta de amostras

De um total de 498 rebanhos leiteiros, fornecedores de leite de um laticínio localizado na região Sul de Minas Gerais, foram selecionados 120 rebanhos localizados na região Sul de

Minas Gerais e Oeste de São Paulo. O laticínio realizava um programa de pagamento por qualidade desde 2008, baseado nos seguintes quesitos: CBT, CCS e teor de proteína. Para bonificar ou penalizar o produtor pela CBT e CCS, o laticínio considerava a média geométrica de cinco coletas do leite de tanque realizadas durante um mês. A política de pagamento consistiu em prêmio ou penalização adicionais ao preço base do leite pago ao produtor (Tabela 2).

Tabela 2 – Prêmio ou penalização recebida (R\$/kg de leite entregue) de acordo com a contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS)

Remuneração (R\$/kg)	CBT (UFC/mL)	CCS (cél/mL)
0,030	1 - 50.000	-
0,020	50.001 - 100.000	1 - 200.000
0,010	100.001 - 200.000	200.001 - 400.000
0,000	200.001 - 500.000	400.001 - 600.000
-0,010	500.001 - 750.000	600.001 - 750.000
-0,020	750.001 - 1.000.000	> 750.000
-0,030	>1.000.000	-

A seleção dos rebanhos foi realizada com base na média geométrica da CBT de 10 amostras coletadas em dois meses consecutivos (aproximadamente a cada 6 dias) para compor dois grupos de 60 rebanhos: alta CBT ($1,11 \times 10^4$ UFC/mL) e baixa CBT ($4,4 \times 10^3$ UFC/mL). Após o período de seleção dos rebanhos, foram coletadas amostras de leite durante dois meses (agosto e setembro de 2011), uma vez por semana, totalizando 8 coletas por rebanho selecionado. As amostras de leite foram coletadas pelos transportadores de leite do laticínio colaborador, devidamente treinados pelo programa de qualidade de leite do laticínio, diretamente do tanque de expansão, após 5 a 10 minutos de agitação, em frasco estéril sem conservante, para as análises microbiológicas (CBT, CIP, CLP e CC), conforme procedimentos descritos pelo National Mastitis Council (NMC, 1999). Para as análises de CCS e composição as amostras foram coletadas em frascos plásticos contendo 8 mg do conservante bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol). Após a coleta, todas as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas à 4°C. As amostras sem conservante foram posteriormente congeladas à -20°C para análises de CBT, CIP, CLP e CC no Laboratório Qualileite FMVZ/USP, em um período máximo de seis dias (a partir da data de coleta na

propriedade). As amostras com conservante foram conservadas à 4°C para análises de CCS e composição em um período máximo de cinco dias após a coleta.

3.2.2 Análises microbiológicas do leite

Para a etapa de seleção dos rebanhos leiteiros, a determinação da CBT foi realizada pela metodologia de citometria de fluxo utilizando-se o equipamento Bactoscan FC (Foss Electric A/S, Hillerød, Denmark). Para a determinação da CBT, CIP e CLP, das oito coletas realizadas após a seleção dos 120 rebanhos, as amostras de leite foram descongeladas, mantidas à 4°C, agitadas vigorosamente em vortex por 15 segundos, diluídas na proporção de 1:10 em água peptonada tamponada 1% (Peptone Water Buffered Merck, Darmstadt, Germany), agitadas novamente em vortex por 15 segundos e semeadas (50 µl do leite diluído) em ágar para contagem padrão em placas (Plate-count-ágar Merck, Darmstadt, Germany), utilizando-se o sistema de plaqueamento automático de bactérias (EasySpiral Pro, Interscience, França).

Para a determinação da CBT, as amostras previamente diluídas foram inoculadas e incubadas em estufa bacteriológica (Quimis®, Diadema, São Paulo, Brasil) por 48 horas, a 32°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Para as análises de CIP, antecedendo a inoculação, as amostras de leite foram previamente incubadas por 18 horas a 12,8°C, para posterior diluição, inoculação e incubação por 48 horas, a 32°C (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). Para a análise de CLP, as amostras de leite foram submetidas à pasteurização laboratorial por 30 minutos, a 62,8°C, para posterior diluição, inoculação e incubação por 48 horas, a 32°C (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). A leitura das placas foi realizada em contador de colônias automático (SCAN 500-ID, Interscience, França).

A contagem de coliformes foi determinada por meio de semeadura em placas tipo Petrifilm (3M™ Petrifilm™ EC Count Coliform), após diluição na proporção de 1:10 em água peptonada tamponada 1% (Peptone Water Buffered, Merck), conforme metodologia descrita por Elmoslemny et al. (2009b). As amostras inoculadas em Petrifilm foram incubadas por 24 horas (± 2 horas) a 32°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), e a leitura foi realizada com auxílio de contador de colônias manual.

3.2.3 Determinação da composição e contagem de células somáticas do leite

Para a determinação da composição do leite (gordura, proteína e sólidos totais) e da CCS, as amostras de leite foram coletadas em frascos contendo conservante bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol) e enviadas ao Laboratório de Fisiologia da Lactação da ESALQ – USP (Clínica do Leite) para realização das análises, em um período máximo de cinco dias após a coleta.

As concentrações de gordura, sólidos totais e proteína foram analisadas por absorção infravermelha, utilizando-se o equipamento MilkoScan FT+ (FOSS North America, Eden Praire, MN, USA). A contagem eletrônica de células somáticas das amostras de leite foi realizada por citometria de fluxo com equipamento Fossomatic FC (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark).

3.2.4 Coleta de dados nas fazendas leiteiras

Em razão de alguns rebanhos selecionados descontinuarem o fornecimento de leite para o laticínio vinculado ao estudo, dos 120 rebanhos selecionados somente 63 foram visitados para aplicação dos questionários e avaliação dos fatores de risco associados à qualidade do leite, após a realização dos procedimentos laboratoriais. A aplicação do questionário e as aferições necessárias para determinação da qualidade da água e limpeza dos equipamentos foram realizadas pela mesma pesquisadora, em todas as propriedades.

O questionário foi composto por 26 perguntas previamente formuladas com base nos estudos de Jayarao e Wolfgang (2003); Souza et al. (2005); Elmoslemany et al. (2009b,c); Kelly et al. (2009) e Oliveira et al. (2011) e adaptadas para a região em estudo. O questionário foi aplicado aos responsáveis pelo manejo do rebanho e composto de perguntas sobre as seguintes variáveis: a) aspectos gerais de manejo da fazenda (Apêndice A); b) manejo de ordenha (Apêndice B); c) procedimentos de limpeza de equipamento de ordenha e utensílios (Apêndice C); d) condições de limpeza do úbere das vacas (Apêndice D). Para avaliar a adequação dos procedimentos de limpeza, foi analisada a presença de filmes orgânicos em 4 diferentes pontos do equipamento de ordenha (teteira, unidade final ou balde ao pé, copo

coletor da teteira e na saída do tanque de expansão) pela metodologia de bioluminescência de ATP (3M™ Clean-Trace™ Surface ATP).

3.2.5 Determinação da dureza e pH da água

Para a determinação da dureza da água foi coletado uma amostra (50 mL) da água utilizada para lavagem dos equipamentos de ordenha. Foi utilizado o método titulométrico de complexação do EDTA do (kit Qualidade DeLaval, Campinas, Brasil). A água de limpeza dos equipamentos foi considerada inadequada quando apresentou concentração de $\text{CaCO}_3 > 180$ ppm. A avaliação do pH da água foi realizada com auxílio de pHmetro digital.

3.2.6 Estimativa do escore de condição de limpeza do úbere

Para estimar a condição de limpeza do úbere das vacas, foram selecionadas aleatoriamente dentro de cada rebanho 10 vacas em lactação para avaliação visual, seguindo o modelo de escore proposto por Schreiner e Ruegg (2002): 1) totalmente limpo; 2) levemente sujo: 2 a 10% da área do úbere com sujidades; 3) moderadamente sujo: 10 a 30% da área do úbere com sujidades; 4) muito sujo: mais de 30% da área do úbere com sujidades. Nesta avaliação foi utilizado um modelo impresso como padrão de classificação (Apêndice D) onde os graus 3 e 4 representam maior risco de ocorrência de mastite.

3.2.7 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados no programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2010), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo Teste F. Os resultados da quantidade de ATP presente no equipamento de ordenha (teteira, unidade final ou balde ao pé, copo coletor da teteira e na saída do tanque de expansão) foram convertidos

para escala logarítmica. Para avaliar o escore de limpeza do úbere utilizou-se o escore predominante na propriedade.

Para as análises estatísticas dos dados coletados nas fazendas, foram formados dois grupos em relação à CBT, CIP, CLP e CC das 63 fazendas visitadas (oito análises realizadas durante os meses de agosto e setembro): grupo com alta CBT (n=28), rebanhos com mais de quatro análises com valores de CBT > 10.000 UFC/mL, e grupo baixa CBT (n=35), rebanhos com quatro análises ou menos com valores CBT < 10.000 UFC/mL (JAYARAO; WOLFGANG, 2003); grupo com alta CIP (n=38), rebanhos com mais de quatro análises com valores de CIP > 50.000 UFC/mL, e grupo baixa CIP (n=25), rebanhos com quatro análises ou menos com valores CIP < 50.000 UFC/mL (JAYARAO; WOLFGANG, 2003); grupo com alta CLP (n=32), rebanhos com quatro análises ou mais com valores de CLP > 200 UFC/mL, e grupo baixa CLP (n=31), rebanhos com menos de quatro análises valores CLP < 200 UFC/mL (JAYARAO; WOLFGANG, 2003); grupo com alta CC (n=26), rebanhos com mais de quatro análises com CC > 50 UFC/mL, e baixa CC (n=37), rebanhos com valores de CC < 50 UFC/mL (JAYARAO; WOLFGANG, 2003) em quatro análises ou menos.

Após a organização dos grupos experimentais, foi realizada uma análise descritiva dos dados dos 63 rebanhos (PROC MEANS - SAS). Para análise estatística entre as frequências das respostas obtidas (variáveis categóricas), foi utilizado o teste exato de Fisher, para respostas binomiais, e o teste de Cochran-Mantel-Haenszel, para respostas trinomiais, considerando-se valores de significância $P \leq 0,05$ e de tendência $P \leq 0,10$. A análise da composição do leite, da quantidade de ATP presente no equipamento de ordenha e da qualidade da água (dureza e pH) foram realizadas utilizando-se o teste T (significância $P \leq 0,05$ e de tendência $P \leq 0,10$). Para selecionar os potenciais fatores de risco associados à alta CBT, alta CIP, alta CLP e alta CC considerou-se um valor de $P \leq 0,2$ (OLIVEIRA et al., 2011) obtido pelo teste exato de Fisher (variáveis binomiais), Cochran-Mantel-Haenszel (variáveis trinomiais) e $P \leq 0,05$ no teste T (variáveis contínuas). Os potenciais fatores de risco selecionados foram incluídos no modelo de regressão logística multivariada (PROC LOGIT – SAS), com intervalo de confiança de 95%, conforme descrito a seguir:

$$\text{Equação 1: } CCBT_i = 1 + \exp(-\beta_0 - \beta_1 \text{ luvas} - \beta_2 \text{ bezerro} - \beta_3 \text{ pré-dipping} - \beta_4 \text{ pós-dipping} - \beta_5 \text{ ácido} - \beta_6 \text{ teteira} - \beta_7 \text{ tanque})$$

Sendo CCBT a probabilidade do rebanho i apresentar alta contagem bacteriana total e o β as variáveis qualitativas avaliadas.

Equação 2: $CCIP_i = 1 + \exp(-\beta_0 - \beta_1 \text{ bezerro} - \beta_2 \text{ pré-dipping} - \beta_3 \text{ pós-dipping} - \beta_4 \text{ ordenha} - \beta_5 \text{ escore} - \beta_6 \text{ teteira} - \beta_7 \text{ tanque} - \beta_8 \text{ copo})$

Sendo CCIP a probabilidade do rebanho i apresentar alta contagem bacteriana do leite com incubação preliminar e o β as variáveis qualitativas avaliadas.

Equação 3: $CCLP_i = 1 + \exp(-\beta_0 - \beta_1 \text{ água})$

Sendo CCLP a probabilidade do rebanho i apresentar alta contagem bacteriana do leite com incubação preliminar e o β as variáveis qualitativas avaliadas.

Equação 4: $CCC_i = 1 + \exp(-\beta_0 - \beta_1 \text{ bezerro} - \beta_2 \text{ pré-dipping} - \beta_3 \text{ pós-dipping} - \beta_4 \text{ n}^\circ \text{ ordenhas} - \beta_5 \text{ teteira} - \beta_6 \text{ tanque})$

Sendo CCC a probabilidade do rebanho i apresentar alta contagem de coliformes e o β as variáveis qualitativas avaliadas.

Em que:

luvas = uso de luvas pelos ordenhadores;

bezerro = presença do bezerro ao pé da vaca na ordenha;

pré-dipping = uso de desinfecção de tetos pré-ordenha;

pós-dipping = uso de desinfecção de tetos pós-ordenha;

ácido = frequência do uso de detergente ácido;

ordenha = tipo de ordenha;

escore = escore de limpeza do úbere;

teteira = filme orgânico na teteira;

tanque = filme orgânico na saída do tanque de expansão;

copo = filme orgânico no copo coletor;

água = origem da água;

nº ordenhas = número de ordenhas por dia;

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterização dos rebanhos leiteiros quanto à microbiologia e composição do leite

As médias dos indicadores de qualidade do leite (CBT, CIP, CLP e CC) avaliados durante os dois meses de coleta (agosto e setembro de 2011) estão apresentadas na Tabela 3. A composição do leite foi semelhante ($P \geq 0,05$) entre os rebanhos de alta e baixa CBT, CIP, CLP e CC, com teores médios no leite de 3,7% para gordura, de 3,3% para proteína e de 12,5% para sólidos totais.

Tabela 3 – Contagem bacteriana total (CBT), contagem do leite com incubação preliminar (CIP), contagem do leite pasteurizado (CLP), contagem de coliformes totais (CC), e contagem de células somáticas (CCS) dos rebanhos com alta (n=28) e baixa (n=35) CBT, alta (n=38) e baixa (n=25) CIP, alta (n=32) e baixa (n=31) CLP e alta ((n=26) e baixa (n=37) CC (média aritmética).

Contagem	CBT		EPM ²
	Alta (125927,8 UFC/mL)	Baixa (41730,5 UFC/mL)	
CIP (UFC/mL ¹)	513845,5	158642,3	23753,4
CLP (UFC/mL)	3195,1	27218,2	8150,5
CC (UFC/mL)	1511,2	93,1	297,3

Contagem	CIP		EPM
	Alta (457560,3 UFC/mL)	Baixa (73373,6 UFC/mL)	
CBT (UFC/mL)	107507,9	23237,8	10951,4
CLP (UFC/mL)	23415,3	2993,9	7728,6
CC (UFC/mL)	1132,1	59,8	295,9

Contagem	CLP		EPM
	Alta (8204,1 UFC/mL)	Baixa (4525,3 UFC/mL)	
CBT (UFC/mL)	78333,7	64592,4	10119,2
CIP (UFC/mL)	326246,2	257652,2	23713,6
CC (UFC/mL)	249,5	1118,2	291,2

Contagem	CC		EPM
	Alta (1132,3 UFC/mL)	Baixa (93,4 UFC/mL)	
CBT (UFC/mL)	137500,1	36838,3	11066,3
CIP (UFC/mL)	599361,0	142830,7	24593,4
CLP (UFC/mL)	18304,3	15896,6	8090,0

¹Unidades formadoras de colônias; ²Erro padrão da média.

3.3.2 Caracterização dos rebanhos quanto às práticas de manejo utilizadas

Dos 63 rebanhos selecionados para o presente estudo, 90,5% utilizaram sistema de produção semi-extensivo (semi-confinamento, regime de pasto associado à estabulação parcial) e 95,2% utilizaram ordenha mecanizada. Como características gerais, os rebanhos com alta CBT apresentaram produção de leite média de 702 L/dia e média de 49 vacas em lactação, enquanto os rebanhos com baixa CBT produziram em média 1776 L/dia e possuíam em média 82 vacas em lactação.

Nas tabelas 4 e 5 estão descritas as características de manejo e procedimentos de higiene. Na tabela 6 estão as características da água e a efetividade dos procedimentos de limpeza, avaliados pela presença de filmes orgânicos na teteira, válvula de saída do tanque de expansão e copo coletor. Com relação às características de manejo e qualidade de limpeza dos equipamentos, o número de rebanhos que utilizavam o bezerro ao pé da vaca no momento da ordenha, como estímulo para descida do leite, foi maior no grupo com alta CBT (42,9%) do que no grupo com baixa CBT (11,8%). O uso de desinfecção de tetos pré-ordenha entre os rebanhos com baixa CBT foi 21,4% maior do que nos rebanhos com alta CBT, o mesmo ocorreu com o uso de desinfecção de tetos pós-ordenha, 35% maior no grupo com baixa CBT em relação ao grupo alta CBT. A média geométrica da quantidade de material orgânico, medida em unidades relativas de luz, na válvula de saída do tanque de expansão do grupo de rebanhos com alta CBT (4767,0 URL, DP = 216640,3) foi 6,9 vezes maior do que a do grupo de rebanhos com baixa CBT (691,4 URL, DP = 6183,4). Foram observadas tendências ($P \leq 0,10$) para o maior uso de luvas, maior tempo de ação do desinfetante de tetos pré-ordenha (pelo menos 30 segundos) e maior uso do iodo como desinfetante de tetos pós-ordenha para o grupo de rebanhos com baixa CBT, quando comparado com o grupo de rebanhos com alta CBT. Não foi observado efeito ou tendência ($P > 0,10$) da CBT sobre as frequências das demais variáveis analisadas. Devido às diferenças estruturais nos equipamentos de ordenha, alguns equipamentos não possuíam sistema de abertura para limpeza manual na unidade final, não foi possível aferir a quantidade de filme orgânico presente neste local em todos os rebanhos, motivos pelos quais esta variável foi excluída de todas as análises.

Para as análises de CIP, a utilização do bezerro ao pé da vaca no momento da ordenha foi maior no grupo de alta CIP (36,8%) do que no grupo de baixa CIP (8,3%). A utilização de desinfecção de tetos pós-ordenha foi 28,8% maior no grupo com baixa CIP (92,0%), quando comparado ao grupo de alta CIP (63,2%). Foi observada tendência ($P \leq 0,10$) de maior uso de

desinfetante de tetos pré-ordenha e maior uso de ordenha mecânica canalizada para rebanhos com baixa CIP quando comparado com o grupo com alta CIP. Os rebanhos com alta CIP apresentaram tendência de maior quantidade de filme orgânico na teteira ($P = 0,051$), na válvula de saída do tanque de expansão ($P = 0,091$) e no copo coletor ($P = 0,096$). Não foi observado tendência ou efeito da CIP sobre a frequência das demais variáveis avaliadas.

Não houve efeito da CLP sobre a frequência das variáveis analisadas, no entanto, houve tendência ($P = 0,091$) de maior tempo de ação de desinfetante de tetos pré-ordenha (mais de 30 segundos) para o grupo de rebanhos com baixa CLP. Houve diferença entre os grupos com alta e baixa CC, com relação à presença do bezerro ao pé da vaca no momento da ordenha ($P = 0,019$) e à quantidade de filme orgânico presente na válvula de saída do tanque de expansão ($P = 0,003$). O número de rebanhos (11) que utilizavam o bezerro ao pé da vaca no momento da ordenha foi maior em rebanhos alta CC do que nos baixa CC (5). A quantidade de filme orgânico na saída do tanque de expansão foi 5,3 vezes maior no grupo alta CC (4159,3 URL, DP = 216788,7) do que no grupo baixa CC (773,4 URL, DP = 7696,9). Houve uma tendência de maior uso de desinfetante de tetos pré e pós-ordenha para o grupo com baixa CC, tendência de maior frequência de rebanhos com duas ordenhas, quando comparados com uma ou três ordenhas e tendência de maior quantidade de filme orgânico na teteira para o grupo de rebanhos com alta CC. Não houve efeito da CC sobre a frequência das demais variáveis analisadas.

