

REGINA MARIA FINGER

**FATORES DE RISCOS DA HIGIENE DE VACAS COM
ELEVADO NÚMERO DE BACTÉRIAS MESOFÍLICAS
AERÓBIAS NO LEITE**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
para obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

AGRADECIMENTO

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela doação da bolsa de estudo.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, pela vaga oferecida no curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

À University of Davis California, por ter permitido que eu desenvolvesse os experimentos que serviram de base para a confecção do manuscrito da tese.

Ao professor orientador Sebastião César Cardoso Brandão, por me aceitar como orientada quando da aposentadoria do professor Adão Resende Pinheiro, a quem também agradeço por me aceitar como orientada.

Ao professor William Martin Sischo, pela co-orientação e pelo suporte financeiro da pesquisa.

Aos professores Nélcio José de Andrade e Mauro Mansur e Paulo Roberto Cecon, pelas sugestões para correção do manuscrito da tese.

BIOGRAFIA

REGINA MARIA FINGER, filha de Mário Pinto de Oliveira e Joana Rodrigues da Silva, nasceu em 13 de maio de 1955, em Itaju do Colônia-BA.

No período de 1973 a 1983, exerceu atividades como técnica de laboratório na CEPLAC, Ilhéus-BA, onde teve a oportunidade de trabalhar com análises físico-químicas de cacau e chocolate.

Em 1982, concluiu o Curso de Licenciatura em Ciências, com habilitação em Biologia pela Universidade de Santa Cruz, localizada em Ilhéus-BA.

Em 1986, concluiu o Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, cujo tema da pesquisa foi o controle biológico de bactérias do gênero *Bacillus* presentes no processo de fermentação do cacau.

No período de 1995 a 90, chefou o controle de qualidade das indústrias de laticínios Barbosa e Marques, sediada em Governador Valadares-MG, onde, com o objetivo de controlar a presença de bacteriófagos, desenvolveu um sistema de rodízio de culturas *starters*.

Entre 1991 a 1995, trabalhou na Parhelion Corporation, Ohio USA, onde teve oportunidade de trabalhar com cultura de tecido animal para produção de vacinas.

No ano de 1995, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, em nível de Doutorado. Durante esse curso desenvolveu atividades do projeto de pesquisa relacionada com a higienização de vacas de leite no *Veterinary Medicine Teaching and Researching Center, Tulare CA – University of California Davis*.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Legislação	3
2.2. Sistemas de qualidade	4
2.3. O sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC)	6
2.4. APPCC em fazendas produtoras de leite	8
2.5. Produção de leite na Califórnia (EUA)	12
2.5.1. Preparação inicial da ordenha	13
2.6. Qualidade de leite	14
2.6.1. Mastite e células somáticas	15
2.7. Diagnóstico da mastite	17
2.8. Monitoramento da higiene durante a ordenha	19
2.9. A bioluminescência como método analítico microbiológico	19
2.9.1. Bioluminescência em bactérias – bioquímica da reação	20
2.9.2. Luminescência do ATP bacteriano em alimentos	22

	Página
2.9.2.1. Produtos que contêm somente células microbianas	23
2.9.2.2. Produtos que contêm bactérias e células somáticas	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Experimento 1 – Variação bacteriana na superfície das tetas durante as fases de higiene da ordenha	26
3.1.1. População pesquisada.....	26
3.1.2. Amostragem durante os diversos eventos da ordenha	28
3.1.3. Contagem bacteriana	29
3.1.4. Análise dos dados.....	29
3.2. Experimento 2 – Comparação entre a população bacteriana das tetas determinada pelo método de semeadura em placas (<i>Standard Plate Count</i>) e com o método de medição da bioluminescência (no <i>Luminator KTM</i>)	30
3.2.1. Amostra e tratamentos pré-ordenha	30
3.2.2. Amostragem durante os diversos eventos da ordenha	31
3.2.3. Análise dos dados.....	31
3.3. Fatores de riscos para a produção de leite com alto número de bactérias mesofílicas aeróbias	32
3.3.1. A população pesquisada	32
3.3.2. Investigação pelo questionário	34
3.3.3. Análise microbiológica	34
3.3.4. Análise estatística dos resultados	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Variação na contagem de bactérias mesófilas da superfície das tetas durante as fases de higiene da ordenha	37
4.2. Comparação entre a população bacteriana das tetas realizada pela contagem-padrão em placas e pela medição da bioluminescência (quantificada pelo <i>Luminator KTM</i>).....	38
4.3. Análise de fatores de risco	46
4.3.1. Análises descritivas das fazendas.....	46
4.3.2. Análise de regressão logística	50
4.3.2.1. Variáveis da regressão logística	51
4.3.2.2. Análises de regressão logística.....	54

	Página
4.3.3. Análise microbiológica das superfícies externas das tetas.....	59
5. RESUMO E CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
APÊNDICE	71

RESUMO

FINGER, Regina Maria, D.S., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2001. **Fatores de riscos da higiene de vacas com elevado número de bactérias mesofílicas aeróbias no leite.** Orientador: Sebastião César Cardoso Brandão. Conselheiros: William Martin Sisco e Nélcio José de Andrade

Os consumidores influenciam fortemente na produção de alimentos, quando exigem qualidade e segurança alimentar. Por causa disso, as atividades relacionadas com a produção de alimentos passaram a adotar sistemas de controle de qualidade que diminuem os riscos em que o produto seja rejeitado pelos consumidores. No caso das fazendas produtoras de leite, o controle de qualidade deve primar pela produção de leite em condições higiênicas, que minimizem a contaminação bacteriana do produto, além de garantir as características bioquímicas condizentes com os padrões exigidos pelos laticínios. Nesse estudo foram comparadas as técnicas da bioluminescência e da contagem total em placas na enumeração das bactérias nas tetas das vacas, durante o processo de limpeza da ordenha. Para coleta de amostras, foi utilizado um *swab* na superfície externa de 2,5 cm². Com a análise de regressão linear aplicada aos dados da contagem total em placas (CTP) e nos dados de unidades relativas de luz (URL), obteve-se uma correlação de 0,80.

O valor para a sensibilidade do método de bioluminescência foi de 0,73 e o de especificidade foi de 0,81. Foram também investigados os fatores de risco que estão envolvidos com a produção de leite com alto número de bactérias. Utilizou-se o método estatístico de estudo do tipo caso-controle. Cinquenta fazendas participaram desse estudo, sendo que 27 fizeram parte do grupo de estudo de caso e 23 do grupo de estudo de controle. As variáveis foram obtidas por meio de um questionário aplicado em cada fazenda. A regressão logística permitiu calcular os valores das razões de riscos dos fatores de riscos, que foram mantidos no modelo. Esses fatores foram os seguintes: 1 - úberes limpos, ou seja, as fazendas cujas vacas estão com úberes limpos durante a ordenha têm mais chance de produzir leite com baixo número de CTP (razão de risco = 0,10; 90% IC 0,029-0,305; 2 - água acumulada nos corredores e currais, ou seja, as fazendas que mantêm os currais e corredores sempre secos e sem condições de acúmulo de água têm mais chance de produzir leite com baixo número de CTP (razão de risco = 0,095; 90% IC 0,008-0,533).

ABSTRACT

FINGER, Regina Maria, D.S., Universidade Federal de Viçosa, January 2001.

Risk factors for the occurrence of high bacteria counts in bulk tank milk with an emphasis on premilking hygiene. Adviser: Sebastião César Cardoso Brandão. Committee members: William Martin Sisco and Nélcio José de Andrade.

Consumers expect that their food will be safe and of the highest quality. As a consequence, food producers throughout the food chain have adopted quality control systems with an emphasis on food safety. On dairy farms, the quality focus is to optimize hygiene with the goal to minimize bacterial contamination of the raw milk while also meeting the fluid and component needs of the processor. In this project we focused on evaluating methods to assess premilking cow hygiene and risk factors for the occurrence of high bacterial counts in bulk tank milk. We compared the efficiency of bioluminescence to direct bacterial culture to monitor bacterial contamination on the teat through the pre and post milking processes. Samples were collected by swabbing 2,5 cm² area of the teat surface. A linear correlation ($r = 0.80$) was observed for both standard plate count (SPC) and relative luminescence unit (RLU). When compared to SPC a sensitivity of 0.73 and specificity of 0.81 were obtained with the bioluminescence method. Risk factors for high

bacteria in milk were determined using a case-control study. Fifty farms were included in the study, 27 in high bacteria herds and 23 low bacteria. Management variables were determined using a questionnaire for each farm. Logistic regression was used to estimate the odds ratio for being a farm with high bacteria in bulk tank milk. Significant risk factors were: 1. Farms with all cows having visually clean teat ends before milking were more likely to produce milk with low bacteria (odds ratio = 0.10; 90% CI = 0.029-0.305), and 2. Farms with dry corrals and alleys were more likely to produce milk with low bacteria (odds ratio = 0.095; 90% CI 0.008-0.533).

1. INTRODUÇÃO

A demanda por padrões mais exigentes para a segurança dos alimentos tem trazido mudanças significativas nos procedimentos utilizados para a obtenção e o processamento de produtos de laticínios, mesmo em países desenvolvidos. O fornecimento de produtos garantidos aos consumidores precisa deixar de ser feito com base nas análises do produto final, pois este modelo de administração da qualidade pode apresentar diversos problemas, incluindo:

1. Apesar dos procedimentos de controle de qualidade implantados nos laticínios, diversos incidentes de contaminação de consumidores têm ocorrido em todo o mundo, incluindo os Estados Unidos da América (EUA).
2. Os programas extensivos de controle de qualidade causam aumento de custo em virtude do grande número de amostras para análises laboratoriais.
3. Os microrganismos não estão uniformemente distribuídos e podem estar concentrados em uma pequena fração de uma partida de alimentos, o que pode tornar os métodos tradicionais estatísticos de amostragem menos efetivos.