Tabela 4 - Frequências das variáveis qualitativas relacionadas aos procedimentos de manejo e higiene (respostas binomiais) utilizados nos rebanhos com alta ($1,2 \times 10^5$ UFC/mL) e baixa ($4,2 \times 10^4$ UFC/mL) contagem bacteriana total (CBT), alta ($4,5 \times 10^5$ UFC/mL) e baixa ($7,3 \times 10^4$ UFC/mL) contagem do leite com incubação preliminar (CIP), alta ($8,2 \times 10^3$ UFC/mL) e baixa ($4,5 \times 10^3$ UFC/mL) contagem do leite pasteurizado (CLP), alta ($1,1 \times 10^3$ UFC/mL) e baixa ($9,3 \times 10^1$ UFC/mL) contagem de coliformes (CC)

Variáveis	Contagem bacteriana do leite de tanque											
	CBT			CIP			CLP			CC		
	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	P^1	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	P^1	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	P^1	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	P^1
Higienização equipamentos pré- ordenha ²	22 (78,6)	27 (84,4)	0,740	28 (77,8)	3 (87,5)	0,499	27 (87,1)	22 (75,7)	0,327	21 (80,8)	28 (82,3)	----
Uso de luvas pelos ordenadores	4 (14,3)	12 (34,3)	0,087	9 (23,7)	7 (28,0)	0,771	8 (25,0)	8 (25,8)	----	5 (19,2)	11 (29,7)	0,393
Presença de bezerro ao pé da vaca durante a ordenha ³	12 (42,9)	4 (11,8)	0,008	14 (36,8)	2 (8,3)	0,017	10 (31,3)	6 (20,0)	0,389	11 (42,3)	5 (14,3)	0,019
Lava os tetos do animal	11 (39,3)	9 (25,7)	0,286	13 (34,2)	7 (28,0)	0,783	8 (25,0)	12 (38,7)	0,287	9 (34,6)	11 (29,7)	0,785
Retirada de pelos do úbere	0 (0,0)	2 (5,7)	0,498	0 (0,0)	2 (8,0)	0,154	1 (3,1)	1 (3,2)	----	0 (0,0)	2 (5,4)	0,507
Retira os primeiros jatos de leite	27 (96,4)	33 (97,1)	-----	37 (97,4)	23 (95,8)	----	31 (96,9)	29 (96,7)	----	26 (100,0)	35 (94,6)	0,507
Teste de caneca de fundo preto	23 (82,1)	27 (77,1)	0,758	30 (79,0)	20 (80,0)	----	26 (81,2)	24 (77,4)	0,763	20 (76,9)	30 (81,1)	0,757

Variáveis	Contagem bacteriana do leite de tanque											
	CBT			CIP			CLP			CC		
	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	<i>P</i> ¹	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	<i>P</i> ¹	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	<i>P</i> ¹	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	<i>P</i> ¹
Desinfecção dos tetos pré-ordenha	22 (78,6)	35 (100,0)	0,005	32 (84,2)	25 (100,0)	0,073	30 (93,7)	27 (87,1)	0,426	21 (80,8)	36 (97,3)	0,073
Uso de papel toalha descartável	26 (92,9)	32 (91,4)	-----	35 (92,1)	23 (92,0)	----	30 (93,7)	28 (90,3)	0,317	23 (88,5)	35 (94,6)	0,641
Desinfecção dos tetos pós-ordenha	15 (53,6)	31 (88,6)	0,003	24 (63,2)	23 (92,0)	0,016	23 (71,9)	24 (77,4)	0,773	16 (61,5)	31 (83,8)	0,076
Refrigeração do leite imediatamente após- ordenha	27 (96,4)	35 (100,0)	0,444	37 (97,4)	25 (100,0)	----	32 (100,0)	30 (96,8)	0,492	26 (100,0)	36 (97,3)	----
Enxágue entre lavagens com detergente alcalino e ácido ⁴	9 (39,1)	13 (40,6)	----	13 (39,4)	9 (40,9)	----	11 (39,3)	11 (40,7)	----	10 (41,7)	12 (38,7)	----

¹Probabilidade calculada pelo teste exato de Fisher; ² rebanhos com pré higienização em apenas uma ordenha foram excluídos da análise ; ³um rebanho com com a utilização bezerro ao pé da vaca durante a ordenha em 50% das vacas foi excluído da análise; ⁴ rebanhos que não utilizam detergente ácido foram excluídos da análise.

Tabela 5 - Frequências das variáveis qualitativas relacionadas aos procedimentos de higienização (respostas binomiais e trinomiais) utilizados nos rebanhos com alta ($1,2 \times 10^5$ UFC/mL) e baixa ($4,2 \times 10^4$ UFC/mL) contagem bacteriana total (CBT), alta ($4,5 \times 10^5$ UFC/mL) e baixa ($7,3 \times 10^4$ UFC/mL) contagem do leite com incubação preliminar (CIP), alta ($8,2 \times 10^3$ UFC/mL) e baixa ($4,5 \times 10^3$ UFC/mL) contagem do leite pasteurizado (CLP), alta ($1,1 \times 10^3$ UFC/mL) e baixa ($9,3 \times 10^1$ UFC/mL) contagem de coliformes (CC)

Variável	Categorias	Contagem bacteriana do leite de tanque											
		CBT			CIP			CLP			CC		
		Alta, n(%)	Baixa, n(%)	P^I	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	P^I	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	P^I	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	P^I
Sistema de produção	Confinamento	1 (3,6)	5 (14,3)	0,213	3 (7,9)	3 (12,0)	0,674	3 (9,4)	3 (9,7)	----	1 (3,8)	5 (13,5)	0,386
	semi-confinamento	27 (96,4)	30 (85,7)		35 (92,1)	22 (88,0)		29 (90,6)	28 (90,3)		26 (96,2)	32 (86,5)	
Tempo de ação do desinfetante pré-ordenha ²	Menos de 30 segundos	11 (50,0)	9 (27,3)	0,098	14 (43,7)	6 (26,1)	0,257	14 (48,3)	6 (23,1)	0,091	11 (52,4)	9 (26,5)	0,083
	Mais de 30 segundos	11 (50,0)	24 (72,7)		18 (56,2)	17 (73,9)		15 (51,7)	20 (76,9)		10 (47,6)	25 (73,5)	
Tipo de ordenha	Ordenha manual	2 (7,1)	1 (2,9)	0,705	2 (5,3)	1 (4,0)	0,079	1 (3,1)	2 (6,4)	0,362	1 (3,85)	2 (5,4)	0,549
	Ordenha balde ao pé	9 (32,1)	8 (22,9)		14 (36,8)	3 (12,0)		10 (31,3)	7 (22,6)		8 (30,8)	9 (24,3)	
	Ordenha canalizada	17 (60,7)	26 (74,3)		22 (57,9)	21 (84,0)		21 (65,6)	22 (71,0)		17 (65,4)	26 (70,3)	
Nº de ordenhas	Uma ordenha por dia	1 (3,6)	2 (5,7)	0,256	2 (5,3)	1 (4,0)	0,359	1 (3,1)	2 (6,4)	0,538	2 (7,7)	1 (2,7)	0,087
	Duas ordenhas por dia	26 (92,9)	27 (77,1)		33 (86,8)	20 (80,0)		27 (84,4)	26 (83,9)		23 (88,5)	30 (81,1)	
	Três ordenhas por dia	1 (3,6)	6 (17,1)		3 (7,9)	4 (16,0)		4 (12,5)	3 (9,7)		1 (3,8)	6 (16,2)	

Variável	Categoria	Contagem bacteriana do leite de tanque											
		CBT			CIP			CLP			CC		
		Alta, n(%)	Baixa, n(%)	P ¹	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	P ¹	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	P ¹	Alta, n(%)	Baixa, n(%)	P ¹
Escore predominante de limpeza do úbere	1	4 (18,2)	11 (39,3)	0,377	6 (20,7)	9 (42,9)	0,191	8 (28,6)	7 (31,8)	0,973	5 (25,0)	10 (33,3)	0,730
	2	15 (68,2)	12 (42,9)		18 (62,1)	9 (42,9)		16 (57,1)	11 (50,0)		12 (60,0)	15 (50,0)	
	3	3 (13,6)	5 (17,9)		5 (17,2)	3 (14,3)		4 (14,3)	4 (18,2)		3 (15,0)	5 (16,7)	
Tipo de desinfetante de tetos pré-ordenha ³	Cloro	9 (40,9)	14 (40,0)	0,894	13 (41,9)	10 (40,0)	0,943	13 (43,3)	10 (37,0)	0,911	7 (33,3)	16 (44,4)	0,877
	Iodo	9 (40,9)	14 (40,0)		12 (38,7)	11 (44,0)		10 (33,3)	13 (48,2)		11 (52,4)	12 (33,3)	
	Outro	4 (18,2)	18 (20,0)		6 (19,3)	4 (16,0)		7 (23,3)	4 (14,8)		3 (14,3)	8 (22,2)	
Tipo de desinfetante de tetos pós-ordenha ⁴	Cloro	1 (6,7)	0 (0,0)	0,058	1 (4,0)	0 (0,0)	0,149	1 (4,5)	0 (0,0)	0,551	0 (0,0)	1 (3,2)	0,102
	Iodo	14 (93,3)	28 (87,5)		23 (92,0)	19 (86,4)		21 (95,5)	21 (84,0)		16 (100,0)	26 (83,9)	
	Outro	0 (0,0)	4 (12,5)		1 (4,0)	3 (13,6)		0 (0,0)	4 (16,0)		0 (0,0)	4 (12,9)	
Qual a origem da água?	Poço artesiano	3 (10,7)	6 (17,1)	0,227	6 (15,8)	3 (12,0)	0,920	3 (9,4)	6 (19,3)	0,193	3 (11,5)	6 (16,2)	0,517
	Mina d'água	21 (75,0)	27 (77,1)		28 (73,7)	20 (80,0)		25 (78,1)	23 (74,2)		20 (76,9)	28 (75,7)	
	Outro	4 (14,3)	2 (5,7)		4 (10,5)	2 (8,0)		4 (12,5)	2 (6,5)		3 (11,5)	3 (8,1)	
Frequência da utilização de detergente ácido	Todos os dias	12 (42,9)	21 (60,0)	0,141	17 (44,7)	16 (64,0)	0,263	15 (46,9)	18 (58,1)	0,545	14 (53,8)	19 (51,3)	0,543
	Uma a três vezes por semana	11 (39,3)	11 (34,1)		16 (42,1)	6 (24,0)		13 (40,6)	9 (29,0)		10 (38,5)	12 (32,4)	
	Não usa	5 (17,9)	3 (8,6)		5 (13,2)	3 (12,0)		4 (12,5)	4 (12,9)		2 (7,7)	6 (16,2)	

¹Probabilidade calculada pelo teste exato de Fisher e teste de Cochran-Mantel-Haenszel para respostas binomiais e trinomiais, respectivamente; ^{2,3,4}rebanhos sem a utilização de desinfetante pré ou pós-ordenha foram excluídos da análise.

Tabela 6 - Características da água (dureza e pH) e quantidade de filme orgânico (média geométrica de ATP na teteira, filtro da unidade final ou balde ao pé, saída do tanque de expansão e copo coletor) após os procedimentos de limpeza dos equipamentos de ordenha dos grupos com alta ($1,2 \times 10^5$ UFC/mL) e baixa ($4,2 \times 10^4$ UFC/mL) contagem bacteriana total (CBT), alta ($4,5 \times 10^5$ UFC/mL) e baixa ($7,3 \times 10^4$ UFC/mL) contagem do leite com incubação preliminar (CIP), alta ($8,2 \times 10^3$ UFC/mL) e baixa ($4,5 \times 10^3$ UFC/mL) contagem do leite pasteurizado (CLP), alta ($1,1 \times 10^3$ UFC/mL) e baixa ($9,3 \times 10^1$ UFC/mL) contagem de coliformes (CC)

Variável	Contagem bacteriana do leite de tanque											
	CBT			CIP			CLP			CC		
	Alta	Baixa	P^1	Alta	Baixa	P^1	Alta	Baixa	P^1	Alta	Baixa	P^1
Dureza da água, ppm (log)	14,5 (1,2)	17,2 (1,2)	0,370	15,6 (1,2)	16,5 (1,2)	0,729	16,3 (1,2)	15,6 (1,2)	0,822	15,8 (1,2)	16,0 (1,2)	0,912
pH da água	6,4	6,6	0,213	6,5	6,5	0,995	6,5	6,5	0,566	6,6	6,4	0,365
Filme orgânico na teteira, URL ² (log)	501,8 (2,7)	256,6 (2,4)	0,109	476,3 (2,7)	209,5 (2,3)	0,051	416,0 (2,6)	293,1 (2,4)	0,321	523,3 (2,7)	255,1 (2,4)	0,087
Filme orgânico na saída do tanque de expansão, URL (log)	4767,0 (3,7)	691,4 (2,8)	0,001	2452,2 (3,4)	894,9 (2,9)	0,091	1658,1 (3,2)	1644,8 (3,2)	0,890	4159,3 (3,6)	773,4 (2,9)	0,003
Filme orgânico no copo coletor, URL (log)	504,4 (2,7)	341,2 (2,5)	0,394	537,5 (2,7)	256,9 (2,4)	0,096	322,6 (2,6)	450,2 (2,6)	0,746	510,0 (2,7)	339,0 (2,5)	0,372

¹Probabilidade calculada pelo teste T; ²Unidades relativas de luz.

Na tabela 6 estão descritas características da água e eficiência da limpeza dos equipamentos de ordenha (quantidade de ATP em unidades relativas de luz). A dureza da água, o pH, a quantidade de filme orgânico na teteira e a quantidade de filme orgânico no copo coletor foram semelhantes para a CBT, CIP, CLP e CC entre os dois grupos avaliados ($P \geq 0,05$). A quantidade de filme orgânico na saída do tanque de expansão também foi semelhante entre os grupos alta e baixa CIP e CLP.

3.3.3 Fatores de risco para a qualidade do leite cru

As variáveis identificadas como possíveis fatores de risco pelas análises de Fisher, teste de Cochran-Mantel-Haenszel e teste T ($P \leq 0,20$) para a alta CBT, CIP, CLP e CC, inseridas no modelo de regressão logística final, estão apresentadas na tabela 7. As variáveis tempo de ação e tipo de desinfetante de tetos utilizados pré e pós-ordenha, foram excluídas do modelo de regressão logística multivariada, por serem variáveis subordinadas ao uso de desinfetante de tetos pré e pós-ordenha.

Nos modelos de regressão logística analisados, apenas a quantidade de filme orgânico (ATP em unidades relativas de luz) na saída do tanque de expansão foi identificado como fator de risco tanto para a alta CBT ($P = 0,001$) quanto para a alta CC ($P = 0,021$). A razão de chances de ocorrência de alta CBT e CC foi 7,16 e 2,79 vezes maiores em rebanhos com grande quantidade de matéria orgânica na saída do tanque de expansão, respectivamente.

Tabela 7 - Nível de significância do modelo final de regressão logística para a contagem bacteriana total (CBT), contagem do leite com incubação preliminar (CIP), contagem do leite pasteurizado (CLP) e contagem de coliformes (CC)

Variável	Contagem bacteriana do leite de tanque							
	CBT		CIP		CLP		CC	
	OR ¹	P ²	OR ¹	P ²	OR ¹	P ²	OR ¹	P ²
Uso de luvas pelos ordenadores	0,14	0,069	----	----	----	----	----	----
Presença de bezerro ao pé da vaca	2,39	0,430	13,23	0,245	----	----	3,62	0,180
Desinfecção de tetos pré-ordenha	<001	0,963	<001	0,954	----	----	0,57	0,670
Desinfecção de tetos pós-ordenha	0,24	0,190	3,14	0,452	----	----	1,56	0,639
Frequência da utilização de detergente ácido (todos os dias X não utiliza)	0,72	0,352	----	----	----	----	----	----
Frequência da utilização de detergente ácido (uma a três vezes por semana X não utiliza)	2,47	0,228	----	----	----	----	----	----
Tipo de ordenha (manual X balde ao pé)	----	----	>999,9	0,944	----	----	----	----
Tipo de ordenha (balde ao pé X canalizada)	----	----	>999,9	0,971	----	----	----	----
Número de ordenhas por dia (uma X duas)	----	----	----	----	----	----	5,54	0,495
Número de ordenhas por dia (uma X três)	----	----	----	----	----	----	3,34	0,716
Origem da água (poço artesiano X outro)	----	----	----	----	0,25	0,199	----	----
Origem da água (mina d'água X outro)	----	----	----	----	0,54	0,895	----	----
Escore de limpeza de úbere (1 X 3)	----	----	0,31	0,326	----	----	----	----
Escore de limpeza de úbere (2 X 3)	----	----	0,97	0,532	----	----	----	----
Filme orgânico na teteira (log URL ³)	2,53	0,369	15,75	0,088	----	----	1,65	0,425
Filme orgânico na saída do tanque (log URL ³)	7,16	0,001	2,20	0,256	----	----	2,79	0,021
Filme orgânico no copo coletor (log URL ³)	----	----	2,40	0,379	----	----	----	----

¹Odds Ratio (razão de chances); ²Probabilidade; ³Unidades relativas de luz.

3.4 Discussão

A contaminação do leite abrange diversos grupos de bactérias que, no presente estudo, foram avaliados por meio das contagens bacterianas (CBT, CIP, CLP e CC) e associados a diversas práticas de manejo utilizadas antes, durante e após a ordenha, em propriedades leiteiras.

3.4.1 Práticas de manejo associadas à contagem bacteriana total

A ausência de desinfecção de tetos pré e pós-ordenha e a utilização do bezerro ao pé da vaca no momento da ordenha, para estimular a ejeção do leite, foram práticas associadas à alta CBT do leite de tanque. Com relação à presença de material orgânico no equipamento de ordenha após a limpeza, foi identificada maior quantidade de filme orgânico (ATP) na válvula de saída do tanque de expansão dos rebanhos com alta CBT. No presente estudo, ainda foram observadas tendências para as associações entre o uso de luvas pelos ordenadores ($P=0,087$), tempo de ação do desinfetante de tetos pré-ordenha ($P=0,098$), tipo de desinfetante de tetos pós-ordenha ($P=0,058$) e a CBT.

A frequência de uso de desinfecção de tetos pré-ordenha foi 21,4% maior no grupo de rebanhos com baixa CBT do que no grupo com alta CBT. A utilização de desinfetantes de tetos pré-ordenha é uma prática de manejo utilizada com os objetivos principais de reduzir a contaminação bacteriana nos tetos, imediatamente antes da ordenha, e de reduzir o risco de mastite causada por bactérias ambientais (JAYARAO et al., 2004). Os resultados do presente estudo corroboram com os relatados por Jayarao et al. (2004) e Elmoslemany et al. (2009a) que descreveram associação negativa entre o não uso de desinfetante de tetos pré-ordenha e a contagem de bactérias aeróbias totais. No Brasil, em estudo realizado na região nordeste da Paraíba, Oliveira et al. (2011) descreveram que apenas 32% dos rebanhos avaliados utilizaram a desinfecção pré-ordenha e que esta prática não estava associada à alta CBT; estes autores atribuíram a ausência de alguns efeitos ao reduzido número de rebanhos analisados (50).