Como resultado, tem havido uma tendência para a prevenção de defeitos através de planejamento efetivo para a eliminação de riscos. No caso das propriedades produtoras de leite onde as vacas convivem com um

ambiente que pode estar habitado por microrganismos causadores de problemas para os alimentos, atenção redobrada deve ser dedicada à higiene ambiental.

O objetivo desse projeto foi investigar diferentes procedimentos de higiene na ordenha em fazendas da Califórnia (EUA), como esses procedimentos estão correlacionados com as células somáticas e bactérias, e também avaliar a técnica de bioluminescência do ATP como instrumento de monitoramento da higiene na ordenha.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Legislação

O *Pasteurized Milk Ordinance* (PMO) é um documento oficial do *Department of Health & Human Service-Food and Drugs Administration* dos Estados Unidos da América, que estabelece as normas americanas para a produção de leite. O PMO não só estabelece os padrões químicos e microbiológicos do leite, como também regulamenta o processo de produção de leite, desde a construção dos currais, armazenamento de medicamentos, construção da área de ordenha, equipamentos, utensílios, entre outras. Para o processo de ordenha, o PMO descreve, em detalhes, como a mesma deve ser feita.

Ênfase é dada para a preparação e higiene do animal antes da ordenha. O PMO especifica que o abdômen, a cauda, as ancas, o úbere e as tetas da vaca devem estar limpos e secos antes que o animal entre na sala de ordenha. As tetas devem ser tratadas com uma solução sanitizante e secas antes que sejam acopladas à ordenhadeira. Não é permitida a manipulação das tetas com as mãos molhadas. Em resumo, o PMO exige que as vacas estejam limpas e secas antes da ordenha, de modo que a contaminação ambiental no leite seja minimizada (UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES E FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1995)

Como pode-se notar, o PMO é específico com relação aos requerimentos de limpeza do animal em cada passo da ordenha, porém não estabelece os procedimentos de limpeza e nem as maneiras de como monitorar o processo, como também não cita padrões de qualidade para o mesmo.

2.2. Sistemas de qualidade

Os surtos de infecções relacionados com alimentos têm sido uma preocupação não só dos consumidores, como também das autoridades governamentais americanas. Infecções entéricas relacionadas com a ingestão de alimentos contaminados por bactérias patogênicas, têm hospitalizado e até mesmo provocado a morte de muitos americanos. Em 1994, o *Council for Agricultural Science and Tecnology*, uma organização não governamental americana, estimou que acontecem por ano uma média de 9.000 mortes e 6,5 milhões de doenças relacionadas com a ingestão de alimentos contaminados (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION et al., 1997).

O *United State Departament of Agriculture* (USDA) estima que o custo para o tratamento dessas doenças, como também a perda de produtividade pelas pessoas afetadas, pode atingir US\$40 bilhões anualmente (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION et al., 1997). Portanto, a segurança alimentar tornou-se uma meta das autoridades locais, estaduais e federais americanas. A implantação de um sistema de qualidade em todas as indústrias de alimentos tem sido a estratégia a ser adotada para reduzir os riscos de contaminação a um mínimo tolerado.

Em 1994, o *Food and Drug Administration* (FDA) decidiu exigir que até janeiro de 2000 todas as indústrias de carne e de peixe adotassem o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) do inglês *Hazard Analysis Critical Control Point* (HACCP), como uma estratégia para prevenir problemas de contaminação em alimentos processados (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1994). Esta estratégia trouxe as seguintes vantagens: permitiu ao governo americano maior controle na

produção de alimentos, passou a responsabilidade de segurança alimentar para o processador e distribuidor de alimentos e tem permitido que os produtos americanos possam competir com mais vantagem no mercado mundial (CULLOR, 1995).

Embora as indústrias estejam empregando métodos de controle de qualidade, como maneira de prevenir infecções e doenças relacionadas com a ingestão de alimentos contaminados, ainda continuam a surgir, porém em menor escala, surtos de infecções relacionados com alguns alimentos, incluindo os produtos lácteos.

FAHEY et al. (1995) descreveram um surto de infecção gastrointestinal que afetou 110 pessoas em Northamptonshire - Inglaterra. Foi confirmado que 41 pessoas estavam contaminadas com *Campylobacter jejuni* e que elas consumiram leite não pasteurizado proveniente de um laticínio local.

Em 1997, McDONNELL et al. (1997) descreveram um surto provocado por *Escherichia coli* 0157:H7 em 27 pessoas que consumiram o mesmo tipo de sanduíche. Esse microrganismo foi isolado das fezes das pessoas que apresentaram sintomas de diarreia. Não foi possível identificar a fonte de contaminação porque o distribuidor não mantinha nenhum registro de procedência dos diversos fornecedores, e os lotes dos fornecedores não possuíam códigos de identificação. O APPCC requer o uso de códigos de identificação dos produtos, que deve ser mantido desde a produção até a distribuição, que pode rastrear a origem e partida dos produtos colocados no mercado.

KEENE et al. (1997) também descreveram surtos de infecções causadas em virtude do consumo de leite não-pasteurizado. O surto ocorreu em Oregon-EUA, entre dezembro de 1992 e 1993, onde a bactéria *Escherichia coli* 0157:H7 foi isolada de seis pacientes. Os animais da fazenda suspeita também apresentaram essa mesma bactéria. A análise do material genético das bactérias isoladas, tanto dos animais como dos pacientes, apresentou homologia de bases. Portanto, ficou comprovada a procedência da infecção. O surto continuou até 1994, com registro de mais 14 casos, apesar de novas

medidas e monitoramento da fazenda suspeita. Os autores discutem que esses surtos acontecerão indefinidamente e sem previsão de ocorrência.

2.3. O sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC)

Por muitas décadas, a inspeção do produto final serviu como meio de assegurar a segurança alimentar. Porém, foi surgindo a necessidade de prevenir os problemas de perda de produção, causada pela ausência de programas preventivos de contaminação. O APPCC é um sistema de qualidade com base na lógica e nos conhecimentos científicos, para identificar perigos específicos e medidas preventivas para o seu controle.

O APPCC foi colocado em prática pela primeira vez em processamento de alimentos pela indústria *Pillsbury Corporation*, EUA, no início da década 1960, em colaboração com o *U.S. Army Natick Laboratories and National Aeronautics and Space Administration* (NASA), para garantir que os astronautas não sofressem nenhum trauma relacionado com a ingestão de alimentos contaminados durante os vôos espaciais (GRIFFITHS, 1997). Desde então, esse sistema tem sido adotado por outras indústrias de alimentos (SPERBER, 1991; FERRARI, 1992; HUSS, 1992; NORTON, 1992; BERENDS e SNIJDERS 1994; VASAVADA, 1993).

O APPCC estabelece uma série de controles nos pontos de risco de perigo de contaminação, identificados por meio de uma sistemática de avaliação da situação específica de uma linha de produção, estocagem e distribuição. O objetivo é assegurar que todas as fases da produção não ofereçam riscos de contaminação, ou que esses riscos sejam controlados. Como consequência, o produto final não oferece risco à saúde do consumidor, além de apresentar qualidade uniforme.

O risco de não-conformidade com os padrões de qualidade pode ser microbiológico, químico ou físico. A contaminação microbiológica, que é a mais comum na indústria de alimentos, pode ser dividida em três tipos: por vírus, bactérias e parasitas. Quando o tipo de microrganismo é identificado, o

mesmo é classificado em termos de severidade como: moderado, com limitada capacidade de transmissão; moderado, com potencial para transmissão; e altamente transmissível. A contaminação química pode ser classificada quanto à ocorrência como natural ou fraudulenta. A contaminação física, que em alguns casos é facilmente identificada porque pode ser vista pelo consumidor, consiste em partículas como cabelos, pedaços de vidro, plástico, fezes de animais, partículas metálicas entre outras (KING, 1992).

Análises para a detecção de PCC envolvem a avaliação de todo o sistema de produção e de distribuição do alimento. Os seguintes fatores devem ser considerados: a metodologia de produção, as instalações e os equipamentos, a mão-de-obra, a matéria-prima usada e os pontos de distribuição do produto final (MORTIMORE e WALLACE, 1998).

O USDA estabelece sete pontos que devem ser seguidos para a adequada instalação de um programa de APPCC (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, e FODD SAFETY AND INSPECTION SERVICE, 1999):

1 – *Identificação de todos os PCC, associados com a produção e a colheita da matéria-prima, ingredientes, processamento, embalagem, distribuição, preparação e consumo do alimento.* É importante conhecer o tipo de tratamento que o alimento vai receber tanto na indústria quanto na casa do consumidor. Deve-se, também, saber o tipo de consumidor ao qual o alimento é destinado, incluindo crianças, pessoas idosas, ou com baixa deficiência imunológica.

2 – *Definição de todos os procedimentos nos quais a falta de controle pode colocar em risco a saúde humana.* O processo de pasteurização e higiene dos equipamentos é exemplo de ponto crítico de controle em laticínios.

3 - *Estabelecimento dos limites que devem ser mantidos em cada PCC.* Em laticínios, a pasteurização deve ser mantida a 71,8°C, por 15 segundos, para que todos os microrganismos patogênicos sejam eliminados.

4 – *Estabelecimento de uma metodologia para monitorar os PCC.* Testes devem ser realizados para verificar o adequado processamento do

alimento. Esses métodos devem ser padronizados, e feitos em quantidade suficiente para comprovar que o PCC esta sob controle.

5 – *Estabelecimento de ações corretivas, que devem ser tomadas sempre que os PCCs estiverem apresentando resultados que fogem dos padrões estabelecidos.* Isso deve ser feito em cada PCC sempre de maneira padronizada e documentada.

6 – *Estabelecimento de um sistema de coleta de resultados que sirva como documento para confirmação do sistema de APPCC.* Esses resultados devem ser mantidos arquivados para que possam ser apresentados aos inspetores, quando requisitados. Entre esses resultados devem estar incluídos registros de temperaturas, resultados de análises microbiológicas, resultados de teste de vida de prateleira dos produtos, dentre outros.

7 – *Estabelecimento de procedimentos de avaliação do sistema de APPCC.* O acompanhamento do processo de retorno do produto do mercado é uma boa maneira de avaliar o sistema de APPCC.

2.4. APPCC em fazendas produtoras de leite

Desde que o FDA tornou as empresas que industrializam e distribuem alimentos responsáveis também pela segurança alimentar nos EUA, essas empresas começaram a exigir níveis mais altos de qualidade da matéria-prima a ser processada e distribuída (BILLY e WASCHESMUTTH, 1997). Portanto, produtores e profissionais, como agrônomos e veterinários, envolvidos na cadeia do leite, também passaram a ser responsáveis pela segurança alimentar. Esses profissionais têm a responsabilidade de orientar a produção agropecuária de modo a assegurar e, ou, minimizar a contaminação microbiana da matéria-prima com, por exemplo, *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella*, *Campilobacter* e *Criptosporidium*, e a contaminação química com antibióticos, herbicidas e pesticidas (MENG e DOYLE, 1997; McDONNELL et al. 1997; JANSEN e GREENLES, 1997).

CULLOR (1995) publicou um trabalho onde explica como o sistema de APPCC pode ser aplicado em fazendas produtoras de leite. Os 12 passos

descritos a seguir devem ser observados para o estabelecimento de APPCC na fazenda:

1. *Formação de uma equipe para trabalhar com APPCC.* Devem fazer parte dessa equipe o proprietário da fazenda, o funcionário responsável pelo manejo do gado e o veterinário.

2. *Descrição do produto final e do método de distribuição.* O objetivo do produtor deve ser de produzir e entregar o leite para os laticínios, de acordo com os padrões específicos para a finalidade a qual o leite vai ser utilizado.

3. *Identificação do tipo de produto que será produzido com o leite e o tipo de consumidor.* O produtor deve ter conhecimento do tipo de produto para o qual o leite vai ser processado. Se o leite vai ser usado para fabricação de queijos, manteiga, sorvete e outros produtos, ou se vai ser destinado ao consumo *in natura*. Deve-se também levar em conta que entre os consumidores de leite podem-se encontrar crianças, pessoas idosas e com imunodeficiência.

4. *Desenvolvimento de um fluxograma que descreva o processo de produção e armazenamento do leite.* O ciclo de produção de leite começa com a parição das vacas em local apropriado. Após a produção do colostro, vacas com semelhantes períodos de lactação são transferidas para currais ou estábulos, onde permanecerão durante o período lactação. O único movimento permitido a esses animais é a transferência para a sala de ordenha e o retorno para o curral de lactação. O fluxograma do processo de produção, a limpeza e a desinfecção das tetas, o resfriamento e a estocagem do leite encontra-se na Figura 1.

As vacas que manifestarem sintomas de mastite, febre, diarreia ou qualquer outra manifestação patológica, devem ser mantidas separadas das vacas lactantes saudáveis, a ordenha deve ser separada, e o leite descartado. Esses animais só poderão ser ordenhados novamente após a liberação pelo médico veterinário. Os animais que receberem tratamento com antibióticos ou quimioterápicos deverão também ser afastados da produção até que o leite não apresente resíduos desses produtos.

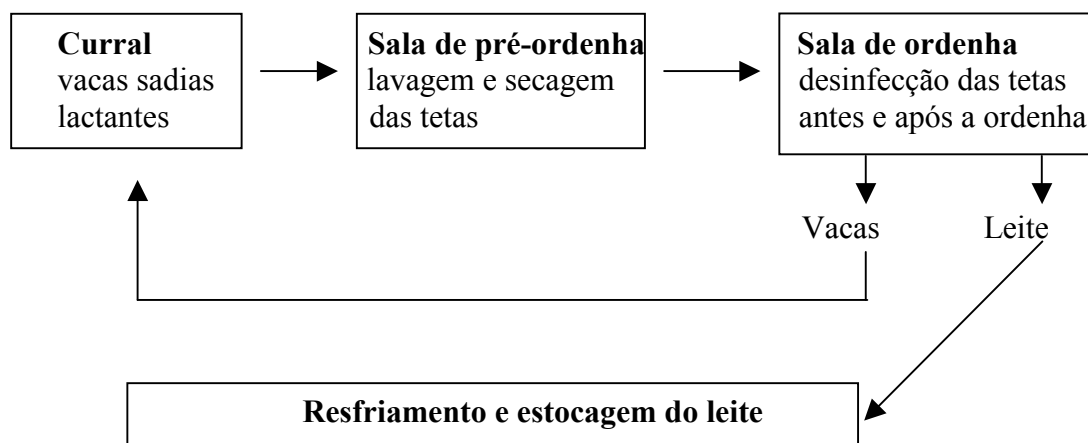


Figura 1 – Fluxograma básico do processo de produção e estocagem resfriada do leite.

Antes e durante a ordenha é preciso seguir as recomendações de boas práticas de ordenha. Os animais devem ser mantidos em currais com baixo nível de contaminação por bactérias patogênicas. Antes da ordenha os animais devem ter as tetas lavadas, desinfetadas (*pre-dipping*) e secas. Essas práticas minimizam a transferência de bactérias para o leite. A desinfecção das tetas após a ordenha (*post-dipping*) deve fazer parte do sistema de controle de mastite do rebanho.

Atenção especial deve ser dada ao manuseio e à limpeza dos equipamentos de ordenha como, também, dos recipientes e da temperatura empregada no armazenamento do leite.

5. *Verificação do fluxograma.* Seguindo o fluxograma de produção, a equipe responsável pela aplicação da APPCC deve tomar conhecimento de todos os passos do processo de produção de leite. Isso permitirá o envolvimento de todos no objetivo comum, que é a produção de leite de boa qualidade. Por exemplo, a pessoa responsável pela manutenção dos animais no curral deve ter conhecimento da importância em manter os animais em boas condições higiênicas e livres de estresse.

6. *Levantamento dos pontos onde pode haver contaminação química ou microbiológica.* Os pontos críticos de contaminação devem ser enumerados

durante todo o processo de produção. Tomando-se como exemplo a sala de ordenha. Este é um local onde são detectados pontos de perigos controláveis, como a contaminação bacteriana do leite. Nesse local, o leite pode ser contaminado com bactérias devido a sujidades presente na teta do animal. Pode ser contaminado também pelo contato com equipamento de ordenha e linhas de leite mal higienizados, além de poder ser contaminado pela manipulação do ordenhador, quando este não apresenta boas práticas de higiene (roupas adequadas, mãos limpas e secas, e boa condição de saúde).

7. Levantamento dos recursos que podem ser aplicados para que esses pontos críticos de contaminação sejam controlados. A ordenha manual ou mecânica deve ser feita por pessoa treinada, de maneira sistemática e em local próprio. Os animais devem ser conduzidos ao local de ordenha de maneira gentil para evitar o estresse. Os primeiros animais a serem ordenhados serão aqueles da primeira cria seguidos por vacas de mais de uma cria. Os animais com suspeita de mastite ou com mastite devem ser ordenhados por último para evitar a contaminação de outros animais.

Após a lavagem das tetas do animal, deve-se proceder uma secagem completa das tetas. Se for usado algum produto para desinfecção das tetas, este deve ser removido em material descartável para evitar a transferência de resíduos para o leite. Os primeiros jatos de leite devem ser examinados em caneca de fundo preto para tentar determinar a presença de mastite. Separar o leite de animais que apresentem anormalidade nesse teste.

O leite ordenhado deve ser transferido para recipientes devidamente higienizados e resfriado para 4°C em menos de duas horas

8. Estabelecimento de limites críticos para contaminação. O conhecimento dos limites críticos para contaminação permitirá que sejam tomadas medidas corretivas sempre que haja não conformidade. Devem ser estabelecidos limites para a contagem de células somáticas, contagem total de microrganismos no leite, incidência de mastite, perda de leite devido à mastite, etc.

9. Estabelecimento de métodos de monitoramento. Devem ser estabelecidas metodologias para verificar a contaminação nos pontos críticos,

tais como, presença de mastite, presença de antibióticos no leite de vacas tratadas, contagem bacteriológica do leite, contagem de células somáticas.

10. *Estabelecimento de medidas a serem tomadas sempre que os limites críticos de contaminação excederem os padrões estabelecidos no passo 8.* Métodos e procedimentos de intervenção devem estar previstos para serem implantados quando os limites críticos forem excedidos.

11. *Estabelecimento da maneira pela qual os dados devem ser anotados.* O processo de APPCC deve ser documentado de maneira clara, para permitir seu uso como documento. Além das anotações de dados, devem ser documentados, em cada passo da produção os pontos críticos e a maneira de detecção da contaminação, os limites de contaminação a partir do quais devem ser tomadas decisões, e o funcionário responsável pelo controle dos pontos de contaminação em cada passo da produção.

12. *Monitoramento do APPCC.* A média mensal do número de células somáticas, a contagem bacteriana e o número de vacas que manifestaram mastite nesse período são bons indicadores de que a APPCC está sendo aplicado de maneira correta. Essa verificação deve ser feita pela equipe responsável formada etapa 1.

2.5. Produção de leite na Califórnia (EUA)

As fazendas produtoras de leite da Califórnia (EUA) possuem uma média de 600 vacas produtoras, o que as diferenciam das fazendas de muitos outros estados que, em média, possuem apenas 100 animais produtores. Algumas fazendas chegam a ter até 4.000 animais produtivos. Geralmente, a ordenha é feita duas vezes ao dia, porém existem algumas fazendas que fazem até três ordenhas por dia. Devido ao grande número de animais, essas fazendas funcionam como verdadeiras empresas produtoras de alimentos, fugindo do manejo tradicional de uma propriedade pequena. Por isso, os produtores geralmente fogem das normas adotadas pelo PMO (KIRK e SISCHO, 2000)

As práticas de ordenha variam entre os extremos de higiene intensiva até nenhuma preparação. Mas, de modo geral, existem pequenas variações de uma fazenda para outra quanto à maneira de higienizar as vacas antes e depois da ordenha. Essas variações dependem de decisões que estão ligadas a fatores econômicos, tais como, consumo de água, desinfetantes, mão de obra, e estação do ano.