Segundo Nickerson (2001), a redução da contaminação microbiana imediatamente antes da ordenha é dependente do uso de desinfetante de tetos pré-ordenha e outros procedimentos: 1) lavar os tetos com água se necessário (presença de esterco, barro ou outro tipo de matéria orgânica); 2) retirar os primeiros jatos de leite; 3) realizar a imersão dos tetos

em soluções desinfetantes de ação germicida comprovada; 4) deixar a solução desinfetante agir pelo tempo mínimo (15 a 30 segundos); 5) Secar os tetos com papel toalha descartável. No presente estudo, além do uso efetivo do desinfetante pré-ordenha, todos os procedimentos necessários para que sua ação seja efetiva foram avaliados. A frequência de rebanhos com tempo de ação mínimo de 30 segundos tendeu ($P=0,098$) a ser 22,7% maior para o grupo de rebanhos com baixa CBT do que para o grupo de rebanhos com alta CBT.

Adicionalmente, o uso de desinfecção de tetos pós-ordenha foi 35% maior no grupo de rebanhos com baixa CBT do que no grupo de rebanhos com alta CBT. O desinfetante de tetos pós-ordenha tem sido utilizado por mais de quatro décadas com o objetivo principal de prevenção de novos casos de mastite causada por micro-organismos contagiosos, pois ocorre redução de micro-organismos presentes na pele e canal dos tetos após a ordenha (WESEN; SCHULTZ, 1970). Segundo Zadoks et al. (2004), um dos fatores que podem contribuir para a alta CBT é a prevalência de mastite no rebanho, visto que espécies como o *Streptococcus agalactiae* são altamente correlacionadas com a alta CBT. Os resultados deste estudo corroboram com os relatados por Oliveira et al. (2011) que descreveram associação positiva entre o uso de desinfetante de tetos pós-ordenha e a baixa CBT, pelo teste exato de Fisher. O cloro, o iodo e a clorexidina estão entre as classes de desinfetantes de tetos pós-ordenha mais utilizadas, sendo que a eficácia destes está relacionada com seu modo de ação, segurança (toxicidade) e estabilidade (PANKEY et al. 1984). No presente estudo, a maior parte dos rebanhos ($n = 42$) dos dois grupos utilizou o iodo, 6,7 % dos rebanhos do grupo com alta CBT utilizaram o cloro e 12,5% dos rebanhos com baixa CBT utilizaram outros produtos.

Para reduzir a contaminação microbiana nos tetos e a ocorrência de mastite, além do uso de desinfetantes de tetos pré e pós-ordenha, é recomendado o uso de luvas pelos ordenhadores. As mãos dos ordenhadores podem ser acometidas por lesões e podem abrigar micro-organismos contaminantes do leite e causadores de mastite. As luvas de látex apresentam superfície lisa, são facilmente higienizadas e podem auxiliar na redução da contaminação microbiana (RIEKERINK et al., 2008). No presente estudo, o uso de luvas pelos ordenhadores foi 20% maior no grupo de rebanhos com baixa CBT do que no grupo com alta CBT. Segundo Huijips et al. (2010), o uso de luvas por ordenhadores é uma técnica com menor impacto do que os desinfetantes pré e pós-ordenha na redução tanto de mastite ambiental quanto contagiosa. Riekerink et al. (2008) observaram que a desinfecção das mãos com desinfetante reduziu 75% da carga microbiana e a desinfecção das mãos com luvas reduziu 98% da carga microbiana.

A utilização da mamada do bezerro antes da ordenha promove a liberação de ocitocina endógena, hormônio que estimula a ejeção do leite, e é prática utilizada em rebanhos com vacas mestiças provenientes do cruzamento da raça Holandesa com raças zebuínas (ARAÚJO et al., 2012). Esta prática tem como inconvenientes o aumento da mão de obra, necessidade de adaptação da sala de ordenha (em caso de ordenha mecânica) e pode dificultar a execução de práticas higiênicas, tais como ordenhar tetos limpos e secos (BRITO et al., 2000; ARAÚJO et al., 2012). Em estudo realizado por Brito et al. (2000), foi observado que a mamada do bezerro aumentou em mais de dez vezes a carga microbiana na superfície dos tetos, mas que esta contaminação foi reduzida em 90% após o uso do desinfetante de tetos pré-ordenha. No presente estudo, houve associação entre a utilização do bezerro ao pé da vaca na ordenha e a CBT, na qual o número de rebanhos com uso do bezerro ao pé da vaca foi maior no grupo de rebanhos com alta CBT. De forma contrária, outros estudos não observaram diferenças na associação entre a CBT e a presença do bezerro ao pé da vaca durante a ordenha (ARAÚJO et al., 2012).

Além das práticas de manejo avaliadas, o pH, a dureza, a temperatura e a quantidade de água utilizada para a limpeza dos equipamentos de ordenha, a utilização de detergentes apropriados, o bom funcionamento dos equipamentos com um sistema de turbilhamento eficiente, são fatores que interferem na limpeza dos equipamentos de ordenha e que podem estar associados à alta CBT. Com o objetivo de avaliar a efetividade da limpeza dos equipamentos de ordenha, no presente estudo, utilizou-se a técnica da bioluminescência do ATP (adenosina trifosfato), cujo princípio é a conversão da energia química associada ao ATP pelo complexo de enzima-substrato em luz em uma reação estequiométrica (MACLEOD et al., 2001). Nos equipamentos de ordenha, o depósito de resíduos do leite resultante da inadequada higienização proporcionam nutrientes para a multiplicação microbiana que pode ser estimada pela bioluminescência do ATP, uma vez que todos os seres vivos o utilizam para armazenamento de energia gerada pela respiração celular. Segundo Wu et al. (2011), a bioluminescência do ATP apresenta tempo de resposta rápido, pode ser realizada em cinco minutos e é adequada para o monitoramento da higiene em programas de qualidade na indústria de alimentos. No presente estudo, a quantidade de material orgânico na válvula de saída do tanque de expansão do grupo de rebanhos com alta CBT foi 6,9 vezes maior do que a do grupo de rebanhos com baixa CBT. Elmoslemany et al. (2009b) identificaram a quantidade de matéria orgânica presente no início e no final da linha do leite, obtida pelo método de ATP bioluminescência, como fatores associados à alta CBT. A metodologia de bioluminescência detecta não só a contaminação bacteriana como também a contaminação não bacteriana, por

exemplo, o leite residual ou outro tipo de material orgânico, por este motivo, a bioluminescência é um método sensível na detecção da eficácia da limpeza dos equipamentos de ordenha (VILAR et al., 2008).

Neste estudo ainda foram avaliadas outras práticas de manejo como a lavagem dos tetos pré-ordenha, a retirada dos primeiros jatos de leite e o uso de papel toalha para secagem dos tetos. Não foram observadas associações entre a frequência de utilização destes procedimentos com a CBT do leite de tanque. Estes resultados diferem dos encontrados por Oliveira et al. (2011) que relataram associação entre a CBT, a lavagem dos tetos pré-ordenha e a retirada dos primeiros jatos de leite. Outros autores observaram que a lavagem dos tetos com água pré-ordenha é um fator de risco para a alta CBT, mas que a retirada dos pelos do úbere e o uso do desinfetante de tetos pré-ordenha são fatores de proteção (ELMOSLEMANY et al., 2009a).

No modelo final de regressão logística (Tabela 3.6), foi identificado como fator de risco para a alta CBT apenas a quantidade de ATP presente na válvula de saída do tanque de expansão. Por este modelo, o risco de ocorrência de alta CBT aumentou em 7,16 vezes para cada unidade (logarítmica) de aumento na quantidade de ATP (RLU) na saída do tanque de expansão. Os resultados do presente estudo diferem dos descritos por Elmoslemany et al. (2009b), os quais não descreveram a quantidade de ATP nos equipamentos de ordenha como fator de risco para a alta CBT. No presente estudo, esperava-se que práticas de manejo, como o uso de desinfetantes de tetos, apresentassem diferenças nos modelos de regressão logística finais, no entanto, estas diferenças não foram observadas o que pode ter relação com o número amostral utilizado (n=63). Embora o número de rebanhos selecionados tenha sido 120, o presente estudo foi finalizado apenas com 63 rebanhos, em função de alguns descontinuarem o fornecimento de leite para o laticínio colaborador. Elmoslemany et al. (2009b) e Oliveira et al. (2011) descreveram esta mesma limitação em seus estudos, em que o número amostral foi de 69 e 50 rebanhos, respectivamente.

3.4.2 Práticas de manejo associadas à contagem do leite com incubação preliminar

A utilização do bezerro ao pé da vaca no momento da ordenha e o não uso de desinfetantes de tetos pós-ordenha, foram práticas associadas à alta CIP. Adicionalmente, foram observadas tendências para as associações entre o uso de desinfetantes de tetos pré-

ordenha, tipo de ordenha utilizado e quantidade de matéria orgânica (ATP) presente nos equipamentos de ordenha (teteira, copo coletor e válvula de saída do tanque de expansão) após a limpeza.

A contagem bacteriana do leite com incubação preliminar, utilizada para estimar a contagem de bactérias psicotólicas, é considerada um ótimo indicador de que o leite foi produzido em boas condições de higiene e de armazenamento do leite (JONES; SUMNER, 1999; JARAYAO; WOLFGANG, 2003). A alta CIP está associada à redução da vida de prateleira do leite e produtos lácteos (JONES; SUMNER, 1999). Segundo Jones et al. (1999), a CIP não pode exceder 100.000 UFC/mL e valores até 25.000 UFC/mL são aceitáveis para o leite de tanque. A CIP é altamente correlacionada com a CBT e deve ser cerca de 3 a 4 vezes mais elevada que a CBT e, desta forma, além de auxiliar na detecção de falhas de manejo relacionadas à higiene, também auxilia na detecção de falhas no resfriamento e tempo de armazenamento (JARAYAO; WOLFGANG, 2003). No presente estudo, a CIP foi 5,5 vezes maior do que a CBT o que indica possíveis deficiências no armazenamento do leite.

Da mesma forma com que ocorreu para a CBT, a utilização de desinfecção de tetos pós-ordenha foi maior (28,8%) no grupo com baixa CIP, quando comparado ao grupo com alta CIP. Quanto ao uso de desinfetante pré-ordenha, no presente estudo não foram observadas diferenças na frequência de utilização desta prática entre os dois grupos, no entanto, o uso de desinfetante de tetos pré-ordenha tendeu a ser maior (15,8%) para grupo de rebanhos com baixa CIP. Os resultados do presente estudo corroboram com os de Jayarao et al. (2004) que descrevem que o uso de desinfetantes de tetos pré e pós-ordenha reduzem tanto a CBT quanto a CIP.

De forma similar ao observado com a CBT, o uso do bezerro ao pé da vaca no momento da ordenha foi maior no grupo de rebanhos com alta CIP, e a frequência de rebanhos com sistema de ordenha mecânica canalizada tendeu ($P = 0,079$) a ser maior no grupo com baixa CIP. A utilização de sistema de ordenha mecânica tem como objetivos reduzir a mão de obra e o tempo de ordenha, mas não implica necessariamente em aumento da qualidade do leite, e sim em um fator adicional de contaminação microbiana em casos de falhas na higiene e limpeza destes equipamentos (GUERREIRO et al., 2005). Os resultados do presente estudo diferem dos descritos por Guerreiro et al. (2005) que, ao avaliar a influência da adoção de diferentes técnicas profiláticas de higiene e limpeza sobre a CIP, descreveram resultado inicial onze vezes maior em rebanhos com ordenha mecânica do que em propriedades com ordenha manual.

Adicionalmente, a quantidade de filme orgânico tanto na teteira ($P = 0,051$) quanto no copo coletor ($P = 0,091$) e na válvula de saída do tanque de expansão ($P = 0,096$) tenderam a ser maior no grupo de rebanhos com alta CIP quando comparado com o grupo com baixa CIP. Segundo Jayarao et al. (2003), valores de CIP quatro vezes mais elevados do que a CBT podem indicar limpeza inadequada dos equipamentos ou falhas na limpeza dos tetos pré-ordenha. Os resultados do presente estudo indicam que a alta CIP está relacionada à ineficiência de limpeza dos equipamentos de ordenha e não ao sistema de ordenha utilizado.

Não foram identificados fatores de risco para a alta CIP no modelo de regressão logística analisado.

3.4.3 Práticas de manejo associadas à contagem do leite pasteurizado

Não foram observadas associações entre as práticas de manejo avaliadas e a CLP. Houve tendência ($P = 0,091$) de maior frequência (25,2%) de rebanhos do grupo com baixa CLP com tempo mínimo de 30 segundos de ação do desinfetante de tetos pré-ordenha, quando comparado com o grupo com alta CLP.

A CLP é a contagem de bactérias que resistem ao processamento térmico (62,8° C por 30 minutos) que simula a pasteurização realizada na indústria (JONES; SUMNER, 1999). A CLP é considerada alta quando está acima de 200 UFC/mL e está relacionada principalmente à deficiências de limpeza e manutenção dos equipamentos de ordenha (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). No presente estudo, a CLP média do grupo de rebanhos com alta CLP (1312,2 UFC/mL) foi 6,5 vezes maior do que o valor descrito por Jayarao e 8,3 vezes maior do que a CLP do grupo com baixa CLP (158,7 UFC/mL). Estes resultados indicam que outros fatores (temperatura, o pH, o tempo de ação das soluções detergentes de limpeza, por exemplo) não avaliados neste estudo podem estar relacionados com a alta CLP.

3.4.4 Práticas de manejo associadas à contagem de coliformes

A utilização do bezerro ao pé da vaca no momento da ordenha foi a única prática de manejo associada à alta CC, no entanto, houve tendência de associação positiva entre a CC e

o uso do desinfetante de tetos pré ($P = 0,073$) e pós-ordenha ($P = 0,076$), o tempo de ação do desinfetante de tetos pré-ordenha ($P = 0,083$), o número de ordenhas realizadas durante um dia ($P = 0,087$). A quantidade de filme orgânico (ATP) na válvula de saída do tanque de expansão foi maior ($P = 0,003$) em rebanhos com alta CC e, tendeu a ser maior ($P = 0,087$) em rebanhos com alta quantidade de matéria orgânica nas teteiras.

A CC é considerada um indicador do nível de contaminação por matéria orgânica, que ocorre principalmente a partir do contato com o exterior do úbere e tetos dos animais e equipamentos de ordenha mal higienizados e de ocorrência de mastite por coliformes (EDMONDSON, 2005). Neste contexto, a prática de ordenha com o bezerro ao pé da vaca pode dificultar a execução de práticas de higiene pré-ordenha e resultar em contaminação por matéria orgânica proveniente do úbere e tetos e, consequentemente, aumentar a CC do leite cru. No presente estudo, a frequência de rebanhos com ordenha com o bezerro ao pé da vaca foi 28% maior nos rebanhos com alta CC, que nos rebanhos com baixa CC.

O não uso de desinfetante de tetos pré-ordenha também pode resultar em maior contaminação do leite por matéria orgânica, além de resultar em aumento no número de casos de mastite ambiental. No presente estudo, foi observada uma tendência de maior uso de desinfetante de tetos pré ($P = 0,073$) e pós-ordenha ($P = 0,076$) e maior tempo de ação do desinfetante pré-ordenha ($P = 0,083$) no grupo de rebanhos com baixa CC, quando comparado com o grupo com alta CC. Estes resultados corroboram com os de Oliveira et al. (2011) que observaram tendência de associação entre a CC e o uso de desinfetantes de tetos pós-ordenha.

Fatores relacionados com a limpeza dos equipamentos de ordenha, como a dureza da água, alcalinidade e temperatura da solução de limpeza foram descritos por Elmoslemany et al. (2009c). Estes autores também avaliaram a quantidade de filme orgânico (ATP) nos equipamentos de ordenha após os procedimentos de limpeza, e concluíram que a válvula de saída do tanque de expansão é uma das maiores fontes de contaminação para o leite de tanque. Os resultados do presente estudo corroboram com os de Elmoslemany et al. (2009) que descreveram associação tanto da CC quanto da CBT e da CIP com a quantidade de ATP (bioluminescência) na válvula de saída do tanque de expansão.

A quantidade de ATP presente na válvula de saída do tanque de expansão foi identificada como o único fator de risco para a alta CC no modelo de regressão logística final. Por este modelo, o risco de se ter alta CC aumenta em 2,79 vezes para cada unidade (logarítmica) de aumento na quantidade de ATP (RLU) na saída do tanque de expansão.

Os resultados do presente estudo sugerem que o uso de desinfetante de tetos pré e pós-ordenha são práticas de manejo associadas à melhora da qualidade do leite cru.

Adicionalmente, a contaminação da válvula de saída do tanque de expansão é um fator de risco para a baixa qualidade do leite cru.

3.5 Conclusão

A prática de ordenha com o bezerro ao pé da vaca, o não uso de desinfetante de tetos pré e pós-ordenha e a quantidade de matéria orgânica na válvula de saída do leite do tanque de expansão são os principais fatores associados à baixa qualidade higiênica do leite cru em rebanhos leiteiros com pagamento de leite por qualidade localizados no Sul de Minas Gerais e Oeste de São Paulo.

4 PERFIL SOCIOECONÔMICO, ATITUDES E CONHECIMENTO DE PRODUTORES DE LEITE EM RELAÇÃO À MASTITE E À QUALIDADE DO LEITE

RESUMO

Os objetivos do presente estudo foram determinar a associação entre a ocorrência de mastite subclínica e: os conhecimentos sobre qualidade do leite, os conhecimentos sobre mastite e as características socioeconômicas dos produtores de leite; bem como estimar a correlação entre a CCS e outros indicadores de qualidade higiênica do leite de tanque de rebanhos leiteiros. Amostras de leite de tanque de 120 rebanhos leiteiros submetidos a programa de pagamento de leite por qualidade foram coletadas para as análises de CCS, contagem bacteriana total (CBT), contagem do leite com incubação preliminar (CIP), contagem do leite pasteurizado (CLP) e contagem de coliformes (CC). Após as análises microbiológicas, sessenta e três rebanhos foram distribuídos em três grupos: a) baixa CCS: ≤ 250.000 céls/mL ($n = 16$); b) média CCS: $>250.000 \leq 400.000$ céls/mL ($n = 24$); c) alta CCS: > 400.000 céls/mL ($n = 23$). Questionários foram aplicados aos responsáveis pelo manejo do rebanho. Oitenta e sete por cento dos rebanhos com CCS até 400×10^3 apresentaram como principal atividade a produção de leite; em contrapartida, o leite era a principal atividade em menos da metade (47%) dos com CCS acima de 400×10^3 ($P < 0,031$). Noventa e cinco por cento dos rebanhos avaliados utilizavam ordenha mecânica e destes, analisando-se os grupos, 70,8% do grupo média CCS e 78,3% do grupo alta CCS utilizavam ordenha canalizada, enquanto apenas 50% do grupo de baixa CCS utilizavam este tipo de ordenha ($P < 0,031$). O uso do CMT foi 22,9% maior nos rebanhos com CCS <250.000 céls/mL quando comparado com rebanhos com CCS entre 250.000 e 400.000 céls/mL, e 33,9% maior do que em rebanhos com CCS $>$ de 400.000 céls/mL. A maioria (56,5%) dos entrevistados com conhecimento das exigências para CCS e CBT era responsável pelos rebanhos com maiores CCS (>400.000 céls/mL). Em conclusão, a ordem de importância do leite como atividade econômica na propriedade, o tipo de ordenha utilizado, o uso de métodos para detecção de mastite e o conhecimento das exigências legais de CCS e CBT interferem na qualidade do leite produzido.

Palavras-chave: Mastite. Qualidade do Leite. Características Socioeconômicas.