2.5.1. Preparação inicial da ordenha

A ordenha geralmente começa com a transferência dos animais para um compartimento, onde eles são lavados com jatos de água, que partem de chuveiros instalados ao nível do chão. A duração da lavagem varia de acordo com estação do ano e com a fazenda. Normalmente, são empregados três ciclos de lavagem, com duração de dois minutos, em intervalos de um minuto.

Após a lavagem, os animais são transferidos para outro compartimento, onde permanecem por cerca de trinta minutos, ou tempo suficiente para que o exterior das tetas torne-se seco. O próximo passo é a transferência dos animais para a sala de ordenha, onde as tetas serão desinfetadas com uma solução desinfetante (em inglês *pre-dip*). A desinfecção das tetas das vacas não é realizada em muitas fazendas.

Essa solução desinfetante geralmente é a base de iodo (0,50 a 1,0%) ou cloro (0,1 a 4%) (SARAN, 1995) e pode ser aplicada por imersão da teta em uma caneca contendo a solução ou por aspersão. O excesso de desinfetante geralmente é removido com toalhas de papel ou algodão.

O acoplamento da ordenhadeira vem a seguir. Após ordenha, as tetas são novamente tratadas com uma solução desinfetante, semelhante àquela usada na pré-ordenha, porém, adicionada de componentes como glicerol, para maior adesão e condicionamento da pele das tetas.

2.6. Qualidade de leite

A qualidade do leite depende basicamente de três processos: o manejo da vaca, que inclui cuidados com alimentação e saúde; a higiene das linhas de leite e equipamentos de ordenha e o tratamento que é dado ao leite após a ordenha na fazenda e no laticínio.

Em todos esses processos, as práticas de higiene aplicadas no manejo das vacas têm muita influência na qualidade do leite, incluindo baixo número de bactérias e células somáticas, ausência ou número insignificante de microrganismos patogênicos, ausência de resíduos de medicamentos especialmente antibióticos e hormônios; e contaminação mínima com toxinas microbiológicas originadas na alimentação dos animais (HEESCHEN, et al. 1997).

Quanto à higiene das linhas de leite e aos equipamentos de ordenha, esses processos também contribuem para aumentar a carga bacteriana do leite. Quando a higiene é feita de maneira inadequada, com a remoção parcial de resíduos de leite e outras sujidades, esses resíduos permanecem nas linhas de leite e equipamentos permitindo a multiplicação de microrganismos entre cada ordenha. Os microrganismos que crescem nas linhas de leite farão parte da microbiota do leite da próxima ordenha (DRUCE e THOMAS, 1972).

A temperatura e o tempo de estocagem do leite também contribuem para o aumento do número de bactérias do leite no tanque de estocagem. O leite deve ser resfriado entre 4 e 6°C o mais rápido possível após a ordenha. O *Pasteurized Milk Ordinance* recomenda o resfriamento do leite para 7°C ou menos dentro do período de duas horas após a ordenha (UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES E FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1995). O correto resfriamento do leite, quando associado a boas práticas de ordenha e manejo da vaca, permite a obtenção de leite com baixo número de bactérias.

2.6.1. Mastite e células somáticas

A mastite é uma doença influenciada por procedimentos que acontecem no processo de ordenha, como o nível de limpeza das tetas e dos equipamentos, o nível de treinamento dos ordenhadores, e o uso correto da máquina de ordenhar. Trata-se de um processo inflamatório no úbere, que pode ser provocado por microrganismos patogênicos ou ambientais.

A mastite pode se apresentar sob várias formas clínicas. As formas agudas e superagudas, além de provocarem alterações na própria glândula mamária, ocasionam alterações sistêmicas no organismo animal. Já as formas clínicas subagudas e crônicas são detectadas apenas por testes de campo e análises laboratoriais. Existe ainda a forma subclínica, que é diagnosticada principalmente através do exame de contagem de células somáticas (glóbulos brancos) no leite.

É importante salientar que a presença de mastite, de qualquer forma ou intensidade, reduz a produção de leite, provocando em muitos casos a perda da produção em um ou mais tetas. Além da queda na produção, a mastite leva a uma modificação na composição físico-química do leite, diminuindo os níveis de gordura e de proteína, além de alterações de consistência e coloração (ANDERSON e ANDREWS, 1977; DEKONING et al., 1985; BARBANO et al., 1991; KLEI et al., 1998).

A microbiota do leite também é alterada, podendo apresentar microrganismos potencialmente prejudiciais à saúde humana, como *Listeria monocytogenes* (JANSEN et al., 1996; BEMRAH et al., 1998), *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* 0157 e *Campilobacter jejuni* (BUZBY et al., 1996; CHRIST, 1996). Desta forma, é indispensável dedicar grande atenção para a mastite para evitar a ocorrência de riscos de contaminação do leite cru.

Vários fatores podem predispor um animal a desenvolver a mastite. Dentre eles, podem-se citar:

- Causas traumáticas externas, como cortes, ferimentos, camas duras e mal-higienizadas, ordenha manual ou mecânica mal-conduzidas (ANDERSON et al., 1985).

- Presença de leite residual, que ocorre em ordenhas lentas ou mal-realizadas, que pode propiciar a entrada de bactérias através do esfíncter do úbere.

- Fatores anatômicos, determinados por herança genética, como tamanho e diâmetro do canal da teta, e a conformação do úbere, (SCHUTZ, 1994; SHOOK e SCHUTZ, 1994; CASSELL, 1994).

- Idade do animal, já que animais mais idosos têm a predisposição para desenvolver mastite.

- Doenças infecciosas, como varíola bovina, febre aftosa, brucelose, tuberculose e leucose linfóide bovina, provocam queda na resistência orgânica dos animais, favorecendo o aparecimento de mastite.

Entre todos os fatores citados, atenção especial deve ser dada à ordenhadeira mecânica. MILTENBURG et al. (1997) publicaram uma revisão sobre a influência da ordenhadeira mecânica sobre a saúde do úbere. O principal risco durante o uso é a transmissão e penetração de patógenos ao longo da ordenha. A ordenhadeira pode influenciar o estabelecimento de novos casos de mastite de cinco diferentes maneiras:

1. As teteiras podem servir de fonte de contaminação e transmitir bactérias contagiosas entre as vacas.

2. Mudanças inadequadas de pressão durante o uso da ordenhadeira podem facilitar a transferência de ar e de leite entre as teteiras e, conseqüentemente, permitir a contaminação bacteriana entre as tetas do mesmo úbere.

3. Flutuações no vácuo dentro da teteira durante e no fim da ordenha podem resultar em movimento contrário do leite. O leite que volta para o ducto da teta pode implantar bactérias patogênicas.

4. O fechamento inadequado da teteira durante o ciclo de pulsação aumenta o risco de entrada de bactéria no canal do leite.

5. O mau funcionamento e o uso inadequado da ordenhadeira pode provocar traumatismo nas tetas e também ordenha incompleta. Essas situações aumentam os riscos de entrada de bactéria no úbere e reduz as chances de remoção de bactérias e toxinas que são removidas durante a ordenha.

A causa mais comum e importante da mastite é de natureza infecciosa, causada por bactérias e micoplasmas. As bactérias que mais freqüentemente apareceram nos diagnósticos são *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus uberis*, *Staphylococcus dysgalactiae*, Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella* (ANDERSON, et al., 1985) e, mais recentemente, *Mycoplasma* (KIRK e LAURERMAN, 1994; KIRK et al., 1997).

De acordo com KEEFE (1997), a presença de *Streptococcus agalactiae* continua sendo a causa mais comum de mastite subclínica. Trata-se de um parasita da glândula mamária, que quando prevalece, provoca uma elevação no número de células somáticas e bactérias no leite produzido, além de diminuir a quantidade e a qualidade do leite e seus subprodutos. De acordo com esse mesmo autor, é possível eliminar esse microrganismo do rebanho, especialmente quando se usa quimioterapia associada com boas práticas de higiene do úbere.

A presença de *Staphylococcus aureus* está geralmente associada com rebanhos que possuem alto número de células somáticas. Isto acontece devido à capacidade desse microrganismo de penetrar no tecido mamário e provocar abscessos que são difíceis de serem alcançados por medicamentos (BASELGA et al. 1994; SUTRA e POUTREL, 1994).

2.7. Diagnóstico da mastite

Existem vários testes para se diagnosticar a mastite. Para as formas iniciais de mastite existem dois testes de campo que podem ser realizados diariamente no momento da ordenha. Um deles é o teste da ‘caneca telada’, que evidencia o leite com grumos de pus ou caseína coagulada. O outro teste prático é o da ‘caneca com fundo preto’, que evidencia grumos mais finos. Um

outro teste que também pode ser utilizado em nível de campo é o “CMT” ou *California Mastitis Test*, que testa a estabilidade da caseína do leite como indicativo da mastite (BASELGA et al., 1994; CSAPÃO et al., 1995; SHOSHANI e BERMAN, 1998).

A contagem de células somáticas ou de glóbulos brancos no leite tem sido muito utilizada para avaliar as mastites subclínicas, mas o seu valor como teste confirmatório da doença ainda é discutível (BERNING et al., 1992). Alguns pesquisadores acreditam que a partir de determinada contagem de glóbulos brancos no leite já seria recomendado o início de um tratamento (BROLOUND, 1985). Outros autores afirmam que nem sempre um aumento na contagem dos glóbulos brancos no leite pode significar a presença de um processo de instalação da mastite. Segundo SCHEPERS et al. (1996), o nível de infecção da mastite é o fator determinante na contagem de células somáticas no leite, mas também existem outros fatores que também influenciam no número de células somáticas e que são as instalações onde a vaca é mantida, o estágio de lactação, o número de parições e o histórico de mastite clínica da vaca.

BARKEMA et al. (1998) acompanharam durante um ano três rebanhos de gado de leite na Nova Zelândia: um com baixo número de células somáticas (< 150.000), outro com médio número (150.000 – 200.000) e outro com alto número (250.000 – 400.000). Não foram notadas diferenças na taxa de mastite entre os rebanhos. Os autores observaram que as bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp, ocorrem com mais frequência em rebanhos com baixo número de células somáticas. Já os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae* ocorrem com maior frequência em rebanhos com alto número de células somáticas.

O isolamento dos microrganismos que infectam o úbere e o antibiograma indica o agente etiológico em questão e o antibiótico mais adequado ao tratamento da doença.

2.8. Monitoramento da higiene durante a ordenha

Existem diferentes maneiras de monitorar a limpeza do animal na pré-ordenha. A inspeção visual pode ser suficiente para verificar se o animal está limpo e seco. Análises microbiológicas também podem ser usadas para inspecionar a limpeza do animal. A vantagem das análises microbiológicas é que elas podem medir diretamente a carga bacteriana da teta do animal, como também diferenciar o tipo de microrganismo que está presente. A desvantagem dessa metodologia é que, além da exigência de laboratório, equipamentos e pessoal treinado, é necessário um prazo de 24 a 48 horas para se obter respostas.

Para a aplicação de sistema do tipo análise de perigos e pontos críticos de controle, ou qualquer outro programa de monitoramento da qualidade, é importante obter respostas rápidas em todos os passos da produção de alimentos onde existe um ponto crítico de contaminação.

2.9. A bioluminescência como método analítico microbiológico

Uma forma alternativa para o monitoramento da carga microbiológica é o uso do método de bioluminescência. Esse método mede indiretamente a contaminação bacteriana através da reação de luminescência de ATP com o complexo substrato-enzima luciferina-luciferase (GRIFFITHS, 1993). Assumindo que o nível de ATP na célula bacteriana é relativamente constante, a quantidade de luz emitida é diretamente proporcional ao número de bactérias presente na amostra (GRIFFITHS, 1996).

Bioluminescência é a produção de luz “fria” através de reações químicas em um organismo. A luminescência pode ser produzida por microrganismos como no caso das bactérias e algas, e também por organismos multicelulares como no caso dos vaga-lumes. As reações bioquímicas de emissão de luz são as mesmas para ambos os organismos.

Pelo menos duas moléculas químicas são requeridas para a bioluminescência. Uma delas é a que produz a luz, chamada genericamente de luciferina (fosfato riboflavina reduzido (FMNH₂)). A outra é a enzima luciferase que catalisa a reação. A luciferase catalisa a oxidação da luciferina, resultando em luz e oxiluciferina inativa. A energia para produção de luciferina é fornecida pelo ATP em presença de íons de oxigênio (Figura 2).

A bioluminescência não deve ser confundida com fluorescência ou fosforescência. Na fluorescência, a energia proveniente de uma fonte de luz é absorvida e reemitida como outro fóton. Na bioluminescência ou quimioluminescência, a energia é suprida por uma reação química.

Algumas vezes, a luciferina, a luciferase e o oxigênio (cofator) estão ligados em uma única unidade chamada fotoproteína. Estas moléculas produzem luz quando um tipo particular de íon, como, por exemplo, o cálcio, é adicionado ao sistema (HASTINGS, 1983)

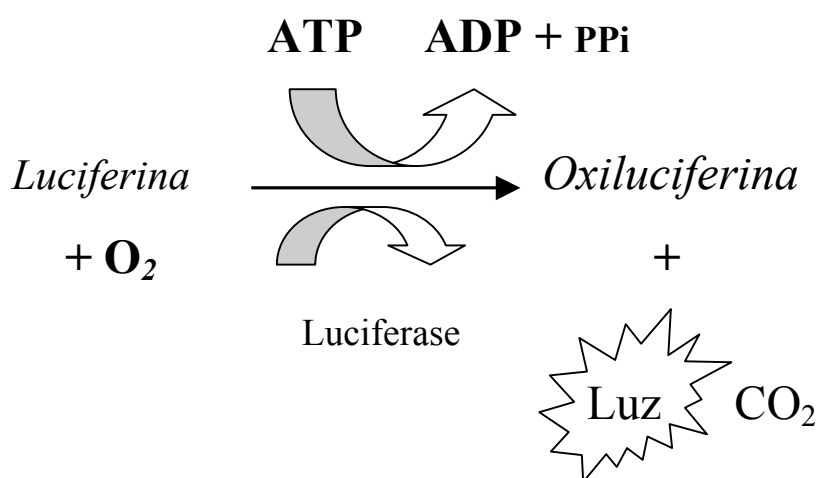


Figura 2 – A reação de bioluminêscencia.

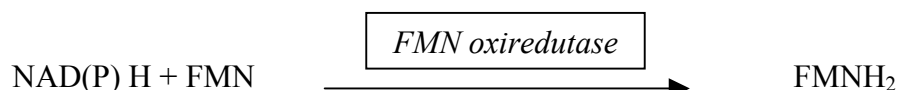
2.9.1. Bioluminescência em bactérias – bioquímica da reação

As bactérias capazes de emitir luz são classificadas em quatro gêneros: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Alteromonas* e *Xenorhabdus*. Estudos têm explicado como a bioluminescência ocorre nos gêneros de *Vibrio* e *Photobacterium* a nível bioquímico e genético (HASTING et al., 1985).

Nas bactérias luminescentes, a reação de bioluminescência catalisada pela enzima luciferase envolve a oxidação de uma longa cadeia de aldeído pelo fosfato riboflavina reduzido (FMNH₂), o que resulta na emissão de luz verde azulada detectada no comprimento de onda de 490 nm.



A primeira fonte de energia para a produção de luz é fornecida pela conversão do aldeído ao correspondente ácido graxo. Cadeias longas de aldeído são essenciais para a reação de luminescência (BAKER et al., 1992). O tetradecanal aldeído é o substrato mais comum para a reação de luminescência (MEIGHEN, 1988). Esta reação também é altamente específica na utilização de fosfato riboflavina reduzida (FMNH₂), sendo que esta é formada pela reação:



Portanto, a enzima luciferase pode atuar em qualquer sistema que produza FMNH₂. Os elétrons para a redução da flavina mononucleotídeo (FMN) são produzidos na cadeia de transporte de elétrons (HASTING et al. 1985).

A enzima luciferase está ligada à cadeia respiratória, sendo uma flavina monoxigenase. Todas as luciferases são heterodímeros (77 kDa) consistindo de duas subunidades não idênticas, α (40 kDa) e β (37 kDa). O sítio ativo está localizado na subunidade α , mas a subunidade β é essencial para a reação de emissão de luz. Existem evidências de que a subunidade β contribua para estrutura do centro ativo. Quando ambas as subunidades são separadas, a atividade da enzima não se verifica. A atividade enzimática só é observada quando as duas subunidades se combinam, levando à conclusão de que uma subunidade não possui um sítio ativo completo. Estudos indicam que o sítio de ligação com o FMNH₂ esta situada perto da interface das unidades α e β (HASTING et al., 1985).

2.9.2. Luminescência do ATP bacteriano em alimentos

A técnica de obtenção de bioluminescência que utiliza o complexo substrato enzima luciferina–luciferase foi descrita pela primeira vez em 1968, por cientistas da NASA. Os pesquisadores estavam interessados em descobrir a existência de seres vivos em outros planetas, com base no fato de que todas as células vivas possuem adenosina trifosfato (ATP) e que este é um doador universal de energia para reações metabólicas (CHAPELLE e LEVIN, 1968).

Esses pesquisadores estudaram o complexo luciferase–luciferina presente na cauda dos vaga-lumes. Esse complexo converte energia química associada com ATP em luz. Como se trata de uma reação estequiométrica, a quantidade de luz emitida é proporcional a concentração de ATP presente. Esse método foi denominado bioluminescência do ATP.

A emissão de luz é medida como *Relative Light Units* (RLU) usando-se um luminômetro ou fotômetro. Devido à precisão e à sensibilidade do método de bioluminescência do ATP em culturas puras, alguns pesquisadores expressam os resultados como ATP por Unidade Formadora de Colônias (UFC). Por exemplo, D'EUTACHIO et al. (1968) demonstraram que em 13 espécies de bactéria anaeróbias o valor médio de ATP/UFC era de 0,47 femtograma (1 femtograma (fg) = 10^{-15} g). A linearidade da curva de medição do ATP estava entre 0,22 e 1,03 fg. BAUMGMART, et al. (1980) e SHARPE et al. (1970) encontraram valores 100 vezes maiores de ATP em leveduras do que em bactérias.

SHARPE et al. (1970) foram os primeiros pesquisadores a aplicar o método de bioluminescência do ATP na detecção de microrganismos em alimentos. Entretanto, o alto nível de ATP não-microbiano encontrado em alguns alimentos limitou o seu uso. Estudos continuaram a ser feitos, e no início da década de 1990, esse método foi definitivamente implantado e reconhecido como um instrumento de medição da carga bacteriana em alimentos (GRIFFITHS, 1993; KYRIAKIDES, 1992).

VANSTAEN (1980) sugere quatro tipos de produtos em que a técnica de bioluminescência do ATP pode ser utilizada:

1. produtos que contenham só células microbiológicas, por exemplo., água processada, líquidos fermentados e culturas microbianas;
2. produtos que contenham microrganismos e células somáticas, por exemplo: leite cru, e sucos de frutas;
3. Produtos que contenham pequeno número de bactérias, por exemplo: leite pasteurizado ou esterilizado, e bebidas pasteurizadas; e
4. produtos que contenham uma mistura de microrganismos onde a detecção de um só tipo é importante, por exemplo, detecção de patógenos ou microrganismos deterioradores.