ABSTRACT

The objectives of this study were to determine the association between the occurrence of subclinical mastitis with: milk quality knowledge, mastitis knowledge and the socioeconomic characteristics of dairy farmers; and to estimate the correlation between somatic cell count (SCC) and bulk tank milk hygienic quality in dairy herds. Bulk tank milk samples from 120 dairy herds with milk quality payment program were collected for SCC, total bacterial count (TBC), preliminary incubation count (PIC), laboratory pasteurization count (LPC), coliform count (CC). After microbiological analyzes, 63 herds were selected and distributed into three groups: a) low SCC: $\leq 250,000$ cells / mL (n = 16); b) medium SCC: $>250,000 \leq 400,000$ cells/mL (n = 24); c) high SCC: $> 400,000$ cells / mL (n = 23). Previously formulated questionnaires were submitted to the herd manager. A total of 87.0 % of dairy herds with SCC up to 400×10^3 had milk production as the main economic activity in the farm, in contrast, less than half (47%) of dairy herds with SCC higher than 400×10^3 had milk production as the main economic activity in the farm (P < 0.031). Ninety- five percent of herds used milking machine and from these total, 70.8 % of herds with medium SCC and 78.3 % of of herds with high SCC used a pipeline milking machine, while only 50.0 % of herds with low SCC used the pipeline milking machine (P < 0.031). The use of California Mastitis Test (CMT) was 22.9 % higher in herds with SCC < 250,000 cells/mL compared with herds with SCC between 250,000 and 400,000 cells/mL, and 33.9 % higher compared with herds with SCC > 400,000 cells/mL. The majority of interviewed people (56.5%) from herds with higher SCC (> 400,000 cells/mL) had knowledge about legal requirements for SCC and TBC. In conclusion, milk as main economic activity in the farm, type of milking procedures used, the use of methods for mastitis detection and knowledge about legal requirements for SCC and TBC were correlated with CCS in bulk tank milk.

Keywords: Mastitis. Milk Quality. Socioeconomic Characteristics.

4.1 Introdução

A mastite bovina é a doença mais prevalente e onerosa para toda cadeia produtiva do leite (BRADLEY, 2002). A contagem de células somáticas (CCS) é o método de referência utilizado para monitorar a saúde do úbere e a qualidade do leite, pois a CCS aumenta durante

episódios de mastite (RYSANEK et al., 2007). Em nível de rebanho, a CCS no leite de tanque permite estimar a porcentagem de quartos mamários infectados por micro-organismos causadores de mastite (RYSANEK et al., 2009).

A alta CCS do leite causa amento na quantidade de enzimas proteolíticas e lipolíticas, as quais diminuem o rendimento do leite na produção de queijos e interferem no sabor e vida de prateleira de produtos lácteos (BARBANO et al., 2006). No Brasil, alguns laticínios implantaram programas de remuneração do leite por qualidade com os objetivos de melhorar sua eficiência econômica (ROMA JÚNIOR et al., 2009). A implantação desses programas de pagamento por qualidade envolve incentivos ou penalizações sobre o preço base do leite e tem resultados positivos sobre a redução da CCS e aumento da qualidade do leite (BOTARO et al., 2013).

A eficiência de implantação de práticas de controle da mastite em fazendas leiteiras é dependente do fator humano, do estilo de gestão do produtor e de como ele vai agir frente a diferentes formas de tratamento de mastite e prevenção (JANSEN et al., 2009). Com relação à mastite, ainda existem lacunas quanto ao nível de conhecimento dos produtores de leite sobre as causas, controle e prevenção de mastite (MCLEOD, 2008). Jansen et al. (2009) e Jansen et al. (2010b) avaliaram como as atitudes específicas e os conhecimentos dos produtores interferem na CCS de rebanhos leiteiros, bem como sua relação com a incidência de mastite dentro ou fora de programas de controle. Jansen et al. (2009), em estudo realizado com rebanhos leiteiros na Holanda, relataram que o comportamento e atitudes dos produtores explicaram juntos 48% da variação na contagem de células somáticas do leite de tanque, 31% da incidência de mastite clínica e 23% da incidência de mastite subclínica. Em outro estudo, Jansen et al. (2010b), com o objetivo de avaliar os efeitos da implantação de um programa nacional de controle da mastite sobre as atitudes, o comportamento e os conhecimentos dos produtores com relação à mastite, concluíram que houve diminuição de CCS no leite de tanque associada às mudanças nas percepções e determinadas práticas de manejo utilizadas pelos produtores.

Apesar de estudos anteriores (JANSEN et al., 2009; 2010b) terem relacionado atitudes e conhecimentos à CCS e à incidência de mastite em rebanhos com e sem a implantação de programas de controle da doença, há escassez de estudos que avaliam o conhecimento técnico e as opiniões dos produtores de leite sobre as causas, prejuízos e medidas de controle da mastite bovina em programas de pagamento por qualidade do leite. Este tipo de avaliação pode ser utilizado como um referencial de mudanças no conhecimento e sensibilização dos produtores frente a novos conceitos para controle e prevenção da mastite (MCLEOD, 2008).

Os objetivos do presente estudo foram determinar a associação entre a ocorrência de mastite subclínica e: os conhecimentos sobre qualidade do leite, os conhecimentos sobre mastite e as características socioeconômicas dos produtores de leite; bem como estimar a correlação entre a CCS e outros indicadores de qualidade higiênica do leite de tanque de rebanhos leiteiros com programas de pagamento de leite por qualidade.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Seleção dos rebanhos leiteiros e análises laboratoriais

A descrição detalhada da seleção dos rebanhos leiteiros, coletas de amostras, análises microbiológicas, contagem de células somáticas e composição do leite está descrita nos itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3 desta tese, respectivamente.

4.2.2 Coleta de dados na fazenda leiteira

Após a fase de seleção dos rebanhos e coletas de dados de amostras para análises laboratoriais, 57 rebanhos foram excluídos do estudo por descontinuarem o fornecimento de leite ao laticínio vinculado ao estudo de forma a compor um total de 63 rebanhos os quais foram, posteriormente, visitados para aplicação de questionários previamente formulados com base nos estudos de Olival et al. (2004); Jansen et al. (2009) e Oinara et al. (2009), adaptados para a região em estudo e testados por entrevista realizada em uma propriedade. Os questionários foram aplicados sempre pela mesma pesquisadora e sempre direcionado aos responsáveis pelo manejo do rebanho com questões divididas nos seguintes tópicos: i) socioeconômicas (Apêndice E) (visavam estratificar os produtores com relação a sua renda, volume de produção, tipo de mão de obra e assistência técnica utilizadas na propriedade), ii) conhecimentos a respeito de células somáticas, contagem bacteriana e mastite (Apêndice F) (controle, prevenção e tratamento), iii) comportamentos dos produtores com relação a práticas de prevenção da mastite, higiene de ordenha e equipamentos (Apêndice G).

Para compor os grupos experimentais, os 63 rebanhos visitados foram distribuídos em três grupos de acordo com as médias geométricas da CCS (8 coletas semanais consecutivas durante dois meses): a) baixa CCS: ≤ 250.000 céls/mL ($n = 16$); b) média CCS: $>250.000 \leq 400.000$ céls/mL ($n = 24$); c) alta CCS: > 400.000 céls/mL ($n = 23$). A CCS de 250.000 céls/mL foi recomendada para caracterizar rebanhos com baixa CCS e como limite para ausência de mastite (JAYARAO; WOLFGANG, 2003), até 400.000 céls/mL rebanhos com valores médios de CCS e, acima de 400.000 céls/mL, rebanhos com alta CCS (JAYARAO et al., 2004).

4.2.3 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados no programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2010), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo Teste F. Os dados provenientes das análises microbiológicas (CBT, CIP CLP e CC) e da CCS foram convertidos para escala logarítmica. Os dados de CBT, CIP, CLP, CC e CCS foram submetidos à análise de variância (PROC ANOVA) utilizando o seguinte modelo:

$$Y_i = \mu + ccs_i + \varepsilon_{ij}$$

onde:

Y_i = variável resposta;

μ = média geral;

ccs_i = efeito da i -ésima CCS;

ε_{ij} = erro aleatório.

A comparação de médias foi realizada pelo teste de média Scheffé, teste que permite contraste entre médias com diferentes números de observações por tratamento. . Para análise estatística entre as frequências das respostas obtidas, foi utilizado o teste de Cochran-Mantel-Haenszel. Foram realizadas análises para obter os coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros de qualidade e a CCS de cada rebanho (PROC CORR).

4.3 Resultados

As médias (log) dos indicadores de qualidade do leite (CBT, CIP, CLP, CC e CCS) dos grupos de baixa, média e alta CCS, avaliadas durante dois meses, estão descritas na tabela 8. Todos os indicadores de higiene analisados (CBT, CIP, CLP e CC) foram maiores ($P < 0,001$) em rebanhos com alta CCS do que em rebanhos de média e baixa CCS, e todos estes indicadores foram maiores em rebanhos com média CCS do que em rebanhos com baixa CCS.

Tabela 8 - Contagem bacteriana total (CBT), contagem do leite com incubação preliminar (CIP), contagem do leite pasteurizado (CLP), contagem de coliformes totais (CC) e contagem de células somáticas (CCS), agrupados pela contagem de células somáticas (grupos baixa, média e alta CCS)

Variável	Contagem de células somáticas			EPM ¹	P
	≤ 250	>250 ≤ 400	> 400		
CBT (10 ³ UFC/mL (log))	32708,8 ^c (3,7)	86744,0 ^b (4,1)	103088,7 ^a (4,4)	0,035	<0,001
CIP (10 ³ UFC/mL (log))	192829,5 ^c (4,6)	354598,3 ^b (4,9)	444990,2 ^a (5,2)	0,041	<0,001
CLP (UFC/mL (log))	857,7 ^c (0,5)	1174,6 ^b (0,6)	2939,4 ^a (0,7)	0,004	<0,001
CC (UFC/mL (log))	74,21 ^c (1,0)	258,4 ^b (1,5)	1678,2 ^a (1,8)	0,050	<0,001
CCS (10 ³ céls/mL (log))	203,6 ^c (2,3)	333,7 ^b (2,5)	707,9 ^a (2,8)	0,107	<0,001

¹Erro padrão da média. Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem ($P > 0,05$) pelo teste Scheffé.

Com relação às características socioeconômicas, houve diferença na frequência das respostas sobre a principal atividade econômica desenvolvida na propriedade ($P < 0,031$) e para o tipo de ordenha existente na propriedade ($P < 0,031$) entre os grupos baixa, média e alta CCS (Tabela 9). Oitenta e sete por cento dos rebanhos com CCS até 400×10^3 apresentaram como principal atividade a produção de leite; em contrapartida, o leite era a

principal atividade em menos da metade (47%) dos com CCS acima de 400×10^3 . Noventa e cinco por cento dos rebanhos avaliados utilizavam ordenha mecânica e destes, analisando-se os grupos, 70,8% rebanhos de média CCS e 78,3% rebanhos de alta CCS utilizavam ordenha canalizada, enquanto apenas 50% rebanhos de baixa CCS utilizavam este tipo de ordenha. A importância do leite como a principal atividade econômica tendeu ($P = 0,067$) a ser maior para os entrevistados dos grupos baixa e média CCS, do que para os entrevistados do grupo com alta CCS. Não houve diferença na frequência das respostas entre os grupos de CCS estudados para as seguintes variáveis: número de anos de estudo do proprietário/responsável pelo manejo do rebanho, renda média mensal, quantidade de litros de leite produzida por dia na propriedade, tipo de funcionários (mão de obra familiar, contratada permanente, contratada temporária) existentes na propriedade envolvidos com o leite e tipo de assistência técnica (veterinário, cooperativa, outro) utilizada entre os três grupos avaliados.

Na tabela 10 estão descritas as práticas de prevenção e controle da mastite, informadas pelos produtores classificados como grupos baixa, média e alta CCS. Apenas a utilização do California Mastitis Test (CMT) diferiu ($P < 0,042$), entre os três grupos avaliados, com relação aos procedimentos adotados pelos produtores na prevenção e controle da mastite. Em mais da metade dos rebanhos (68,7%) do grupo de baixa CCS foi utilizado o CMT para identificar os casos de mastite subclínica, enquanto menos da metade dos grupos média (45,8%) e alta CCS (34,8%) foi utilizada tal prática. O uso de antibióticos para o tratamento de mastite clínica tendeu ($P = 0,079$) a ser maior no grupo de rebanhos com alta CCS. Foi verificada tendência ($P = 0,057$) de utilização de diferentes tratamentos para mastite clínica nos três grupos de rebanhos avaliados, sendo que mais de 50% dos rebanhos com baixa (66,7%) e média (73,9%) tenderam a usar antibiótico intramamário associado ao antibiótico sistêmico.

Não foram verificadas diferenças entre os três grupos de CCS avaliados quanto às seguintes variáveis: anotação de casos ou protocolos de mastite, utilização de anti-inflamatórios em casos de mastite clínica, tratamento das vacas secas, utilização da CCS individual para diagnóstico da mastite subclínica, utilização do exame microbiológico para identificação do patógeno infectante, descarte de animais por mastite, utilização de algum tipo de vacina contra mastite e segregação em lotes dos animais com mastite.

Tabela 9 - Características dos produtores (grau de escolaridade, renda) e da propriedade (atividades, importância econômica do leite, produção de leite, tipo de ordenha e assistência técnica) nos grupos baixa, média e alta CCS

Variável	Resposta	CCS do tanque (10 ³ céls/mL)			P
		< 250 n (%)	250 ≤ 400 n (%)	> 400 n (%)	
Quantos anos de estudo o(a) Sr(a) possui?	Não possui	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,35)	0,673
	Até 5 anos	6 (37,5)	10 (41,7)	7 (30,4)	
	Até 8 anos	4 (25,0)	5 (20,8)	7 (30,4)	
	Até 11 anos	2 (12,5)	5 (20,8)	5 (21,7)	
	Nível superior	4 (25,0)	4 (16,7)	3 (13,0)	
Qual a renda média mensal do(a) sr(a)?	< R\$ 456	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,815
	De R\$ 466 a 930	2 (12,5)	3 (13,0)	2 (8,7)	
	De R\$ 931 a 1395	5 (31,2)	11 (47,8)	8 (34,8)	
	De R\$ 1936 a 1980	1 (6,3)	4 (17,4)	2 (8,7)	
	Mais de R\$ 1980	8 (50,0)	5 (21,7)	11 (47,8)	
Qual a principal atividade da propriedade? ¹	Agricultura	1 (6,7)	3 (12,5)	10 (47,6)	0,031
	Leite	13 (86,7)	21 (87,5)	10 (47,6)	
	Carne Bovina	1 (6,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	Outras	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,8)	
Qual a importância econômica do leite para o(a) sr(a)?	Principal atividade	13 (81,2)	20 (83,3)	11 (47,8)	0,067
	Segunda atividade	1 (6,25)	2 (8,3)	6 (26,1)	
	Complemento	1 (6,3)	1 (4,2)	4 (17,4)	
	Sem importância	1 (6,3)	1 (4,2)	2 (8,7)	
Quantos litros de leite a propriedade produz por dia?	101 ≥ 500	8 (50,0)	6 (25,0)	9 (39,1)	0,487
	501 ≥ 1000	2 (12,5)	9 (37,5)	10 (43,5)	
	1001 ≥ 2000	1 (6,2)	5 (20,8)	1 (4,3)	
	2001 ≥ 5000	5 (31,2)	1 (4,2)	2 (8,7)	
	5000 >	0 (0,0)	3 (12,5)	1 (4,3)	
Que tipo de funcionários existem na propriedade (envolvidos com o leite)?	Mão de obra familiar	5 (31,2)	5 (20,8)	3 (13,1)	0,750
	Permanentes	7 (43,7)	15 (62,5)	17 (73,9)	
	Permanentes e temporários	4 (25,0)	4 (16,7)	3 (13,0)	
Qual o tipo de ordenha existente na propriedade?	Manual	1 (6,2)	2 (8,3)	0 (0,0)	0,031
	Balde ao pé com bezerro	4 (25,0)	2 (8,3)	1 (4,3)	
	Balde ao pé sem bezerro	3 (18,7)	3 (12,5)	4 (17,4)	
	Canalizado	8 (50,0)	17 (70,8)	18 (78,3)	
Qual o tipo de assistência técnica possui?	Veterinário	8 (50,0)	12 (50,0)	12 (52,2)	0,835
	Cooperativa	3 (18,7)	0 (0,0)	2 (8,7)	
	Outro	5 (31,3)	10 (41,7)	8 (34,8)	
	Não possui	0 (0,0)	2 (8,3)	1 (4,3)	

¹Três produtores que vivem 50% da agricultura e 50% do leite foram excluídos da análise.

Tabela 10 - Práticas de prevenção e controle de mastite nos rebanhos com baixa, média e alta CCS

Variável	Resposta	CCS do tanque (10^3 céls/mL)			P
		< 250 n (%)	$250 \leq 400$ n (%)	> 400 n (%)	
Anota os casos de mastite clínica?	Sim	10 (62,5)	15 (62,5)	10 (43,5)	0,209
	Não	6 (37,5)	9 (37,5)	13 (56,5)	
Anota protocolos de tratamento de mastite?	Sim	10 (62,5)	17 (20,8)	12 (52,2)	0,441
	Não	6 (37,5)	7 (29,2)	11 (47,8)	
Utiliza antibióticos para tratamento de mastite clínica?	Sim	14 (85,5)	23 (95,8)	23 (100,0)	0,079
	Não	1 (12,5)	1 (4,2)	0 (0,0)	
Qual o tratamento para a mastite que o(a) sr(a) realiza?	Antibiótico IMM ³ / 1 a 3 dias	3 (20,0)	3 (13,1)	11 (50,0)	0,057
	Antibiótico IMM até curar	2 (13,3)	1 (4,3)	1 (4,5)	
	Antibiótico IMM + sistêmico	10 (66,7)	17 (73,9)	10 (43,5)	
	Somente sistêmico	0 (0,0)	2 (8,7)	0 (0,0)	
É realizado tratamento de mastite com antiinflamatórios?	Não	4 (25,0)	6 (25,0)	7 (30,4)	0,847
	Só para mastite grave	11 (68,7)	13 (54,1)	12 (52,17)	
	Todos com mastite	1 (6,3)	5 (20,8)	4 (17,4)	
Faz tratamento de vacas secas?	Sim	14 (87,5)	21 (87,5)	18 (78,3)	0,401
	Não	2 (12,5)	3 (12,5)	5 (21,7)	
Faz CMT?	Sim	11 (68,7)	11 (45,8)	8 (34,8)	0,042
	Não	5 (31,3)	13 (54,2)	15 (65,2)	
Faz CCS individual dos animais?	Sim	4 (25,0)	11 (45,8)	5 (21,7)	0,673
	Não	12 (75,0)	13 (54,2)	18 (78,3)	
Já fez cultura para diagnóstico do agente causador de mastite?	Sim	4 (25,0)	7 (29,2)	6 (26,1)	0,968
	Não	12 (75)	17 (70,8)	17 (73,9)	
Descarte de animais por mastite?	Sim	11 (68,7)	22 (91,7)	15 (65,2)	0,615
	Não	5 (31,3)	2 (8,3)	8 (34,8)	
Já utilizou algum tipo de vacina para mastite?	Sim	5 (31,3)	4 (17,4)	4 (17,4)	0,331
	Não	11 (68,7)	19 (82,6)	19 (82,6)	
Segregação de animais em lotes com mastite clínica e subclínica?	Sim	4 (25,0)	9 (37,5)	5 (21,7)	0,722
	Não	12 (75,0)	15 (62,5)	18 (78,3)	

Dos rebanhos avaliados, 55% faziam anotações sobre os casos de mastite e 61,9% anotavam também os protocolos utilizados. No tratamento da mastite, 95,2% dos rebanhos utilizavam antibióticos, sendo que 28,3% utilizavam a via intramamária para aplicação durante 1 a 3 dias; 6,7% a via intramamária até o animal não apresentar mais grumos no leite (outro sintoma de mastite); 61,7% utilizavam antibióticos intramamários e sistêmicos combinados; 3,3% utilizavam somente o antibiótico sistêmico. O tratamento com anti-inflamatório para mastite sempre era realizado (para todos os casos de mastite) em 15,9% dos rebanhos; 27% não utilizavam este tipo de medicamento e a maioria (57,1%) só utilizava em casos graves. Entre as práticas adotadas na prevenção e controle da mastite nos rebanhos avaliados, as mais utilizadas foram o tratamento das vacas secas (84,1%) e o descarte de animais por mastite (76,2%), seguidos pelo uso de vacinas contra mastite (20,6%) e pela segregação dos animais em lotes com mastite clínica e subclínica (20,6%). Dentre as práticas utilizadas na identificação de animais com mastite, 31,7% dos rebanhos faziam uso da CCS individual e 27% já haviam utilizado a identificação microbiológica para identificação do patógeno.