2.9.2.1. Produtos que contêm somente células microbianas

Amostras que contêm somente células microbianas são as mais simples de ser quantificadas pela detecção do ATP. Desde que MILLER et al. (1978) demonstraram que o conteúdo de ATP em leveduras é proporcional ao número de células, a quantificação de ATP tem sido usada em cervejarias para acompanhar o processo fermentativo. Esse método mostrou-se mais preciso do que o método tradicional de determinação de sólidos. A medida de ATP também tem sido usada para acompanhar o crescimento de fungos durante a produção de celulase (HYSET et al., 1976).

2.9.2.2. Produtos que contêm bactérias e células somáticas

Para produtos que contêm ao mesmo tempo microrganismos e células somáticas é preciso que seja feita uma separação antes que o conteúdo de ATP microbiano seja quantificado. Existem pelo menos duas maneiras de se fazer essa separação. Uma delas é separar os microrganismo do alimento antes da quantificação do ATP microbiano. A outra é a extração e a destruição do ATP não microbiano.

A extração seletiva e a destruição do ATP não-microbiano são possíveis porque as células somáticas são menos resistentes a agentes surfactantes do que as células microbianas. Um agente surfactante de ação moderada é adicionado à amostra com o objetivo de romper as membranas das células somáticas e liberar os ATPs. Nesse estágio, os ATPs de células somáticas podem ser medidos se for necessário.

Por exemplo, em leite cru a quantificação de ATP em células somáticas é uma alternativa para o método do *Coulter Counter* na detecção de mastite (BOSSUYT, 1978). Após a liberação do ATP não microbiano pelo rompimento seletivo das células, este pode ser destruído pela enzima *apyrase* (ATP hidrólise). Os ATPs microbiano nesse estágio podem ser quantificados após extração (BOSSUYT, 1978).

A bioluminescência do ATP tem sido registrada na literatura como método de contagem bacteriana em laticínios. Em leite cru, essa contagem chega a ser feita em apenas 10 minutos (GRIFFITHS, 1991; BAUTISTA e MCINTYRE, 1992; SUTHERLAND et al., 1994; REYBROEK e SCHARAM 1995).

O leite é incubado na presença de agente que lisa células somáticas. O lisado é filtrado em uma membrana que retém as bactérias. Os microrganismos retidos são então lisados e a quantidade de ATP é medida. Populações bacterianas maiores que 10^4 UFC podem ser detectadas com melhor precisão do que a contagem de microrganismos em cultura de ágar nutritivo. Essa técnica é recomendada para monitoramento do leite cru na plataforma, ou para acompanhar o desenvolvimento bacteriano quando o mesmo é estocado por um período longo (GRIFFITHS, 1996).

A pré-incubação do leite pasteurizado a altas temperaturas pode diminuir o tempo de liberação do produto para o mercado em dois a cinco dias, quando o monitoramento bacteriano é feito por medição do ATP. GRIFFITHS (1993) e HAWRONSKYJ et al. (1993) sugerem um método rápido e sensível de detecção de resíduos de antibióticos em leite com base na

quantificação da fluorescência do ATP em células de *Streptococcus thermophilus* durante o crescimento em amostras de leite.

O desenvolvimento de kits comerciais de medição do ATP baseados na reação da luciferina-luferase tem proliferado bastante nessa década. GRIFFITHS (1996) desenvolveu uma extensa revisão sobre o papel da bioluminescência do ATP na indústria na última década. O autor cita 8 kits que são usados pela indústria de alimentos.

Atualmente, vários pesquisadores têm recomendado esse método de medição de ATP na indústria de laticínios, não só para monitorar a carga bacteriana do leite, como também para monitorar o processo de limpeza das superfícies com as quais o leite entra em contato após a pasteurização ou esterilização (BAKER et al., 1992; BAUTISTA e MCINTYRE, 1992; GRIFFITHS, 1993; MURPHY et al., 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado em três fases. A primeira fase visou determinar a variação bacteriana entre superfícies externas das tetas de vacas durante as diversas fases de higiene do processo de ordenha. A segunda objetivou estudar a correlação entre a contagem bacteriana, determinada pela contagem-padrão, e determinação do ATP, pelo método de bioluminescência, quando utilizados para avaliar o processo de limpeza das vacas antes da ordenha. E a terceira visou conhecer os fatores de riscos, relacionados com a produção de leite com alto número de bactérias aeróbicas mesofílicas.

3.1. Experimento 1 - Variação bacteriana na superfície das tetas durante as fases de higiene da ordenha

O objetivo desse estudo foi avaliar o nível de microrganismos durante os procedimentos de preparação e de ordenha.

3.1.1. População pesquisada

O experimento foi conduzido no *Milk Technology Laboratory* do *Veterinary Medicine Teaching and Research Center*, em Tulare, estado da

Califórnia, EUA. As vacas utilizadas estavam em produção normal, com boas condições físicas de saúde e com as tetas normais sem a presença de lesões. As vacas foram mantidas em currais do tipo *dry lot* e alimentadas com feno suplementado com concentrado. As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia em dependências denominada *flat barn*.

Um grupo de cinco vacas da raça holandesa (*Hostein*) em diferentes períodos de lactação foi usado nesse experimento. O estudo foi baseado no modelo estatístico de medidas repetidas onde os animais foram considerados as unidades experimentais e cada uma dessas unidades experimentais participou do tratamento em diferentes repetições. As séries de observações feitas em cada unidade experimental foram consideradas dependentes ou relacionadas entre si.

O número de amostras ou repetições foi estabelecido com base na quantidade de observações suficientes para mostrar a diferença entre as duas médias, do número de bactérias presente nas tetas das vacas nas diversas fases da ordenha. Esse número de amostras foi calculado com dados obtidos em estudos preliminares e aplicando a seguinte fórmula (DANIEL, 1998):

$$n = \frac{2(\alpha + \beta)^2 \hat{\sigma}^2}{\Delta^2}$$

em que

n = número de amostras ou repetições;

α = erro do Tipo I igual a 0,98;

β = erro do Tipo II igual a 0,80;

$\hat{\sigma}^2$ = variância dos dados igual 0,50; e

Δ^2 = diferença que se pretende detectar no número de bactérias entre as fases de limpeza das tetas igual a 0,25.

3.1.2. Amostragem durante os diversos eventos da ordenha

Foram avaliados quatro eventos da ordenha: pré-lavagem, pós-sanitização, pré-ordenha e pós-ordenha. A primeira amostragem da superfície externa da teta foi obtida enquanto a vaca estava no curral (pré-lavagem). A segunda amostragem (pós-lavagem) foi obtida após a limpeza do úbere com água e a secagem natural do mesmo por 20 minutos.

Após a obtenção da segunda amostra as tetas dos animais foram imersas rapidamente em uma solução glicerizada sanitizante de iodo a 0,1%. Esta solução permaneceu nas tetas por aproximadamente 30 segundos. O excesso de iodo foi removido das tetas com toalhas de papel.

Após esse estágio e imediatamente antes do acoplamento da ordenhadeira, a terceira amostra foi obtida (pós-sanitização ou pré-ordenha). A última amostra, que representou o estágio de pós-ordenha, foi obtida imediatamente após a retirada da ordenhadeira da teta.

Amostras foram coletadas por quatro dias consecutivos. No primeiro dia a teta dianteira esquerda foi escolhida como a primeira a ser amostrada na pré-limpeza. A segunda amostragem foi realizada na teta adjacente seguindo o sentido horário. Amostras subsequentes foram tomadas nas tetas adjacentes seguindo o mesmo sentido (Quadro 1).

Quadro 1 - Resumo da seqüência de amostragem usada para avaliar a população bacteriana das tetas das vacas durante o processo de ordenha pelo método de contagem padrão em placas

Estágios da Ordenha	Seqüência de Obtenção de Amostras das Tetas			
	1º Dia	2º Dia	3º Dia	4º Dia
Pré-lavagem ¹	Frontal Esquerda (FE)	Frontal Direita (FD)	Traseira Direita (TD)	Traseira Esquerda (TE)
Pós-lavagem ²	FD	TD	TE	FE
Pós-sanitização ³	TD	TE	FE	FD
Pós-ordenha ⁴	TE	FE	FD	TD

¹ As amostras foram obtidas enquanto as vacas estavam no curral. ² As amostras foram obtidas após lavagem e secagem natural das tetas das vacas, enquanto as mesmas se encontravam na sala de ordenha. ³ As amostras foram obtidas após sanitização das tetas com solução de iodo a 0,1% e secagem com toalhas de papel. ⁴ As amostras foram obtidas após a retirada dos bicos da máquina de ordenha das tetas.

3.1.3. Contagem bacteriana

Para obtenção da amostra em cada estágio da ordenha um *swab* de algodão (*Cotton Tipped Applicators, Moore Medical Corporation. New Britain, CT 06050 USA*) embebido em solução estéril de sal/peptona/tiosulfato (0,85% cloreto de sódio e 0,1% de proteose peptona, 0,2% tiosulfato de sódio) foi aplicado em movimentos verticais em uma área de 2,5 cm² de uma pré-determinada teta (RENDOS et al., 1975). Para padronização da área amostrada foi usado um molde confeccionado com plástico maleável com dimensões externa de 5 x 5 cm e orifício de 1,5 x 1,6 cm. A área próxima ao esfíncter foi evitada.

Após a coleta da amostra o *swab* foi separado da haste de madeira e foi transferido para um tubo contendo 1 mL da solução salina mencionada anteriormente. Os tubos contendo o *swab* foram armazenados em recipientes contendo gelo, por no máximo 4 horas, até que as análises microbiológicas fossem realizadas.

Os tubos contendo o *swab* foram agitados de modo a permitir a distribuição da amostra antes das etapas de diluições posteriores. Alíquotas das diluições decimais foram semeadas em duplicatas no meio de cultura para a contagem padrão em placas (*Standard Methods Agar*, difco catálogo número B12455). As placas semeadas foram incubadas à 32° ± 1°C, por 48 ± 3 horas. As placas, contendo entre 25 e 250 colônias, foram selecionadas para contagem do número de microrganismos (HOUGHTBY et al., 1993).