Os resultados da caracterização dos conhecimentos sobre mastite estão apresentados na tabela 11. Não houve efeito da CCS do leite de tanque no conhecimento sobre mastite. Apenas 8 (12,7%) dos entrevistados responderam que não sabem o que é mastite; 48 (76,2%) responderam que é a infecção ou inflamação da glândula mamária; 3 (4,8%) que são problemas no úbere da vaca; e 4 (6,3%) deram outras respostas. Todos os entrevistados responderam que vacas com mastite sentem dor. A maioria dos entrevistados (77,8%) respondeu que mastite subclínica é aquela sem alteração visível no leite e, mais da metade (65,%), que a CCS é indicativo de mastite subclínica. Quarenta e sete entrevistados (74,6%) associaram a falta de higiene à causa mais provável de mastite; 3 (4,7%) à higiene na sala e equipamentos de ordenha; 2 (3,2%) à falta de alimentação; 6 (9,5%) à outros problemas e 5 (7,9%) não souberam responder.

Tabela 11 - Conhecimento com relação à mastite dos entrevistados nos grupos baixa, média e alta CCS

Questão	Resposta (categoria)	CCS do tanque (10 ³ céls/mL)			P
		< 250 n (%)	250 ≤ 400 n (%)	> 400 n (%)	
O que é Mastite?	Infecção ou inflamação da glândula mamária	13 (81,3)	16 (66,7)	19 (82,6)	0,924
	Problemas no úbere	1 (6,3)	2 (8,3)	0 (0,0)	
	Não sei	1 (6,3)	5 (20,8)	2 (8,7)	
	Outras respostas	1 (6,3)	1 (4,2)	2 (8,7)	
Vacas com mastite sentem dor?	Sim	16 (100,0)	24 (100,0)	23 (100,0)	-
	Não	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
O(a) sr(a) sabe o que é mastite subclínica?	Mastite que não causa alteração visível no leite	13 (81,3)	20 (83,3)	16 (69,6)	0,429
	Outras respostas	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,3)	
	Não sei	3 (18,7)	4 (16,7)	6 (26,1)	
O que é “Contagem de Células Somáticas”?	Indicativo de mastite subclínica	10 (62,5)	18 (75,0)	13 (56,5)	0,781
	Outras respostas	1 (6,3)	0 (0,0)	3 (13,1)	
	Não sei	5 (31,3)	6 (25,0)	7 (30,4)	
O(a) sr(a) saberia dizer quais as causas mais prováveis de mastite na sua propriedade ou em geral?	Falta de Alimentação	0 (0,0)	1 (4,2)	1 (4,3)	0,412
	Higiene geral	10 (62,5)	20 (83,3)	17 (73,9)	
	Higiene na sala e equipamentos de ordenha	1 (6,3)	1 (4,2)	1 (4,3)	
	Não sabe	3 (18,7)	1 (4,2)	1 (4,4)	
	Outros	2 (12,5)	1 (4,2)	3 (13,1)	

Na avaliação dos conhecimentos sobre contaminação bacteriana, qualidade do leite e legislação (Tabela 12) houve maior frequência ($P < 0,013$) de respostas positivas sobre o conhecimento dos limites legais de contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em rebanhos com alta CCS (56,5%), quando comparados com rebanhos com média (29,2%) e baixa CCS (18,7%). Não houve diferença na frequência das respostas obtidas nos três grupos de CCS avaliados quanto aos questionamentos sobre as causas de contaminação, participação em treinamentos sobre mastite e qualidade do leite e a opinião sobre a quem interessa a qualidade do leite. Sobre a contaminação bacteriana do leite, 54 (85,7%) entrevistados responderam que é a quantidade de bactérias no leite e 8 (12,7%) não souberam responder.

Em 44 (73,3 %) dos rebanhos a contaminação bacteriana foi associada à higiene geral, 3 (5%) aos animais doentes, 7 (8,3%) à ordenha manual, 2 (3,3%) tanto a higiene geral quanto a animais doentes e em 6 (10%) dos entrevistados não souberam responder. Com relação ao questionamento sobre quem eram os maiores interessados na qualidade do leite, dois entrevistados (3,4%) responderam que eram os produtores, três responderam que eram os laticínios (5,1%), 11 (18,7%) responderam que eram os consumidores, 21 (35,6%) responderam que eram tanto os produtores quanto laticínios e consumidores e, 22 (37,3%) responderam que eram os produtores, laticínios, consumidores e o governo. Vinte e cinco (39,7%) dos entrevistados participaram de treinamentos sobre mastite e qualidade do leite.

Tabela 12 - Conhecimento com relação à contaminação bacteriana e legislação, opinião sobre qualidade do leite e capacitação dos entrevistados nos grupos baixa, média e alta CCS

Questão	Resposta	CCS do tanque (10^3 céls/mL)			P
		< 250 n (%)	$250 \leq 400$ n (%)	> 400 n (%)	
O(a) sr(a) sabe o que é “Contaminação Bacteriana”?	Quantidade de bactérias no leite	14 (87,5)	20 (83,3)	20 (87,0)	0,791
	Outras respostas	1 (6,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	
	Não sei	1 (6,3)	4 (16,7)	3 (13,0)	
O(a) sr(a) saberia dizer quais as causas da contaminação bacteriana? ¹	Higiene geral	13 (81,3)	16 (69,6)	15 (71,4)	0,674
	Animais doentes	0 (0,0)	2 (8,7)	1 (4,8)	
	Ordenha manual	2 (12,5)	1 (4,3)	2 (9,5)	
	Higiene geral e animais doentes	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (9,5)	
	Não sabe	1 (6,3)	4 (17,4)	1 (4,8)	
O(a) sr(a) considera que a qualidade do leite é importante para quem? ²	Produtores	1 (6,3)	0 (0,0)	1 (4,6)	0,863
	Laticínios	1 (6,3)	0 (0,0)	2 (9,1)	
	Consumidores	4 (25,0)	3 (14,3)	4 (18,2)	
	Produtores, laticínios, consumidores	5 (31,3)	9 (42,9)	7 (31,8)	
	Produtores, laticínios, consumidores e governo	5 (31,3)	9 (42,9)	8 (36,4)	
Participou de algum treinamento/capacitação sobre mastite ou qualidade do leite?	Sim	5 (31,2)	10 (41,7)	10 (43,5)	0,466
	Não	11 (68,3)	14 (58,3)	13 (56,5)	
Conhece as exigências legais de contagem de células somáticas e contagem bacteriana total do leite?	Sim	3 (18,7)	7 (29,2)	13 (56,5)	0,013
	Não	13 (81,3)	17 (70,8)	10 (43,5)	

¹Três produtores com múltiplas respostas foram excluídos da análise;²Quatro produtores com múltiplas respostas foram excluídos da análise.

A CCS foi significativamente correlacionada com a CBT ($P < 0,001$), CIP ($P < 0,001$), CC ($P < 0,001$) e CLP ($P < 0,001$). As correlações da CCS com os parâmetros de qualidade higiênica do leite foram, em ordem decrescente de valor absoluto: para a CBT ($r = 0,310$), CLP ($r = 0,305$) CC ($r = 0,232$) e CIP ($r = 0,215$).

4.4 Discussão

A mastite é uma doença de causa multifatorial que aumenta a CCS, um dos principais critérios de qualidade do leite. No entanto, a análise quantitativa das principais práticas de manejo não explica completamente a variação na incidência desta doença entre rebanhos (BARKEMA et al., 1999). No presente estudo, houve associação entre a ordem de importância do leite como atividade econômica na propriedade, o tipo de ordenha utilizado na propriedade, o conhecimento sobre as exigências legais de CCS e CBT, o uso de métodos para detecção de mastite e a CCS, além disso, houve correlação positiva entre a CCS, a CBT, a CIP e a CC.

Neste estudo, a maior parte dos produtores com $CCS \leq 250 \times 10^3$ céls/mL (86,7%) e entre 250 e 400×10^3 céls/mL (87,5%) tinham a pecuária leiteira como principal atividade remunerada na propriedade, contra 47,6% dos produtores com $CCS > 400 \times 10^3$ céls/mL. Além disso, o leite tendeu ($P = 0,067$) a ser a principal atividade econômica para 81,2% dos entrevistados com $CCS \leq 250 \times 10^3$ céls/mL e 83,3% dos entrevistados do grupo com CCS até entre 250 e 400×10^3 céls/mL, e apenas 47,8% dos entrevistados do grupo com $CCS > 400 \times 10^3$ céls/mL. Estes resultados diferem dos encontrados por Oinara et al. (2009), que avaliaram 54 produtores quanto às percepções de qualidade, tomando como base os padrões da Instrução Normativa 51 do MAPA, e verificaram que a produção de leite foi a principal atividade em apenas 11,1% das propriedades estudadas. Para estes autores, apesar da ausência de avaliações dos critérios de qualidade do leite (principalmente CCS e CBT), o fato da produção de leite não ser a principal atividade na propriedade faz com que os produtores dediquem maior parte do seu tempo a outros afazeres e deixem de realizar práticas simples que não envolvem grande dispêndio de tempo e dinheiro, como hábitos de higiene pessoal e a eliminação dos primeiros jatos de leite. De certa forma, em propriedades onde a produção de leite foi a atividade principal houve maior preocupação com práticas capazes de reduzir a CCS, principalmente pelo fato destas propriedades receberem bonificação pela baixa CCS. Segundo Botaro et al. (2013) existe associação entre a adoção de programas de pagamento por qualidade do leite e a redução tanto da CCS quanto da CBT no leite de tanque e, ainda, que a implantação de um programa de qualidade tem a capacidade de motivar produtores de leite a implantar práticas de gestão e controle de mastite.

Em 95% dos rebanhos avaliados no presente estudo era utilizada a ordenha mecanizada. Por outro lado, Souza et al. (2005) ao avaliarem fatores de risco para a alta CCS

descreveram apenas metade dos rebanhos com ordenha mecanizada, na Zona da Mata Mineira. Barbosa et al. (2009) avaliaram a ocorrência de mastite em vacas submetidas a diferentes tipos de ordenha e descreveram 71% dos rebanhos com ordenha manual, na região do triângulo Mineiro. No presente estudo, todos os rebanhos com ordenha manual apresentaram CCS abaixo de 400×10^3 céls/mL, resultados que corroboram com os descritos por Barbosa et al. (2009) que observaram efeito do tipo de ordenha sobre a incidência de mastite. Por estar em contato direto com os tetos da vaca no momento de extração do leite, o equipamento de ordenha pode ser um fator de risco em potencial para a ocorrência de novas infecções intramamárias e este risco aumenta com deficiências na manutenção e inadequado uso destes equipamentos (MEIN et al., 2004).

Outro fator relacionado ao tipo de ordenha que pode ter efeito sobre a CCS é a ordenha com o bezerro ao pé da vaca. Segundo Barbosa et al. (2009), para vacas ordenhadas com bezerro ao pé, a mamada diminui a quantidade de leite residual após a ordenha e a incidência de mastite. Araújo et al. (2012) não verificaram diferença de CCS em vacas Gir sendo estimuladas pela presença do bezerro ao pé da vaca e vacas pela administração de ocitocina exógena. No presente estudo, 11% de todos os rebanhos com sistemas de ordenha mecanizados, utilizavam o bezerro ao pé da vaca para promover a descida do leite, destes produtores que ordenhavam com a presença do bezerro 6,5% tinham $CCS < 250 \times 10^3$ céls/mL, 3,6% CCS entre 250×10^3 céls/mL e 400×10^3 céls/mL e 1,5% CCS maior do que 400×10^3 céls/mL.

O CMT (California Mastitis Test), desenvolvido por Schalm et al. (1957), é um método para estimar de forma indireta a CCS do leite, cujo princípio consiste na interação de ácidos nucléicos com detergente lipolítico formando-se uma solução viscosa. No presente estudo, a frequência de uso do CMT foi 22,9% maior nos produtores com $CCS < 250 \times 10^3$ céls/mL que nos produtores com CCS entre 250×10^3 céls/mL e 400×10^3 céls/mL, e 33,9% maior do que nos rebanhos com CCS acima de 400×10^3 céls/mL. No entanto, não foram observadas diferenças para o teste de CCS individual direto (por citometria de fluxo) entre os três grupos de CCS avaliados. Tanto o CMT quanto a CCS determinada por equipamentos eletrônicos são utilizados para detecção da mastite subclínica, porém, o CMT é um método indireto que tem a facilidade de ser realizado ao pé da vaca, é prático, tem baixo custo e resultado imediato. Por outro lado, a CCS tem maior custo e, devido à necessidade de envio das amostras ao laboratório, o resultado não é imediato. Independentemente do método de diagnóstico de mastite subclínica utilizado, os resultados do presente estudo indicam que a falta de diagnóstico acarreta aumento na CCS no leite de tanque. Estes resultados diferem dos

observados por Oliveira et al. (2011) que descreveram apenas 2% dos rebanhos com o uso de CMT, e não observaram efeito da frequência do uso de CMT sobre a CCS do tanque, ao avaliar 50 rebanhos leiteiros com produção de leite até 500L, na Paraíba. Nero et al. (2009), avaliaram a associação entre práticas de manejo com a qualidade higiênica do leite, e relataram que 68,3% dos rebanhos não realizavam o CMT como teste de triagem para a detecção de mastite subclínica. A utilização do CMT permite a detecção da mastite subclínica, o que é fundamental para a tomada de decisões quanto a prevenção e o tratamento da mastite. Apesar disso, no presente estudo não houve diferença com relação às outras medidas de prevenção para esta doença, entre os três níveis de CCS avaliados.

O uso de antibióticos para o tratamento de mastite clínica tendeu ($P = 0,079$) a ser maior no grupo de rebanhos com alta CCS. A mastite é uma doença causada por diferentes micro-organismos e, por este motivo, apresenta difícil controle (OLIVER; MURINDA, 2012). A mastite clínica é caracterizada pela presença de grumos ou secreções anormais no leite com ou sem sintomas de inflamação local ou sistêmica (BARLOW, 2011). O leite anormal não pode ser comercializado, desta forma, o tratamento com antibióticos deve ser realizado imediatamente após o aparecimento dos sintomas, com os objetivos de reduzir ou eliminar os sinais clínicos. Outro objetivo do tratamento da mastite é obter a cura bacteriológica, ou seja, a eliminação do patógeno do quarto mamário infectado após o tratamento (PINZÓN-SANCHEZ; RUEGG, 2011). No Brasil, Souza et al. (2005) observaram que o tratamento de casos clínicos de mastite foi o único procedimento realizado em praticamente todos (97,7%) os rebanhos avaliados na Zona da Mata Mineira. Os dados do presente estudo corroboram com os de Souza et al. (2005), pois o tratamento de casos clínicos com antibióticos foi utilizado em 96% de todos os produtores avaliados.

Em rebanhos que utilizavam tratamento para a mastite clínica, houve tendência ($P = 0,057$) de maior uso de tratamento de antibióticos intramamários nos rebanhos com maior CCS ($>400 \times 10^3$ céls/mL), e maior uso de antibióticos intramamários e sistêmicos associados nos rebanhos com menor CCS ($\leq 250 \times 10^3$ céls/mL). A maioria dos tratamentos para mastite clínica é realizado com antibióticos intramamários, antibióticos sistêmicos e anti-inflamatórios (BARLOW, 2011). As decisões sobre quais protocolos de tratamento utilizar são frequentemente baseadas na gravidade da mastite, ou sintomas apresentados. Sendo assim, antibióticos intramamários são indicados para casos de mastite leves ou moderados, antibióticos sistêmicos para casos graves e, quanto aos anti-inflamatórios, seus efeitos ainda não estão bem estabelecidos quanto a casos leves e moderados, mas deve ser utilizado em casos graves (ROBERSON, 2012). No presente estudo 66,7% dos rebanhos com baixa CCS e

73,9% do grupo de média CCS utilizaram antibióticos intramamários associados a antibióticos sistêmicos, em contrapartida apenas 43,5% dos rebanhos utilizaram este tipo de tratamento em rebanhos com alta CCS.

Com relação ao conhecimento sobre os limites legais dos principais critérios de qualidade do leite, foi observado maior frequência de entrevistados com conhecimento das exigências para CCS e CBT nos rebanhos com CCS $>400 \times 10^3$ céls/mL, sendo seguidos pelos rebanhos com CCS entre 250 e 400×10^3 céls/mL e, na sequência, pelos com CCS $<250 \times 10^3$ céls/mL. Um fator que pode ter colaborado para a maior busca de conhecimentos sobre os limites legislativos de CCS e CBT, por parte dos responsáveis pelos rebanhos com maior CCS, foi a penalização recebida pelo leite entregue com CCS acima de 600.000 céls/mL, limite que coincide com o da atual legislação vigente na região estudada. Contudo, o conhecimento sobre exigências legais não garante que medidas sejam tomadas para reduzir a CCS. Além disso, a penalização recebida pelo litro de leite entregue com CCS acima de 600.000 céls/mL (CCS entre 600.000 e 750.000 céls/mL - R\$ 0,010 /L e acima de 750.001 céls/mL - R\$ 0,020 /L), possivelmente não foi suficiente para estimular os responsáveis pelos rebanhos a implantar medidas para reduzir a CCS.

No presente estudo, não foi observada associação entre o nível de CCS do rebanho e os conhecimentos sobre mastite e contaminação bacteriana. As variações de CCS entre os rebanhos avaliados podem não estar associadas à execução de uma tarefa ou ao conhecimento sobre o controle da mastite, mas sim em como executar estas tarefas e aplicar este conhecimento. Produtores que tem o leite como principal atividade, podem dedicar mais tempo tanto na execução quanto no monitoramento de medidas de controle da mastite, e isso faz com que este grupo de produtores tenha maior eficácia destas medidas o que resulta em CCS reduzida.

Tanto a CBT quanto a CIP, a CLP e a CC foram maiores para os rebanhos com CCS acima de 400×10^3 céls/mL. Houve correlação positiva entre a CCS e as análises de qualidade higiênica do leite (CBT, CIP, CLP e CC). Estes resultados corroboram com os de Rysanek et al. (2005) que observaram baixa correlação da CCS com CBT e a CC em leite de tanque. Jayarao et al. (2004) também descreveram baixa correlação entre CCS e outras análises microbiológicas (CIP, CLP, CC, estreptococos ambientais, contagem de *Staphylococcus coagulase negativos*) do leite cru. Ao analisar o leite de quartos mamários, Souto et al. (2008) não encontraram correlação entre casos de mastite (diagnosticados pelo California Mastitis Test), a CBT, a CC, bactérias psicotróficas e termófilas. Segundo Rysanek et al. (2005), a CCS do leite de tanque não é um bom indicador da condição higiênica do leite.