3.1.4. Análise dos dados

Os resultados da contagem bacteriana foram expressos como unidade formadora de colônias, por cm² de área amostrada (UFC/cm²). A variação bacteriana entre as tetas nas diversas fases da ordenha foi determinada pela análise de variância para medidas repetidas, usando o logaritmo decimal dos dados porque esses não apresentaram uma distribuição normal. A unidade de

observação repetida foi a vaca, ou seja, a série de amostras (pré e pós-lavagem e pré e pós-ordenha), obtidas em cada vaca em dias diferentes, foram consideradas medidas repetidas. A série de amostras obtida em cada animal foi considerada dependente e independente do dia de coleta. As análises foram processadas pelo *Statistical Analysis System* (SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA).

3.2. Experimento 2 - Comparação entre a população bacteriana das tetas determinada pelo método de semeadura em placas (*Standard Plate Count*) e com o método de medição da bioluminescência (no *Luminator KTM*)

3.2.1. Amostra e tratamentos pré-ordenha

O experimento foi realizado em 39 fazendas, que possuem diferentes procedimentos nas fases de pré-limpeza da ordenha. Em cada fazenda, foram selecionadas cinco vacas que possuíam as mesmas condições de saúde das vacas amostradas no Experimento 1.

Em algumas fazendas, os animais eram transferidos para uma sala de lavagem, onde as tetas dos animais foram lavadas com jatos de água. Após a lavagem, os animais eram transferidos para a sala de espera, na qual, a secagem acontece naturalmente.

Após a secagem, os animais eram transferidos para a sala de ordenha, onde as tetas são sanitizadas com solução a base de iodo, ácido láctico ou peróxido de hidrogênio. O excesso de sanitizante, geralmente, é retirado com toalhas de papel ou algodão.

O acoplamento dos bicos da ordenhadeira ocorreu logo após a sanitização. Em outras fazendas, a fase de sanitização não acontece, as tetas dos animais são apenas lavadas e secas naturalmente antes da ordenha.

TM Charm Corporation, 36 Franklin St. Malden MA 02148 USA.

3.2.2. Amostragem durante os diversos eventos da ordenha

As amostras, para as análises microbiológicas de bioluminescência, foram obtidas da mesma maneira e nos mesmos estágios de ordenha descritos no Experimento I; exceção feita para a sequência de amostragem das tetas, onde as dianteiras esquerdas foram sempre amostradas no evento de pré-lavagem. Para os eventos subsequentes, as tetas foram amostradas seguindo o sentido horário. Essa sequência foi repetida em todos os animais.

Em áreas adjacentes e semelhantes foram utilizados dois tipos de *swab*: um de algodão igual ao usado no Experimento 1, e o outro do tipo denominado *PocketSwabs*[®] (marca registrada da *Charm Corporation*, 36 Franklin St. Malden MA 02148 USA), que é um tipo especial de *swab* para ser usado com o aparelho denominado *Luminator K* (*Charm Corporation*, 36 Franklin St Malden MA 02148 USA).

Após a amostragem, o *swab* de algodão recebeu o mesmo tratamento recebido no Experimento 1, enquanto o *PocketSwab* foi apenas mantido em recipiente isotérmico com gelo, por período que não excedeu 60 minutos, até que a bioluminescência fosse medida no laboratório, usando o aparelho *Luminator K*. As amostras coletadas com *swab* de algodão foram analisadas para determinação do número de bactérias aeróbicas mesofílicas, pelo método da contagem-padrão em placas, de acordo com HOUGHTBY et al. (1993).

3.2.3. Análise dos dados

Os resultados das análises de bioluminescências foram expressos como unidades de luminescência relativa, por área amostrada (ULR/cm²). A população bacteriana, determinada pela contagem-padrão em placas, foi expressa como unidades formadoras de colônia, por área amostrada (UFC/cm²). Ambos ULR/cm² e UFC/cm² foram transformados em logaritmo decimal, para as análises estatísticas.

O efeito da limpeza das tetas das vacas, durante as fases da ordenha nos valores de ULR e UFC, foi calculado usando a análise variância (ANOVA), onde as fazendas foram consideradas como o efeito aleatório e os eventos da ordenha os efeitos fixos. A média dos quadrados mínimos para ambos ULR e UFC também foi calculada pela ANOVA.

O modelo de regressão linear foi ajustado com a variável dependente UFC e a variável independente ULR. A sensibilidade e especificidade do método de bioluminescência, quando comparado com a contagem bacteriana, foi avaliado após os dados serem distribuídos em tabela de contingência 2 x 2 (SMITH, 1995). Todas as análises foram feitas pelo programa de análise estatística *Statistical Analysis System* (SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA).

3.3. Fatores de riscos para a produção de leite com alto número de bactérias mesofílicas aeróbias

3.3.1. A população pesquisada

Os produtores que participaram desse estudo se encontravam entre os 244 produtores que fornecem leite para uma cooperativa, localizada no sudoeste do *San Joaquin Valley*, na Califórnia – EUA.

Semanalmente, ou de acordo com a qualidade do leite de cada produtor, essa cooperativa faz as análises do número de bactérias aeróbias mesofílicas (determinado pelo método do *Standard Plate Count* (CTP)), bactérias termodúricas (determinado pelo método do *Laboratory Pausterization* (LB)), bactérias do grupo coliformes e células somáticas no leite de conjunto do tanque de estocagem, de cada produtor. Esses resultados são usados pela cooperativa para estabelecer os padrões de qualidade do leite recebido de cada produtor.

A seleção dos produtores que participaram desse estudo foi feita da seguinte maneira: os dados referentes ao número de bactérias aeróbias mesofílicas, bactérias termodúricas, bactérias do grupo coliformes e células somáticas no leite de conjunto do tanque de estocagem, do período de um ano,

de cada produtor, foram fornecidos pela cooperativa. Esses dados foram armazenados num banco de dados compatível com o programa *Statistical Analysis System* (SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA).

Usando o programa estatístico SAS e por meio da análise descritiva de dados contínuos, foi calculada a média do período de um ano, de cada um dessas características, para cada produtor. As médias dessas características, de cada produtor, foram submetidas novamente à análise descritiva e os valores máximos, mínimos e intermediários de cada característica foram identificados, ou seja, os dados foram distribuídos em quartis. A identificação dos produtores que faziam parte desses quartis foi possível também com a utilização de recursos do programa estatístico SAS.

Após a identificação da população de cada quartil de cada característica, foi estabelecido um modelo de estudo como caso-controle. O “caso” foi definido como o grupo de fazendas que estavam no quartil maior do número de bactérias mesofílicas aeróbias (CTP) presentes no leite nos últimos 12 meses, e foi chamados grupo com maior CTP.

O controle foi definido como as fazendas que estavam no quartil menor do número de bactérias mesofílicas aeróbias presentes no leite nos últimos 12 meses, e foi chamado de fazendas com menor CTP. As fazendas que foram selecionadas para cada grupo, além de estarem no maior e menor quartil do número de bactérias mesofílicas, também deveriam estar no maior ou menor quartil da contagem de termodúricos, coliformes e células somáticas.

Para o cálculo do número de fazendas participantes em cada quartil, levou-se em consideração a prática de higiene durante a ordenha, com ênfase especial para o processo de *predipping*, que é o processo de sanitizar as tetas, antes da ordenha, com alguma substância com poder bactericida.

Foi estimada razão de risco igual a 5,0, ou seja, as fazendas que não sanitizam as tetas dos animais antes da ordenha têm cinco vezes mais chances de estarem no grupo de maior CTP. Foi adotado o nível de 0,1 para o erro tipo I e 0,2 para o erro tipo II.

Considerou-se também a prevalência para *predding* de 0,67 no grupo de baixo CTP. Com esses dados, foi calculado um número de 25 fazendas para cada grupo. O programa usado foi o Epi Info versão 6.04 (*Center of Disease Control*, Atlanta - EUA).

3.3.2. Investigação pelo questionário

Um questionário foi desenvolvido e aplicado em cinco fazendas antes do início desse estudo. Este pré-estudo serviu de base para a seleção das perguntas e observações feitas em cada fazenda. Algumas perguntas e observações foram feitas com o objetivo de descrever em detalhes os procedimentos de ordenha e o manejo das instalações das vacas produtoras de leite.

O principal investigador preencheu o questionário ao entrevistar o administrador ou o dono da fazenda e também ao fazer observações dos procedimentos de ordenha. O questionário foi aplicado uma vez em cada fazenda, no mesmo dia em que foi feita a coleta de material para a análise microbiológica, a ser descrita.

3.3.3. Análise microbiológica

Em cada fazenda foi avaliado o número de bactérias aeróbias encontradas nas tetas das vacas, nas diversas fases da ordenha. Foram avaliados quatro eventos da ordenha: pré-lavagem, pós-lavagem, pós-sanitização pré-ordenha e logo após a retirada da ordenhadeira.

A primeira amostragem da teta foi obtida enquanto a vaca estava no curral (pré-lavagem). A segunda amostra (pós-lavagem) foi obtida após a limpeza do úbere, quando os animais já estavam na sala de ordenha. Nas fazendas que sanitizavam as tetas antes da ordenha (*pré-dip*), foi coletada uma amostra após esse processo (pré-ordenha). A última amostra, que representou o estágio de pós-ordenha, foi obtida imediatamente após a retirada da ordenhadeira da teta.

As amostras foram tomadas sistematicamente começando pela teta dianteira esquerda para a primeira amostra na pré-lavagem. As outras amostras foram obtidas nas tetas adjacentes, seguindo o sentido horário para as outras tetas. Esta sistemática foi usada nos outros eventos da ordenha.