Os resultados do presente estudo indicam que a aplicação de práticas, como segregação e descarte de animais e o tratamento de vacas secas, não foi a principal causa de variação de CCS entre os rebanhos avaliados, mas que outros fatores, como a ordem de importância do leite como atividade remunerada na propriedade, o tipo de ordenha utilizado na propriedade, o uso de métodos para detecção de mastite e o conhecimento das exigências legais de CCS e CBT tiveram associação com a CCS do leite de tanque.

4.5 Conclusão

Os fatores associados à CCS foram a ordem de importância do leite como atividade econômica na propriedade, a utilização de ordenha mecanizada e a realização de testes para diagnóstico de mastite subclínica. Além disso, em rebanhos com CCS $> 400 \times 10^3$ céls/mL eram conhecidos os limites legais tanto de CCS quanto de CBT. A qualidade higiênica do leite, avaliada pela CBT, CIP, CLP e CC, tem correlação positiva com a CCS do leite de tanque de rebanhos leiteiros.

5 ASSOCIAÇÃO ENTRE PATÓGENOS CAUSADORES DE MASTITE, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS E CONTAGEM BACTERIANA TOTAL EM REBANHOS LEITEIROS

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação entre a contagem de patógenos causadores de mastite, a contagem bacteriana total (CBT) e a contagem de células somáticas (CCS) de rebanhos leiteiros. De um total de 454 rebanhos de leite, localizados no Sul de Minas Gerais e Oeste de São Paulo, foram selecionados 90 com base na CCS (média geométrica) de 10 amostras de leite coletadas a cada 6 dias, os quais foram classificados em 3 grupos de acordo com a CCS: a) ≤ 250.000 céls/mL ($n = 30$); b) $>250.000 \leq 600.000$ céls/mL ($n = 30$); c) >600.000 céls/mL ($n = 30$). Após a seleção, foram coletadas 6 amostras do leite de tanque (a cada 15 dias) dos 90 rebanhos para as análises de: CCS, CBT, contagem de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), contagem de *Streptococcus agalactiae* (*agalactiae*), contagem de estafilococos coagulase negativos (ECN), contagem de estreptococos ambientais e contagem de *Escherichia coli* (*E. coli*). Todos os produtores apresentaram isolamento de *S. aureus*, ECN e estreptococos ambientais, enquanto que apenas 41,8% dos produtores apresentaram isolamento de *agalactiae* e 88,6% isolamento de *E. coli*. Não houve efeito do nível de CCS no tanque sobre as contagens de *S. aureus* e *E. coli*. A contagem de ECN foi maior em rebanhos com CCS <250.000 céls/mL e a contagem de *agalactiae* foi maior em rebanhos com CCS acima de 600.000 céls/mL. Foi observada baixa correlação positiva entre a contagem de *S. aureus* e estreptococos ambientais tanto com a CCS quanto com a CBT. Foi observada baixa correlação negativa entre as contagens de ECN e CCS, e positiva moderada entre *agalactiae*, a CCS e a. Os resultados do presente estudo indicam que existe associação entre bactérias causadoras de mastite tanto com a CCS quanto com a CBT, no entanto, apenas o *agalactiae* contribui consideravelmente para o aumento da CCS.

Palavras-chave: Patógenos Causadores de Mastite. Contagem de Células Somáticas. Contagem Bacteriana Total.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the association between the mastitis pathogens count, total bacterial count (TBC) and somatic cells count (SCC) in dairy herds. From total of 454

dairy herds, located in southern Minas Gerais and west of São Paulo, 90 herds were selected based on the SCC of 10 milk samples collected during two consecutive months, to compose the following groups: a) $\leq 250,000$ cells / mL ($n = 30$), b) $>250,000 \leq 600,000$ cells / mL ($n = 30$), c) $> 600,000$ cells / mL ($n = 30$). After selection, six bulk tank milk samples were collected (every 15 days) for analyzes of: SCC, TBC, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) count, *Streptococcus agalactiae* (*agalactiae*) count, coagulase-negative staphylococci (CNS) count, environmental streptococci count and enumeration of *Escherichia coli* (*E. coli*). All herds had isolation of *S. aureus*, CNS and environmental streptococci, while only 41.8% of *agalactiae* and 88.6% of *E.coli* were isolated on these herds. There was no effect of bulk tank SCC on *S. aureus* and *E. coli* counts. The ECN count was higher in herds with $SCC < 250,000$ cells/mL, and *agalactiae* count was higher in herds with SCC above 600,000 cells/mL. It was a low positive correlation between *S. aureus* and environmental streptococci counts with SCC as with TBC. It was a low negative correlation between ECN count and SCC, and moderate positive correlation between *agalactiae* count and SCC. The results of this study indicate that there is an association between mastitis pathogens with SCC as with TBC, however, only the *agalactiae* contributes considerably to the increase SCC.

Keywords: Mastitis Pathogens. Somatic Cell Count. Total Bacterial Count.

5.1 Introdução

A qualidade do leite cru tem sido mundialmente avaliada por dois principais critérios: a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT). A CCS aumenta quando ocorre a invasão da glândula mamária por micro-organismos, o que resulta em desencadeamento de resposta imunológica, que culmina em processo inflamatório denominado mastite. O aumento da CCS depende da intensidade da resposta inflamatória que, por sua vez, é determinada pelo tipo de micro-organismo causador (BRADLEY, 2002). Durante os episódios de mastite, dependendo da etiologia, os patógenos causadores de mastite são eliminados no leite e podem representar fonte de contaminação do leite de tanque (RYSANEK et al., 2009b,a). Desta forma, as análises microbiológicas do leite são imprescindíveis no controle e tratamento de mastite.

Atualmente, o método de diagnóstico mais utilizado para identificação de micro-organismos causadores de mastite é a cultura microbiológica (BRITTEN, 2012). Em nível de rebanho, a melhor forma de se diagnosticar os agentes causadores de mastite é por cultura microbiológica de amostras coletadas de todos os quartos mamários individualmente (BRITO; BRITO, 1999). Contudo, neste procedimento um número elevado de amostras é analisado, o que eleva o custo do diagnóstico no rebanho. Outras duas alternativas são a coleta de amostras compostas por leite de todos os quartos de uma mesma vaca, e a coleta de leite do tanque que representa o leite total do rebanho (BRITO et al., 1998). A cultura do leite de tanque é uma boa opção para quantificar os principais micro-organismos causadores de mastite contagiosa no rebanho, como o *S. aureus* e o *agalactiae* (BRITO et al., 1998). A interpretação deste tipo de diagnóstico deve ser realizada em associação com outras informações como o manejo, a CCS e a CBT (JAYARAO; WOLFGANG, 2003).

A relação entre CCS, CBT e a contagem de agentes causadores de mastite no leite de tanque foi avaliada em alguns estudos (ZADOKS et al., 2004; RYSANEK et al., 2009b,a). Zadoks et al. (2004), ao avaliar o leite de rebanhos leiteiros no estado de Nova Iorque (EUA), identificaram alta associação entre a contagem de *Streptococcus* spp. e a CBT de rebanhos com CCS > 750.000 céls/mL. Rysanek et al. (2009b) identificaram maior CCS do leite de tanque com altas contagens de *agalactiae*, *S. aureus* e *Streptococcus dysgalactiae*, quando comparados com a CCS do leite com ausência destas bactérias. Jarayao et al. (2004) identificaram aumento de frequência de isolamento de *S.aureus* e *agalactiae* com o aumento de CCS no leite de tanque. Ainda que alguns estudos tenham relatado as associações entre CCS, CBT e contagem de micro-organismos causadores de mastite, a dinâmica populacional destes agentes varia com a região ou país estudado e até de acordo com limites regulatórios impostos (BARKEMA et al., 1998).

No Brasil, o *S. aureus* e o *agalactiae* foram identificados como os agentes causadores de mastite mais prevalentes nas regiões de Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e São Paulo, por meio de análises de amostras de vacas com mastite clínica e subclínica (CRUPE et al., 2008). Brito et. al (1998) avaliaram amostras de leite do tanque e de quartos mamários individuais de 33 rebanhos, localizados na Zona da Mata de Minas Gerais, e concluíram que que o exame microbiológico do leite do tanque pode ser empregado nas condições brasileiras para a monitorização de programas de controle de mastite e, que a alta incidência de *S. aureus* e *agalactiae* apontam para a necessidade de elaboração de políticas para o controle da mastite e de melhoria da qualidade higiênica do leite.

Devido à alta prevalência de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* nos rebanhos brasileiros, à estreita relação entre estas bactérias e a CCS, e a possível contribuição que estas bactérias possam conferir à CBT, o objetivo do presente estudo foi avaliar a associação entre patógenos causadores de mastite, a CBT e a CCS do leite de tanque de rebanhos leiteiros localizados no Sul de Minas Gerais e Oeste de São Paulo.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Seleção dos rebanhos leiteiros e análises laboratoriais

O presente estudo foi realizado em rebanhos leiteiros fornecedores de um laticínio, conforme descrito no item 3.2.1. De um total de 454 rebanhos, foram selecionados 90 com base na CCS (média geométrica) de 10 amostras de leite coletadas durante os meses de junho e julho de 2012 (a cada seis dias), para compor 3 grupos: a) $\leq 250 \times 10^3$ céls/mL ($n = 30$); b) $>250 \times 10^3 \leq 600 \times 10^3$ céls/mL ($n = 30$); c) $>600 \times 10^3$ céls/mL ($n = 30$).

Após o período de seleção dos rebanhos, amostras do leite de tanque foram coletadas (segundo metodologia descrita no item 3.2.1), a cada 15 dias por um período de 3 meses (agosto a novembro de 2012), para as análises de contagem de *S. aureus*, contagem de *agalactiae*, contagem de estafilococos coagulase-negativa (ECN), contagem de estreptococos ambientais, contagem de *Escherichia coli*, contagem de coliformes totais e CBT. Para a realização de análises de CCS a coleta foi realizada em frascos contendo conservante bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanodiol) e enviadas ao Laboratório de Fisiologia da Lactação da ESALQ – USP (Clínica do Leite), em um período máximo de cinco dias.

5.2.2 Análises microbiológicas do leite

As metodologias para determinação da CBT, da CCS e composição do leite foram descritas nos itens 3.2.2 e 3.2.3, respectivamente.

Para determinar a contagem de *Staphylococcus aureus* foram utilizados Petrifilm (3M™ Petrifilm™ STX S.aureus), com período de incubação de 24 horas (± 2 horas) a 37°C (± 1 °C), posterior aplicação de disco DNase (3M™ Disc) e incubação por mais duas horas, conforme descrito por McCarron et al. (2009). As contagens de coliformes e de *Escherichia coli* foram realizadas por semeadura da amostra em placas tipo Petrifilm (3M™ Petrifilm™ EC Count Coliform *E.coli*), conforme metodologia descrita por Elmoslemany et al. (2009a). Para a CC, as placas Petrifilm foram incubadas por 24 horas (± 2 horas) a 37°C (± 1 °C), enquanto que para a contagem de *Escherichia coli* as placas foram incubadas por 48 horas (± 2 horas) a 37°C (± 1 °C). A leitura de todos os Petrifilms foi realizada com auxílio de contador de colônias manual.

Para contagem de estafilococos coagulase-negativa, a amostra foi semeada em agar Baird Parker's (JAYARAO et al., 2004), incubadas por 48 horas (± 2 horas) a 37°C (± 1 °C) e a leitura foi realizada no contador de colônias manual. Os diferentes tipos de colônias presentes na placa (negras e cinzas, com ou sem alo ao redor das colônias) foram contados e, após este procedimento, três colônias de cada tipo foram semeadas em ágar com 5% de sangue de carneiro, incubadas por 48hs a 37°C. Após este procedimento todas as colônias isoladas foram examinadas pela metodologia de coloração de Gram, produção de catalase, coagulase e manitol (JAYARAO et al., 2004).

Para a contagem de estreptococos foi utilizado o ágar Edward's modificado suplementado com sulfato de colistina e ácido oxolínico em período de incubação de 48 horas a 37°C. Os diferentes tipos de colônias presentes na placa (com hemólise ou sem hemólise, cinzas ou negras) foram contados e, três colônias de cada tipo foram selecionadas ao acaso e semeadas em ágar sangue de ovinos a 5% e incubadas a 37°C por 48 horas. Após este procedimento todas as colônias isoladas foram examinadas pela metodologia de coloração de Gram, produção de catalase, CAMP, esculina e hipurato (JAYARAO et al., 2004).

5.2.3 Análises estatísticas

Todos os resultados foram analisados pelo uso do programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2010). As análises estatísticas foram realizadas com base na média geométrica das contagens de *S. aureus*, *agalactiae*, ECN, estreptococos ambientais, *Escherichia coli*, coliformes totais, CBT e CCS de propriedades com no mínimo 3 resultados

para estas contagens. Para a análise dos resultados foi verificada a normalidade dos resíduos, pelo Teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE), e a homogeneidade das variâncias, pelo Teste F. Os resultados de todas as contagens bacterianas e da CCS foram convertidos para escala logarítmica.

Para uma análise estatística descritiva (PROC MEANS) e para a comparação de médias, os rebanhos selecionados foram organizados de acordo com a CCS (média geométrica) das 6 análises realizadas durante os meses de agosto à novembro para compor: até 250.000 céls/ml (25 rebanhos); b) entre 251.000 e 600.000 céls/ml (37 rebanhos); c) maior que 600.000 céls/ml (17 rebanhos). Uma comparação de médias foi obtida pela análise de variância (PROC ANOVA) e teste de média SCheffé, adotando-se nível de significância de 5%. Foram realizadas análises de correlação de Pearson (r) entre as contagens de *S. aureus*, *agalactiae*, ECN, estreptococos ambientais, *Escherichia coli*, coliformes totais, a CCS e a CBT (PROC CORR). A correlação foi considerada alta valores entre 0,7 a 1, moderada 0,3 a 0,7 e baixa 0,0 a 0,3 (BARBETTA, 2006).

5.3 Resultados

Devido à contaminação de algumas amostras (10) e ao fato de algumas propriedades selecionadas descontinuarem o fornecimento de leite para o laticínio vinculado ao estudo (11), das 90 rebanhos selecionados somente 79 foram utilizados nas análises estatísticas. Na tabela 13 estão descritos os valores médios das contagens de patógenos causadores de mastite (*S. aureus*, *agalactiae*, ECN, estreptococos ambientais, *E. coli*) e CBT, assim como o número de rebanhos com isolamento positivo destes micro-organismos, de acordo com a CCS. Todos os rebanhos apresentaram isolamento positivo de *S. aureus*, ECN e estreptococos ambientais, enquanto que apenas 41,8% apresentaram isolamento positivo de *agalactiae* e 88,6% de *E. coli*.

Tabela 13 - Estatística descritiva das contagens de patógenos causadores de mastite e da contagem bacteriana total de acordo com a CCS do leite de tanque

Patógenos causadores de mastite		CCS do tanque (10^3 céls/mL)		
		≤ 250 (n=25)	250>600 (n=37)	>600 (n=17)
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL)	Média ¹	209,6	498,1	302,6
	Mediana	60,0	115,0	180,0
	Desvio padrão	520,5	2318,3	412,5
	Rebanhos positivos	25	37	17
	Negativos	0	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i> (UFC/mL)	Média	20,6	336,6	13041,4
	Mediana	1,0	1,0	300,0
	Desvio padrão	169,5	1154,8	33020,1
	Rebanhos positivos	4	16	13
	Rebanhos negativos	21	21	4
Estafilococos coagulase negativos (UFC/mL)	Média	1909,5	3527,6	2460,7
	Mediana	400,0	400,0	100,0
	Desvio padrão	3745,1	10745,3	9327,1
	Rebanhos positivos	25	37	17
	Rebanhos negativos	0	0	0
Estreptococos ambientais (UFC/mL)	Média	2635,5	5590,6	14645,0
	Mediana	500,0	1300,0	1300,0
	Desvio padrão	2034,1	2468,0	2156,7
	Rebanhos positivos	25	37	17
	Rebanhos negativos	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> (UFC/mL)	Média	6,9	15,6	4,9
	Mediana	1,0	1,0	1,0
	Desvio padrão	40,1	97,1	15,4
	Rebanhos positivos	23	31	16
	Rebanhos negativos	2	6	1
Contagem bacteriana total (UFC/mL)	Média	71771,7	133083,2	173832,4
	Mediana	25000,0	28800,0	38400,0
	Desvio padrão	163641,1	400240,1	389614,5
	Rebanhos positivos	25	37	17
	Rebanhos negativos	0	0	0

¹Média aritmética.

A contagem de *S. aureus* foi maior em rebanhos com CCS $250 > 600 \times 10^3$ céls/mL e CCS $> 600 \times 10^3$ céls/mL, comparados com rebanhos de CCS $\leq 250 \times 10^3$ céls/mL (Tabela 14). Foi observada baixa correlação positiva entre *S. aureus* tanto com a CCS quanto com a CBT (Tabela 15).

Tabela 14 - Contagens de *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase-negativos (ECN), *Streptococcus agalactiae* e estreptococos ambientais, de acordo com a CCS do tanque de rebanhos leiteiros

Patógenos causadores de mastite (log UFC/mL)	CCS do tanque (10^3 céls/mL)			P
	≤ 250	$250 > 600$	> 600	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,53 ^b	1,94 ^a	1,92 ^a	<0,001
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,08 ^c	0,067 ^b	2,04 ^a	<0,001
ECN	2,30 ^a	2,08 ^a	1,59 ^b	0,005
Estreptococos ambientais	2,58 ^b	2,98 ^a	2,94 ^{ab}	0,007
<i>Escherichia coli</i>	0,19 ^a	0,29 ^a	0,26 ^a	0,305

A contagem de *agalactiae* foi maior ($P < 0,001$) em rebanhos com CCS $> 600 \times 10^3$ céls/mL, que os demais rebanhos com $\leq 250 \times 10^3$ céls/mL e $250 > 600 \times 10^3$ céls/mL. Além disso, a contagem de *agalactiae* foi maior em rebanhos com CCS $250 > 600 \times 10^3$ céls/mL do que em rebanhos com CCS $\leq 250 \times 10^3$ céls/mL. Houve moderada correlação positiva entre a contagem de *agalactiae* tanto com a CCS ($r = 0,49$), no entanto, com a CBT a correlação foi fraca ($r = 0,13$) (Figura 2).

Tabela 15 - Coeficientes de correlação de Pearson entre a CCS, a CBT e as contagens de patógenos causadores de mastite

	CCS ¹		CBT ²	
	Coeficiente de correlação (r)	P	Coeficiente de correlação (r)	P
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,23	<0,001	0,16	0,002
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,49	<0,001	0,13	0,014
ECN ³	-0,17	0,001	0,04	0,444
Estreptococos ambientais	0,15	0,003	0,28	<0,001
<i>Escherichia coli</i>	0,02	0,659	-0,09	0,570

¹Contagem de células somáticas; ²Contagem bacteriana total; ³Estafilococos coagulase negativos.

Figura 2 - Correlação entre as contagens (em unidades logarítmicas) de células somáticas (CCS) e de *Streptococcus agalactiae* ($R^2 = 0,24$)

A contagem de estafilococos coagulase negativos foi maior para rebanhos com CCS $\leq 250 \times 10^3$ céls/mL e CCS $250 > 600 \times 10^3$ céls/mL quando comparados com rebanhos com CCS $> 600 \times 10^3$ céls/mL. Desta forma, a contagem deste micro-organismo foi semelhante tanto entre os grupos com menor CCS ($\leq 250 \times 10^3$ céls/mL) e CCS intermediária ($250 > 600 \times 10^3$ céls/mL). Houve baixa correlação negativa entre a contagem de ECN e a CCS, mas não foi observada correlação entre a contagem de ECN e a CBT.

Foi observada maior contagem de estreptococos ambientais em rebanhos com CCS $250 > 600 \times 10^3$ céls/mL, comparados com o grupo de CCS $\leq 250 \times 10^3$ céls/mL. A contagem de estreptococos ambientais foi semelhante entre rebanhos com CCS $250 > 600 \times 10^3$ céls/mL e CCS $> 600 \times 10^3$ céls/mL. Houve baixa correlação positiva entre a contagem de estreptococos ambientais, tanto com a CCS quanto com a CBT (Tabela 15). A contagem de *E. coli* foi semelhante entre os rebanhos avaliados, e não houve correlação entre a contagem da *E. coli* e a CCS ou a CBT.

5.4 Discussão

Para avaliar a associação entre patógenos causadores de mastite, a CBT e a CCS, foram realizadas contagens de *S. aureus*, *agalactiae*, ECN, estreptococcus ambientais e *E. coli* de rebanhos com CCS $\leq 250 \times 10^3$ céls/mL, $250 > 600 \times 10^3$ céls/mL e $> 600 \times 10^3$ céls/mL. Foi observada moderada correlação entre a contagem de *Streptococcus agalactiae* e a CCS.

No presente estudo, houve isolamento de *S. aureus* em todas as amostras do leite de tanque de todos os rebanhos analisados. Estes resultados não corroboram com os de Oliveira et al. (2011), que descreveram a presença de *S. aureus* em apenas 66% dos rebanhos analisados em estudo com 50 rebanhos leiteiros no estado da Paraíba. Além disso, no presente estudo a contagem média do *S. aureus* foi de 368,8 UFC/mL, muito inferior a contagem média de 7.100 UFC/mL, em amostras com CCS entre 43×10^3 céls/mL e 6.180×10^3 céls/mL, descrito por Oliveira et al. (2011). Arcuri et al. (2006), no Sudeste de Minas Gerais e Norte do Rio de Janeiro, pelo uso de três análises consecutivas para detecção de *S. aureus*, descreveram 91,5% dos rebanhos com isolamento positivo para *S. aureus*.

Staphylococcus aureus são os principais micro-organismos causadores de mastite no Brasil e no mundo (SOUTO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011). Neste estudo, foi observada correlação positiva baixa ($r = 0,23$) entre a contagem de *S. aureus* e a CCS, além disso, a contagem de *S. aureus* dos rebanhos com CCS $250 > 600 \times 10^3$ céls/mL e $> 600 \times 10^3$ foram maiores do que as dos rebanhos com CCS $\leq 250 \times 10^3$ céls/mL. De forma contrária, em estudos anteriores realizados por Jayarao et al. (2004); Olde Riekerink et al., (2006) e Rysanek et al. (2009b) não foram observadas correlações entre a contagem de *S. aureus* e a CCS (RYSANEK et al., 2009b; OLIVEIRA et al., 2011).

Streptococcus agalactiae foi isolado em 33 (41,8%) dos 79 rebanhos analisados, em pelo menos uma das 6 amostras coletadas. A alta frequência de isolamento de *agalactiae* foi descrita também por Arcuri et al. (2006), que observaram o isolamento deste micro-organismo em 50% dos rebanhos, com a análise de três amostras do leite de tanque por rebanho. Por outro lado, *agalactiae* foi isolado em apenas 34% dos 200 rebanhos avaliados no estado de Nova Iorque (ZADOKS et al., 2004) e em 10% dos rebanhos avaliados no estado da Pensilvânia (EUA) (JAYARAO et al., 2004). No presente estudo, *agalactiae* foi isolado em todos os níveis de CCS analisados, no entanto, a frequência de isolamento deste micro-organismo foi maior em rebanhos com CCS $> 250 \times 10^3$ céls/mL. Da mesma forma, Rysanek et al. (2009b) observaram aumento de frequência de isolamento de *agalactiae* em rebanhos com

CCS acima de 200×10^3 céls/mL, porém, estes autores descrevem ausência de correlação entre a contagem de *agalactiae* e a CCS. De forma diferente ao que foi descrito por Rysanek et al. (2009b), no presente estudo foi observado moderada correlação entre a CCS e a contagem de *agalactiae*, sendo que a contagem desta bactéria foi maior em rebanhos com $CCS > 600 \times 10^3$ céls/mL. Jayarao et al. (2004) descreveram baixa correlação entre as contagens de *agalactiae* e CCS. Segundo Keefe (1997), *agalactiae* são micro-organismos que causam grande aumento na CCS de vacas leiteiras e, conseqüentemente, no leite de tanque.

Neste estudo, a correlação entre a CBT e a contagem de *agalactiae* foi fraca e com coeficiente de determinação muito inferior ($R^2 = 0,017$) ao observado na correlação entre CCS e *agalactiae* ($R^2 = 0,29$). Segundo Zadoks et al. (2004), a correlação entre *agalactiae* e CBT varia de acordo com o rebanho estudado, e esta variação é atribuída à diferenças na quantidade de *agalactiae* liberada no leite, entre vacas. *Streptococcus agalactiae* são micro-organismos sem capacidade de se multiplicar em superfícies com acúmulo de matéria orgânica, como equipamentos de ordenha mal higienizados, ou em condições de deficiência no resfriamento do leite, por outro lado, têm alta capacidade de multiplicação na glândula mamária (RYSANEK et al., 2007). No estágio inicial de infecção por *agalactiae*, uma vaca pode eliminar mais de 100×10^6 bactérias/mL e, no leite de tanque, estas bactérias resultou em aumento da CBT (KEEFE, 1997).

Ao contrário dos micro-organismos contagiosos como o *S. aureus* e *Strep. agalactiae*, cuja presença no leite de tanque se deve exclusivamente à ocorrência de quartos mamários infectados em vacas dentro do rebanho, os ECN podem ser provenientes tanto de infecções intramamárias quanto da microbiota da pele dos tetos (NMC, 2005). No presente estudo, houve maior contagem de ECN em rebanhos com $CCS \leq 250 \times 10^3$ céls/mL e $CCS > 600 \times 10^3$. Segundo o National Mastitis Council (NMC, 2005), ECN causam pequeno aumento da CCS (até 300.000 céls/mL) em vacas com infecção intramamária. Diferentemente do observado no presente estudo, Jayarao et al. (2004) descreveram que a contagem de ECN média foi associada ao aumento de CCS e que amostras de leite de tanque com CCS acima de 200×10^3 céls/mL têm cinco vezes mais chances de ter ECN acima de 500 UFC/mL, do que amostras com CCS abaixo de 200×10^3 céls/mL. A maior contagem de ECN em rebanhos com $CCS \leq 250 \times 10^3$ céls/mL e $CCS > 600 \times 10^3$, no presente estudo, resultou em baixa correlação negativa entre a CCS e a contagem de ECN.

Estreptococos ambientais são todas as bactérias do gênero *Streptococci*, como por exemplo, *uberis*, *dysgalactiae*, *bovis*, com exceção do *agalactiae* (SANTOS et al., 2007). Os estreptococos ambientais têm como origem infecções intramamárias e material orgânico,

proveniente de água contaminada, esterco, solo e material proveniente da cama das vacas (JAYARAO; WOLFGANG, 2003). De forma geral, a contagem de estreptococos ambientais pode ser elevada, acima de 1.000 UFC/mL, devido principalmente ao manejo de ordenha deficiente, limpeza de equipamentos e refrigeração do leite inadequados (NMC, 2005). No presente estudo, a média da contagem de estreptococos ambientais foi maior do que 1.000 UFC/mL em todos os níveis de CCS avaliados, o que pode ser indicativo de manejo de ordenha e limpeza deficientes. Neste estudo, houve baixa correlação tanto da CCS quanto da CBT com a contagem de estreptococos ambientais, de forma contrária ao que foi descrito por Jarayao et al. (2004), que não observaram correlação entre estas contagens.

Escherichia coli pertence ao grupo de bactérias Gram negativas denominadas coliformes. Estes micro-organismos ambientais são de origem fecal e podem ser frequentemente encontrados em análises de leite de tanque. Segundo Hayes et al. (2001), infecções intramamárias por *E. coli* poderiam contribuir consideravelmente para o aumento na CBT do leite de tanque, devido à grande eliminação (10^8 UFC/mL) desta bactéria durante episódios de mastite. No entanto, a mastite causada por *E. coli* produz sinais clínicos, o que leva ao tratamento e ao descarte do leite (HAYES et al., 2001). Neste estudo não houve correlação tanto da CCS quanto da CBT com a contagem de *E.coli*.

No presente estudo, *S.aureus* foi isolado em todos os rebanhos avaliados e, apesar de ter apresentado baixa correlação com a CCS e a CBT, é um micro-organismo que deve ser monitorado e controlado, pois, causa infecções intramamárias com formação de tecido fibroso na glândula mamária, o que causa redução na produção potencial de leite (BARKEMA et al., 2006). O monitoramento de micro-organismos ambientais pode auxiliar na avaliação da eficiência do manejo de ordenha e limpeza de equipamentos, bem como indicar as principais fontes de contaminação do tanque (RYSANEK et al., 2007). Devido à moderada correlação entre *agalactiae* e a CCS, conclui-se que a presença deste patógeno reduz a qualidade do leite de tanque. Uma limitação do presente estudo foi o isolamento de *S. aureus*, ECN e estreptococos ambientais em todas as amostras impossibilitou a comparação de rebanhos com e sem isolamento entre rebanhos.

5.5 Conclusão

Rebanhos leiteiros com CCS de tanque acima de 250×10^3 céls/mL apresentam maiores contagem de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e estreptococos ambientais do que rebanhos com CCS inferior. Por outro lado, rebanhos com $CCS \leq 250 \times 10^3$ céls/mL apresentam maiores contagem de estafilococos coagulase negativos. A contagem de *agalactiae* apresenta moderada correlação com a CCS do leite de tanque.

6 CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos pelo conjunto de resultados dos estudos desenvolvidos na presente tese foi possível concluir que:

A alta quantidade de matéria orgânica na válvula de saída do tanque de expansão é o principal fator de risco para a baixa qualidade higiênica do leite cru, entre todos os pontos de avaliação da limpeza e todas as práticas de manejo avaliadas neste estudo. O uso de desinfetantes de tetos pré e pós-ordenha são práticas de manejo associadas à melhora na qualidade higiênica do leite de tanque (CBT, CIP e CC). A prática de ordenha com o bezerro ao pé da vaca está associada ao aumento nas contagens de CBT, CIP e CC, desta forma, é uma prática de manejo que reduz a qualidade do leite.

Além disso, outros fatores como a ordem de importância do leite como atividade econômica na propriedade, o tipo de ordenha utilizado na propriedade, o uso do CMT para detecção de mastite e o conhecimento das exigências legais de CCS e CBT estão associados à qualidade do leite produzido.

Altas contagens de *Streptococcus agalactiae* reduzem a qualidade do leite de tanque e, ainda, que este patógeno tem maior correlação com a CCS do que com a CBT.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, S.; CORL, C.; SORDILLO, L. Immunopathology of Mastitis: Insights into Disease Recognition and Resolution. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 291-304, 2011.
- ANN GRISSO, J. Making comparisons. **The Lancet**, v. 342, n. 8864, p. 157-160, 1993.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16. ed. Washington: APHA, 1992. 546 p.
- AJZEN, I. From intentions to actions: a theory of planned behavior. In: KUHL, J.; BECKMAN, J. (Ed.). **Action-control: from cognition to behavior**. Heidelberg: Springer, 1985. pt. 1, p. 11-39.
- ARAÚJO, W. A. G.; CARVALHO, C. G. V.; MARCONDES, M. I.; SACRAMENTO, J. R.; PAULINO, P. V. R. Ocitocina exógena e a presença do bezerro sobre a produção e qualidade do leite de vacas mestiças. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 6, p. 465-470, 2012.
- 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, p. 440-446, 2006.
- BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. E15-E19, 2006.
- BARBARÁ, A.; SACHETTI, V. A. R.; CREPALDI, M. A. Contribuições das representações sociais ao estudo da aids. **Interação em Psicologia**, v. 9, n. 2, p. 331-339, 2006.
- BARBETTA, P. A. **Estatística aplicada às ciências sociais**. 6. ed. Florianópolis: Editora UFSC, 2006. 315 p.
- BARBOSA, C. P.; BENEDETTI, E.; GUIMARÃ, E. C. Incidência de mastite em vacas submetidas a diferentes tipos de ordenha em fazendas leiteiras na região do Triângulo Mineiro. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 6, p. 121-128, 2009.
- BARKEMA, H. W.; PLOEG, J. D. V. D.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J. G. M.; BENEDICTUS, G.; BRAND, A. Management Style and Its Association with Bulk Milk Somatic Cell Count and Incidence Rate of Clinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 1655-1663, 1999.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J. G. M.; BEIBOER, M. L.; WILMINK, H.; BENEDICTUS, G.; BRAND, A. Incidence of Clinical Mastitis in Dairy Herds Grouped in Three Categories by Bulk Milk Somatic Cell Counts. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 411-419, 1998.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J. G. M.; BEIBOER, M. L.; BENEDICTUS, G.; BRAND, A. Management Practices Associated with the Incidence Rate of Clinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 8, p. 1643-1654, 1999b.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 1877-1895, 2006.

BARLOW, J. Mastitis Therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 383-407, 2011.

BARRIENTOS, A. A.; ARROYO, J.; CANTÓN, R.; NOMBELA, C.; SÁNCHEZ-PÉREZ, M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clinical Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 167-195, 2000.

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.

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

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 ago. 2002. Seção 1, p. 13

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Altera o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. Brasília, DF, 29 dez. 2011. Seção 1, p. 13

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. **Diagnóstico microbiológico da mastite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 1999. 26 p. (Circular Técnica, 55).

BRITO, M.; 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.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; VERNEQUE, R. S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Ciência Rural**, v. 30, n. 5, p. 847-850, 2000.

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

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M. D.; VARGAS, O. L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, 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.

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

CARNEIRO, M. Estudos epidemiológicos na avaliação de efetividade do Programa de Controle da Doença de Chagas: discussão metodológica. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, p. 129-141, 2002.

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A. Métodos de conservação de amostras de leite para determinação da contagem bacteriana total por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 434-439, 2010.

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F.; CARDOSO, F. Diagnóstico da qualidade do leite na região sudeste entre 2005 e 2008. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE: SEGURANÇA ALIMENTAR E SAÚDE PÚBLICA, 2008, Recife: **Anais...** CBQL: UFRPE, 2008. p. 45-51.

CHASE, L. E.; ELY, L. O.; HUTJENS, M. F. Major advances in extension education programs in dairy production. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1147-1154, 2006.

CONTRERAS, G. A.; RODRIGUEZ, J. M. Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 339-356, 2011.

COOK, N.B.; REINEMANN, D.J. A Tool Box for Assessing Cow, Udder and Teat Hygiene. In: NMC ANNUAL MEETING, 46., 2007. San Antonio, TX. **Proceedings...** National Mastitis Council, 2007.

CRUPPE, L. H.; HOE F.; FRANCO, F. Characteristics of mastitis agents in Brazilian dairy farms. In: NMC ANNUAL MEETING, 47., 2008. New Orleans, LA. **Proceedings...** National Mastitis Council, 2008. p. 218-219.

EDMONDSON, P. Practical use of bulk tank analysis for mastitis and milk quality problems. In: NMC ANNUAL MEETING, 44., 2005. Verona, WI. **Proceedings...** National Mastitis Council, 2005. p. 94-100.

ELMOSLEMANY, A. M.; KEEFE, G. P.; DOHOO, I. R.; DINGWELL, R. T. Microbiological quality of bulk tank raw milk in Prince Edward Island dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 9, p. 4239-4248, 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 1: Overall risk factors. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2634-2643, 2009b.

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, 2009c.

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.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1315-1320, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, F. D. A. **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins.** Center for Food Safety and Applied Nutrition. Maryland: Rockville, 1992. 5 p.

GODKIN, M. A.; LESLIE, K. E. Culture of bulk tank milk as a mastitis screening-test - A brief review. **Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne**, v. 34, n. 10, p. 601-605, 1993.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. D. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 216-222, 2005.

GUNASEKERA, T. S.; VEAL, D. A.; ATTFIELD, P. V. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 269-279, 2003.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts¹. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.

HOLM, C.; MATHIASSEN, T.; JESPERSEN, L. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 935-941, 2004.

HUIJPS, K.; HOGEVEEN, H.; LAM, T. J. G. M.; OUDE LANSINK, A. G. J. M. Costs and efficacy of management measures to improve udder health on Dutch dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, p. 115-124, 2010.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk**: enumeration of somatic cells. Brussels: IDF/FIL, 1991. 8 p. (IDF Standard, 148A)

JANSEN, J.; STEUTEN, C. D. M.; RENES, R. J.; AARTS, N.; LAM, T. J. G. M. Debunking the myth of the hard-to-reach farmer: Effective communication on udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 3, p. 1296-1306, 2010a.

JANSEN, J.; VAN DEN BORNE, B. H. P.; RENES, R. J.; VAN SCHAIK, G.; LAM, T. J. G. M.; LEEUWIS, C. Explaining mastitis incidence in Dutch dairy farming: The influence of farmers' attitudes and behaviour. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 92, n. 3, p. 210-223, 2009.

JANSEN, J.; VAN SCHAIK, 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, 2010b.

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.; 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.

JONES, G. M.; SUMNER, S. **Testing bulk tank milk samples**. Virginia: Virginia Cooperative Extension, Virginia Tech, 1999. Publication 404-405.

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

KEEFE, G. Techniques and technologies to measure milk quality. In: NMC ANNUAL MEETING, 48., 2009, Charlotte, NC. **Proceedings...** 2009. p. 66-73.

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.

LIMA-COSTA, M. F.; BARRETO, S. M. Tipos de estudos epidemiológicos: conceitos básicos e aplicações na área do envelhecimento. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 12, p. 189-201, 2003.

LOPES, J. E. F.; LANGE, C. C.; BRITO, M.; SANTOS, F. R.; SILVA, M. A. S.; DE MORAES, L. C. D.; DE SOUZA, G. N. Relationship between total bacteria counts and somatic cell counts from mammary quarters infected by mastitis pathogens. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, p. 691-696, 2012.

MACLEOD, C. J. A.; MORRIS, A. W. J.; SEMPLE, K. T. The role of microorganisms in ecological risk assessment of hydrophobic organic contaminants in soils. **Advances in Applied Microbiology**, v. 48, p. 171-212, 2001.

MARTINS, M. E. P.; NICOLAU, E. S.; MESQUITA, A. J.; NEVES, R. B. S.; ARRUDA, M. T. Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 9, p. 7, 2008.

MCCARRON, J. L.; KEEFE, G. P.; MCKENNA, S. L.; DOHOO, I. R.; POOLE, D. E. Evaluation of the University of Minnesota Tri-plate and 3M Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* species from clinically mastitic milk samples. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 5326-5333, 2009.

MCLEOD, M. Report into the current knowledge and awareness of mastitis in New Zealand by dairy farmers. In: SOCIETY OF DAIRY CATTLE VETERINARIANS OF THE NZVA; ANNUAL CONFERENCE, 2008. **Proceedings...** 2008. p. 171-175.

MEIN, G.; REINEMANN, D.; SCHURING, N.; OHNSTAD, I. Milking machines and mastitis risk: a storm in a teacup. In: NMC ANNUAL MEETING, 43., 2004, Charlotte, NC. **Proceedings...** 2004. p. 176-188.

MILK POINT. Programa Leite Legal capacitará 15 mil produtores às normas da IN 62. **Milk Point**, 26 ago. 2013. Disponível em: < <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/programa-leite-legal-capacitara-15-mil-produtores-mineiros-as-normas-da-in-62-85254n.aspx>>. Acesso em: 06 nov. 2013.

MUNOZ, M. A.; WELCOME, F. L.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 12, p. 3964-3971, 2007.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison: NMC, 1996. 64 p.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Laboratory handbook on bovine mastitis**. Madison: NMC, 1999. 222 p.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological Procedures for Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality**. 4. ed. Verona: NMC, 2004. 47 p.

NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 5, 2009.

NICKERSON, S. C. Choosing the best teat dip for mastitis control and milk quality. In: NMC ANNUAL MEETING, 2001. Louisiana. **Proceedings...** 2001. p. 43-54.

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.

OINARA, R. P.; GABRIEL MURAD, V. F.; EDSON, T. Percepção de qualidade no processo produtivo do leite: um estudo de caso no Rio Grande do Sul. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v. 11, n. 3, p. 436-451, 2009.

OLDE RIEKERINK, R. G. M.; BARKEMA, H. W.; VEENSTRA, S.; POOLE, D. E.; DINGWELL, R. T.; KEEFE, G. P. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. **Canadian Veterinary Journal**, v. 47, p. 567-572, 2006.

OLIVAL, A. A.; SPEXOTO, A. A.; MANO, G. B.; SANTOS, M. V. Avaliação das limitações para melhoria da qualidade do leite na região de pirassununga-sp. **Revista Ciência em Extensão**, v. 1, n. 2, p. 171-183, 2004.

OLIVEIRA, C. J. B.; LOPES JÚNIOR, W. D.; QUEIROGA, R. C. R. E.; GIVISIEZ, P. E. N.; AZEVEDO, P. S.; PEREIRA, W. E.; GEBREYES, W. A. Risk factors associated with selected indicators of milk quality in semiarid northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 6, p. 3166-3175, 2011.

OLIVEIRA, M. A. P. D.; PARENTE, R. C. M. Estudos de coorte e de caso-controle na era da medicina baseada em evidência. **Brazilian Journal of Videoendoscopic Surgery**, v. 3, n. 3, p. 115-125, 2010.

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.

PAIVA, C. A. V.; CUNHA, A. F.; LEITE, M. O.; RODRIGUES, R.; PENA, C.; FONSECA, L. M.; LANA, A. M. Q.; NETO, M. H.; SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. Evolution of milk production and premium payment for total bacterial count, somatic cell count, fat and protein contents in a dairy industry of Minas Gerais state, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 411-411, 2010.

PANKEY, J. W.; EBERHART, R. J.; CUMING, A. L.; DAGGETT, R. D.; FARNSWORTH, R. J.; MCDUFF, C. K. Uptake on Postmilking Teat Antisepsis. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 6, p. 1336-1353, 1984.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia, teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 296 p.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. (Ed.). **Vencendo a Luta contra a mastite**. Westfalia Landtechnik do Brasil Ltda, 2002. p.189.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica do leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 7, 2006.

PINTO, M. R. A Teoria do Comportamento Planejado (TCP) e o Índice de Disposição de Adoção de Produtos e Serviços Baseados em Tecnologia (TRI): Uma Interface Possível?. **Revista Gestão & Tecnologia**, v. 7, n. 2, p. 1-13. 2007. Disponível em: <<http://revistagt.fpl.edu.br/get/article/view/201/196>>. Acesso em: 17 abr. 2013.

PINZÓN-SÁNCHEZ, C.; RUEGG, P. L. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3397-3410, 2011.

PRESCOTT, S. C.; BREED, R.S. The determination of the number of body cells in milk by a direct method. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 7, p. 632-640, 1910.

RABOT, A.; WELLNITZ, O.; MEYER, H. H. D.; BRUCKMAIER, R. M. Use and relevance of a bovine mammary gland explant model to study infection responses in bovine mammary tissue. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 1, p. 93-99, 2007.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 37, n., p. 369-400, 2006.

REINEMANN, D.; RUEGG, P. L. An investigation of atp bioluminescence and quantitative bulk tank cultures to assess cleanliness of milking machines. In: 2000 ASAE ANNUAL INTERNATIONAL MEETING MILWAUKEE, 2000, Milwaukee, WI. [**Anais...**] 2000. Paper n. 003009.

RIEKERINK, R.; BARKEMA, H. W.; VEENSTRA, S.; POOLE, D. E.; DINGWELL, R. T.; KEEFE, G. P. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. **Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne**, v. 47, n. 6, p. 567-572, 2006.

RIEKERINK, R. G. M. O.; SAMPIMON, O. C.; EERLAND, V. J.; SWARTS, M. J.; LAM, T. J. G. M. Comparing bacterial counts on bare hands with gloved hands during milking. In: **Mastitis control: from science to practice**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2008. p. 77-82.

ROBERSON, J. R. Treatment of clinical mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 271-288, 2012.

RODRIGUES, A. C. O.; CARAVIELLO, D. Z.; RUEGG, P. L. Management of Wisconsin dairy herds enrolled in milk quality teams. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 7, p. 2660-2671, 2005.

RODRIGUES, A. C. O.; RUEGG, P. L. Actions and Outcomes of Wisconsin Dairy Farms Completing Milk Quality Teams. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 7, p. 2672-2680, 2005.

ROMA JÚNIOR, L. C.; MONTOYA, J. F. G.; MARTINS, T. T.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Sazonalidade do teor de proteína e outros componentes do leite e sua relação com programa de pagamento por qualidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1411-1418, 2009.

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.

RYSANEK, D.; BABAK, V. Bulk tank milk somatic cell count as an indicator of the hygiene status of primary milk production. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 4, p. 400-405, 2005.

RYSANEK, D.; BABAK, V.; ZOUHAROVA, M. Bulk tank milk somatic cell count and sources of raw milk contamination with mastitis pathogens. **Veterinarni Medicina**, v. 52, n. 6, p. 223-230, 2007.

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, 2009a.

RYSANEK, D.; ZOUHAROVA, M.; BABAK, V. Monitoring major mastitis pathogens at the population level based on examination of bulk tank milk samples. **Journal of Dairy Research**, v. 76, n. 1, p. 117-123, 2009b.

SANT'ANA, A. S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre os métodos rápidos Simplater TPC- CI e PetrifilmR AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 60-64, 2002.

SANTOS, M.V. A qualidade do leite no Brasil. **Inforleite**, p. 30-32, 2013.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2006, v. 1. 314 p.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observation leading to development of Califórnia Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Association**, v. 130, p. 199-204, 1957.

SCHREINER, D. A.; RUEGG, P. L. Effects of tail docking on milk quality and cow cleanliness¹. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2503-2511, 2002.

SCHUKEN, Y. H.; LEEMPUT, E. S.; MORIONI, P.; WELCOME, F.; GURJAR, A.; ZURAKOVISK, M.; GUTIERREZ, A. C.; ZADOKS, R. N. Contagious or Enviromental - A Herd Diagnosis. In: XXVII WORLD BUIATRICALS CONGRESS, Lisboa, Portugal, 2012. **Proceedings...** 2012. p. 145-148.

SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 579-596, 2003.

SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; LUENGO, C.; CORRALES, J. C.; DE LA FE, C.; GUIRAO, I.; MORALES, C. T.; GONZALO, C. Short communication: Effect of storage and preservation on total bacterial counts determined by automated flow cytometry in bulk tank goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4841-4845, 2009.

SILVA, B. O.; CARAVIELLO, D. Z.; RODRIGUES, A. C.; RUEGG, P. L. Evaluation of Petrifilm for the Isolation of *Staphylococcus aureus* from Milk Samples. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 8, p. 3000-3008, 2005.

SILVA, L. M. V.; FORMIGLI, V. L. A. Avaliação em Saúde: Limites e Perspectivas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 80-91, 1994.

SILVA, M. A. P. D.; SANTOS, P. A. D.; ISEPON, J. D. S.; REZENDE, C. S. M. E.; LAGE, M. E.; NICOLAU, E. S. Influência do transporte a granel na qualidade do leite cru refrigerado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, p. 381-387, 2009.

SILVEIRA, T. M. L.; FONSECA, L. M.; LAGO, T. B. N.; VEIGA, D. R. Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas do leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 128-132, 2005.

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.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M.; BASTOS, R. R. Risk factors associated with high bulk milk somatic cell count in dairy herds from Zona da Mata of Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 251-260, 2005.

SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; SILVA, M. V. G. B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia**, v. 61, p. 1015-1020, 2009.

VAN SCHAIK, G.; GREEN, L. E.; GUZMAN, D.; ESPARZA, H.; TADICH, N. Risk factors for bulk milk somatic cell counts and total bacterial counts in smallholder dairy farms in the 10th region of Chile. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 67, n. 1, p. 1-17, 2005.

VILAR, M. J.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L.; DIÉGUEZ, F. J.; SANJUÁN, M. L.; YUS, E. Application of ATP bioluminescence for evaluation of surface cleanliness of milking equipment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 357-361, 2008.

VILLAR, A.; GARCÍA, J. A.; IGLESIAS, L.; GARCÍA, M. L.; OTERO, A. Application of principal component analysis to the study of microbial populations in refrigerated raw milk from farms. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 10, p. 937-945, 1996.

VINHOLIS, M. D. M. B.; BRANDÃO, H. D. M. Economia de escala no processo de resfriamento do leite. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 245-251, 2009.

WAGNER, M. B.; CALLEGARI-JACQUES, S. M. Medidas de associação em estudos epidemiológicos: risco relativo e odds ratio. **Jornal de Pediatria**, v. 74, p. 247-251, 1998.

WEHR, M. H.; FRANK, J. H. **Standard methods for the examination of dairy products**. 17th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2004. 552 p.

WESEN, D. P.; SCHULTZ, L. H. Effectiveness of a Post-milking Teat Dip in Preventing New Udder Infections. **Journal of Dairy Science**, v. 53, n. 10, p. 1391-1403, 1970.

WOODWARD, M. **Epidemiology: study design and data analysis**. Florida: Chapman & Hall/CRC, 2005. 849 p.

WU, H.; WU, Q.; ZHANG, J.; LI, C.; HUANG, Z. Study on rapid quantitative detection of total bacterial counts by the ATP-bioluminescence and application in probiotic products. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 5, p. 921-929, 2011.

ZADOKS, R. N.; GONZALEZ, 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, p. 357-372, 2011.

ZADOKS, R. N.; SCHUKKEN, Y. H. Use of Molecular Epidemiology in Veterinary Practice. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 22, n. 1, p. 229-261, 2006.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: Causes and control. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 13, p. 57-65, 2008. Supplement.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Questões sobre aspectos gerais de manejo da fazenda.

Variável	Classes
Classificação	0= baixa CBT; 1= alta CBT
Localização	Município, coordenadas por GPS
Número de vacas em lactação	1=10-19; 2=20-29; 3=30-39; 4=>40
Média de produção diária (kg/dia)	1=<100; 2=101-500; 3=501-1000; 4=>1000
Sistema de produção	1=confinamento total; 2=semi-confinamento
Base do alojamento	1=concreto; 2=terra; 2=borracha
Tipo de cama utilizado	1=areia; 2=pó de serra/ maravalha; 3= bagaço de cana; 4=outro

APÊNDICE B - Questões sobre manejo de ordenha.

Variável	Classes
Classificação	0= baixa CBT; 1= alta CBT
Tipo de ordenha	1= balde ao pé; 2= mecânica canalizada
Número de conjuntos de ordenha	
Número de ordenha/dia	1; 2; 3
Higienização dos equipamentos pré-ordenha	1=sim; 2=não
Higienização do ordenhador (lavar as mãos)	1=sim; 2=não
Uso de luvas pelos ordenhadores	1=sim; 2=não
Presença de bezerro ao pé da vaca	1=sim; 2=não
Lava os tetos do animal	1=sim; 2=não
Retirada de pelos dos tetos com fogo	1=sim; 2=não
Retira os primeiros jatos de leite	1=sim; 2=não
Teste de caneca de fundo preto	1=sim; 2=não
Desinfecção antes da ordenha (pré-dipping)	1=sim; 2=não
Tipo de pré-dipping	1=cloro; 2=iodo; 3=outro
Tempo de ação do pré-dipping	1= 30 segundos 2=menos de 30 segundos
Uso de papel toalha descartável	1=sim; 2=não
Desinfecção após da ordenha (pós-dipping)	1=sim; 2=não
Tipo de pós=dipping	1=cloro; 2=iodo; 3=outro
Refrigeração do leite imediatamente após-ordenha	1=sim; 2=não
Faz algum tipo de anotação sobre a rotina de ordenha	1=sim; 2=não

APÊNDICE C - Questões sobre procedimentos de limpeza de equipamento de ordenha e utensílios.

Variável	Classes
Classificação	0= baixa CBT; 1= alta CBT
Origem da água	
Dureza da água	
pH da água	
Enxágue entre lavagens com detergente alcalino e ácido	1= sim; 2= não
Frequência da utilização de detergente ácido	1= diário; 2= 1 a 3X/semana; 4=não usa
pH pré-dipping	
pH pós-dipping	
Faz limpeza do tanque com detergente toda vez que o leite é retirado	1=sim; 2=não
Capacidade do tanque	
Presença de filme orgânico na teteira	
Presença de filme orgânico no filtro da unidade final ou balde ao pé	
Presença de filme orgânico na saída do tanque de expansão	
Presença de filme orgânico no copo coletor	

APÊNDICE D - Escala para aferição de limpeza do úbere da vaca.

1-866-TOP-MILK

UDDER HYGIENE SCORING CHART

Score udder hygiene on a scale of 1 to 4 using the criteria below.
Place an X in the appropriate box of the table below the pictures.
Count the number of marked boxes under each picture.

DATE: _____
FARM: _____
GROUP: _____

SCORE 1
Free of dirt

SCORE 2
Slightly dirty
2 – 10 % OF SURFACE AREA

SCORE 3
Moderately covered with dirt
10 – 30 % OF SURFACE AREA

SCORE 4
Covered with caked on dirt
>30% OF SURFACE AREA

1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	11	12	13	14	15	11	12	13	14	15	11	12	13	14	15
16	17	18	19	20	16	17	18	19	20	16	17	18	19	20	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	21	22	23	24	25	21	22	23	24	25	21	22	23	24	25

Total Number of udder scores: _____
Number of udders **scored 1**: _____
Number of udders **scored 2**: _____
Number of udders **scored 3**: _____
Number of udders **scored 4**: _____

Percent of Udders Scored 3 & 4: _____

Udders scored 3 and 4 have increased risk of mastitis
as compared to scores 1 & 2

Copyright 2002 © Pamela L. Ruegg, all rights reserved. Chart developed with input from Dan Schreiner and Mike Maroney

Fonte: Cook e Reinemann (2007)

APÊNDICE E - Questões socioeconômicas.

Questão	Respostas
Quantos anos de estudo o(a) sr(a) possui?	a) não possui, b) até 5 anos, c) até 8 anos, d) até 11 anos, e) nível superior
Qual a renda média mensal do(a) sr(a)?	a) < R\$ 465 b) de R\$ 466 a 930, c) de R\$ 931 a 1395 d) > de R\$ 1936 a 1980, e) > R\$ 1980
Qual a atividade principal (principal fonte de renda) da propriedade?	a) agricultura, b) leite, c) carne bovina, d) outras
Qual a importância econômica do leite para o(a) sr(a)?	a) principal atividade, b) segunda atividade, c) apenas um complemento, d) atividade sem importância econômica
Quantos litros de leite a propriedade produz por dia?	a) <100, b) de 101 a 500 litros, c) de 501 a 1000, d) de 1001 a 2000, e) de 2001 a 5000 litros, f) > 5000 litros
Quais e quantos funcionários existem na propriedade (envolvidos com o leite)?	a) somente mão de obra familiar b) funcionários permanentes= _____ c) funcionários temporários= _____
Tipo de ordenha existente na propriedade	a) manual, b) balde ao pé, com bezerro ao pé da vaca, c) balde ao pé, d) leite canalizado
Qual o tipo de assistência técnica possui?	a) veterinário, b) cooperativa, c) outro, d) não possui

APÊNDICE F - Questões sobre conhecimentos a respeito de células somáticas, contagem bacteriana e mastite.

Questão	Respostas
O que é Mastite?	a) infecção ou inflamação da glândula mamária, b) problemas no úbere da vaca, c) Não sei, d) Outras respostas
Qual o maior prejuízo relacionado à mastite para o(a) sr(a)?	a) tratamento da vaca, b) descarte do leite, c) diminuição da produção, d) diminuição da qualidade do leite, e) perda da vaca ou quartos, f) outros, g) não sei, h) não há prejuízos com a mastite
O(a) sr(a) saberia dizer quais as causas mais prováveis de mastite na sua propriedade ou em geral?	a) falta de alimentação, b) higiene geral, c) higiene na sala de ordenha e equipamentos de ordenha, d) não sei, e) outros
O senhor acha que as vacas com mastite sentem dor?	a) b) sim, b) não
É realizado tratamento com antiinflamatórios?	a) b) não, b) só para vacas com mastite grave, c) todos os animais com mastite
Qual o tratamento para a mastite que o(a) sr(a) realiza?	a) tratamento intramamário com antibiótico de um a três dias, b) tratamento intramamário com antibiótico até o animal curar, c) tratamento intramamário mais sistêmico, d) somente sistêmico, f) somente sistêmico
O(a) sr(a) sabe como prevenir a mastite?	a) pré dipping, b) pós dipping, c) limpeza dos tetos na ordenha, d) tratar os casos clínicos o mais rápido possível, e) tratar as vacas secas, f) outras medidas, g) não sei, h) não se pode prevenir a mastite.
O(a) sr(a) sabe o que é mastite subclínica?	a) mastite que não causa alteração visível no leite, b) outras respostas, c) não sei
O(a) sr(a) sabe o que é “Contagem de Células Somáticas”?	a) indicativo de mastite subclínica, b) outras respostas, c) não sei
O(a) sr(a) sabe a importância da mastite para a qualidade do leite?	a) leite ácido, b) perda de rendimento, c) doenças, d) outros problemas, e) não sei, f) a mastite não causa queda na qualidade do leite
O(a) sr(a) sabe o que é “Contaminação Bacteriana”?	a) quantidade de bactérias no leite, b) outras respostas, c) não sei
O(a) sr(a) saberia dizer quais as causas desta contaminação?	a) higiene geral/ b) animais doentes / c) ordenha manual/ d) outros / e) não sabe

APÊNDICE F - Continuação.

Questão	Alternativas
O(a) sr(a) saberia dizer quais os prejuízos relacionados a esta contaminação?	a) perda de produção; b) acidez do leite, c) risco para a saúde das pessoas, d) diminuição do rendimento, e) outros, f) não sei
Como o(a) sr(a) faz para prevenir esta contaminação?	a) limpeza da sala de ordenha, b) limpeza de equipamentos de ordenha, c) higiene pessoal na hora de ordenha, d) pré dipping, e) outras medidas, f) não faz nada.
Participou de algum treinamento/capacitação sobre mastite ou qualidade do leite?	a)sim, b) não
Conhece as exigências legais de contagem de células somáticas e contagem bacteriana total do leite?	a)sim, b) não

APÊNDICE G - Questões sobre práticas de prevenção da mastite, higiene de ordenha e equipamentos utilizadas no rebanho.

Variável	Classes	Resultado
Anota os casos de mastite clínica	1=sim; 2=não	
Anota protocolos de tratamento de mastite	1=sim; 2=não	
Utiliza antibióticos para tratamento de mastite	1=sim; 2=não	
Faz tratamento de vacas secas	1=sim; 2=não	
Faz CMT	1=sim; 2=não	Período:
Faz CCS individual dos animais	1=sim; 2=não	Período:
Já fez cultura para diagnóstico do agente causador de mastite	1=sim; 2=não	
Descarte de animais por mastite	1=sim; 2=não	
Número de casos (média/mês) de mastite		
Já utilizou algum tipo de vacina para mastite	1=sim; 2=não	
Segregação de animais em lotes com mastite clínica e subclínica	1=sim; 2=não	