Para obtenção da amostra em cada estágio da ordenha foi aplicado, em movimentos verticais, em uma área de 2,5 cm² um *swab* de algodão (*Cotton Tipped Applicators, Moore Medical Corporation, New Britain, CT 06050 USA*), embebido em uma solução estéril de sal/peptona/tiosulfato (0,85% cloreto de sódio e 0,1% de proteose peptona, 0,2% tiosulfato de sódio) (RENDOS et al., 1975). Para padronização da área amostrada, foi usado um molde confeccionado com plástico maleável, com dimensões externa de 5 x 5 cm e orifício de 1,5 x 1,6 cm. A área próxima ao esfíncter foi evitada.

Após a coleta da amostra, o *swab* foi separado da haste de madeira, e transferido para um tubo contendo 1,0 mL da solução salina, mencionada anteriormente. Os tubos, contendo o *swab*, foram armazenados em recipientes isotérmicos contendo gelo, por um período máximo de quatro horas.

O número de bactérias mesófilas aeróbias foi determinado pelo método *Standard Plate Count*, de acordo com HOUGHTBY et al. (1993). Os tubos, contendo o *swab*, foram agitados de modo a permitir a distribuição da amostra antes da diluição. Aliquotas das diluições decimais foram semeadas em duplicatas no meio de cultura para a contagem-padrão em placas (*Standard Methods Agar*, Difco catálogo número B12455). As placas semeadas foram incubadas à 32° ± 1°C, por 48 ± 3 horas. As placas, contendo entre 25 e 250 colônias, foram selecionadas para contagem do número de microrganismos (HOUGHTBY et al., 1993).

3.3.4. Análise estatística dos resultados

Os resultados obtidos com o questionário foram armazenados em um banco de dados e analisados por meio do programa estatístico SAS. Foram realizadas análises descritivas e tabelas de contingência, para caracterizar a

distribuição das fazendas nos quartis e relacioná-las com as práticas de ordenha e manejo das vacas.

As variáveis, que foram obtidas com o questionário, foram testadas no modelo de regressão logística multivariada. O efeito conjunto dessas variáveis na qualidade do leite, em termos do número de bactérias aeróbias, ou seja, no grupo de estudo de caso (fazendas com alto número de bactérias no leite conjunto) foi estimado. Os resultados dessas análises foram expressos como fatores de riscos, com 90% intervalo de confiança.

O modelo testado foi o seguinte:

$$\text{Logit } P(X) = \alpha + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 A \times B \quad (\text{KLEINBAUM, 1994})$$

em que

$P(X)$ = riscos oferecidos pelas variáveis A e B codificadas como 0 ou 1;

α = coeficiente do ângulo de intersecção; e

β = coeficiente para as variáveis A e B.

O modelo final foi obtido com a eliminação de variáveis em que os coeficientes eram não-significantes no teste de Wald.

Os dados obtidos com as análises microbiológicas foram expressos como unidades formadoras de colônia por cm^2 (UFC/ cm^2) e foram normalizados pela transformação em $\log_{10}$ porque os dados não apresentaram uma distribuição normal. Para calcular a influência da limpeza no número de bactérias das tetas dos animais nas diferentes fases da ordenha, os dados foram submetidos à análise de variância, por meio do qual foram testados os efeitos da fazenda, animal e eventos da ordenha na população bacteriana da teta da vaca.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Variação na contagem de bactérias mesófilas da superfície das tetas durante as fases de higiene da ordena

Em cinco animais foram coletadas 104 amostras da superfície das tetas das vacas em cada evento da ordenha. A média dos valores do $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$ das bactérias mesófilas aeróbias, encontradas na superfície das tetas das vacas, encontra-se no Quadro 2.

O modelo matemático final, correlacionando o $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$, em função do quarto amostrado, tendo os eventos da ordenha como medidas repetidas, apresentou resultado não-significativo, quando comparado com o mesmo modelo sem o efeito do quarto amostrado ($P>0,1$); ou seja, os valores do $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$ não dependem da teta amostrada.

Existe, porém, uma ligeira tendência de maior concentração bacteriana nas tetas traseiras (Quadro 2). Essa tendência deve servir para direcionar futuras investigações da carga bacteriana das tetas, onde a ordem de amostragem deve ser fixa para todos os animais. Esse procedimento evitará possíveis erros de tendências das tetas amostradas.

Quadro 2 - Valores médios do $\log_{10}$ UFC/cm² das bactérias aeróbias mesofílicas encontradas em cada teta¹. Usou-se ANOVA para medidas repetidas

Teta Amostrada ²	N	Log ₁₀ UFC/cm ² das Médias	Diferença entre as Médias	Probabilidade da Diferença*
Dianteira esquerda	26	1,75	Controle	...
Dianteira direita	26	1,70	-0,05	0,60
Traseira direita	26	1,89	0,14	0,21
Traseira esquerda	26	1,88	0,13	0,24

* Dados comparados com o valor médio da teta dianteira esquerda.

¹ As medidas repetidas foram os dados coletados no animal em cada evento da ordenha. Usou-se a matriz de primeira ordem com estrutura de covariância autoregressiva.

² Comparando os modelos com e sem tetas amostradas, temos como resultado. -2 log Verossimilhança dos Resíduos $\chi^2 = 4,8$; gl=3; P > 0,1.

4.2. Comparação entre a população bacteriana das tetas realizada pela contagem-padrão em placas e pela medição da bioluminescência (quantificada pelo *Luminator KTM*)

A superfície das tetas foi sistematicamente amostrada para a contagem bacteriana e para a medição da bioluminescência do ATP bacteriano. As médias dos logaritmos decimais da UFC/cm² e da ULR/cm², nos eventos de pré e pós-ordenha, encontram-se no Quadro 3. Como era esperado, os resultados de UFC e ULR diminuem progressivamente à medida que os animais são preparados para a ordenha, desde a pré-lavagem, onde os animais estão no curral, passando pela pós-lavagem e pós-sanitização.

As médias dos quadrados mínimos dos valores de UFC no evento de pré e pós-lavagem (pré-ordenha) e pós-sanitização (pré-ordenha) são estatisticamente diferentes, porém não existe diferença entre os valores da pós-sanitização (pré-ordenha) e pós-ordenha (P > 0,1). Para os valores de ULR também existe uma significativa redução na sequência dos eventos de pré e pós-lavagem e pós-sanitização, mas na pós-ordenha os valores de ULR os resultados aumentaram (P < 0,1). A explicação para esse aumento é provavelmente pelo fato de a reação de bioluminescência ser proporcional à

TM Charm Corporation, 36 Franklin St, Malden MA 02148 USA.

Quadro 3 - Quantificação das UFC/cm² e das ULR/cm² da superfície externa das tetas, durante os procedimentos de higiene da ordenha. Os valores apresentados são as médias dos valores do log₁₀ULR/cm² e log₁₀UFC/cm² nos eventos de pré-ordenha e pós-ordenha^{1,2}. Dados coletados em 195 vacas provenientes de 39 fazendas

Evento	N	Log ₁₀ ULR/cm ²	Diferença entre as Médias	P ³	Log ₁₀ UFC/cm ²	Diferença entre as Médias	P ³
Pré-lavagem	195	2,22	0,39	< 0,001	1,99	0,68	< 0,001
Pós-lavagem (pré-ordenha) ⁵	195	1,99	0,16	< 0,001	1,53	0,22	< 0,001
Pós-sanitização ⁴ (pré-ordenha)	55	1,83	Controle		1,31	Controle	
Pós-ordenha	195	1,98	0,15	<0,001	1,35	0,04	<0,40

¹ Comparando o modelo ULR/cm² com e sem a variável evento tem-se: -2 log Verossimilhança dos Resíduos = $\chi^2 = 265,8$; gl = 3; P<0,001.

² Comparando o modelo UFC/cm² com e sem a variável evento tem-se: -2 log Verossimilhança dos Resíduos $\chi^2 = 409,7$; gl = 3; P<0,001.

³ Probabilidade das médias serem diferentes ao nível de 90% pelo teste de Tukey.

⁴ Apenas 11 fazendas sanitizam as tetas dos animais antes da ordenha.

⁵ A partir desse ponto as tetas das vacas foram consideradas limpas.

quantidade de ATP, que pode ser de qualquer fonte não-específica. Portanto, as células somáticas e bacterianas, presentes no resíduo de leite, que permanecem nas tetas após a ordenha, estão contribuindo com ATP não-bacterianos nas amostras de pós-ordenha (STANNARD e GIBBS, 1986).

Na análise de regressão dos valores do log₁₀ UFC /cm² *versus* log₁₀ ULR/cm², usou-se os valores de UFC e ULR obtidos nos eventos de pré-lavagem, pós-lavagem e pós-sanitização (BAUTISTA et al., 1992). Os valores do evento da pós-ordenha foram excluídos por causa dos ATPs não-bacterianos, que estavam presentes nas células somáticas dos resíduos de leite. Estes podem permanecer nas tetas após a ordenha e reduzir a correlação entre os resultados destas duas análises.

A equação de regressão estimada foi:

$$\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2 = -0,86 + 1,24\log_{10}\text{ULR}/\text{cm}^2$$

$$r = 0,80$$

-2 log Verossimilhança dos Resíduos $\chi^2 = 244,9$ g l = 3 P<0,001.

Essa equação indica que o método de medição do ATP, através da bioluminescência, foi relativamente menos sensível em detectar as mudanças do número de bactérias nos eventos de pré-ordenha do que o método de enumeração das bactérias por contagem-padrão em placas. A melhor predição do $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$ está nos valores menores do $\log_{10}\text{ULR}/\text{cm}^2$ ($<2,25$). Isto está ilustrado nas Figuras 2 e 3. A Figura 2 mostra que os valores determinados neste trabalho para o $\log_{10}\text{ULR}/\text{cm}^2$ alcançaram no máximo o valor de $2,3 \log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$.

A Figura 3 demonstra que os valores máximos previstos de $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$ estão em torno de $2,0 \log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$. Demonstra, ainda, que os valores previstos do $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$ são mais precisos para valores menores do $\log_{10}\text{ULR}/\text{cm}^2$, pois existe maior dispersão de resíduos em valores mais altos do $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$.

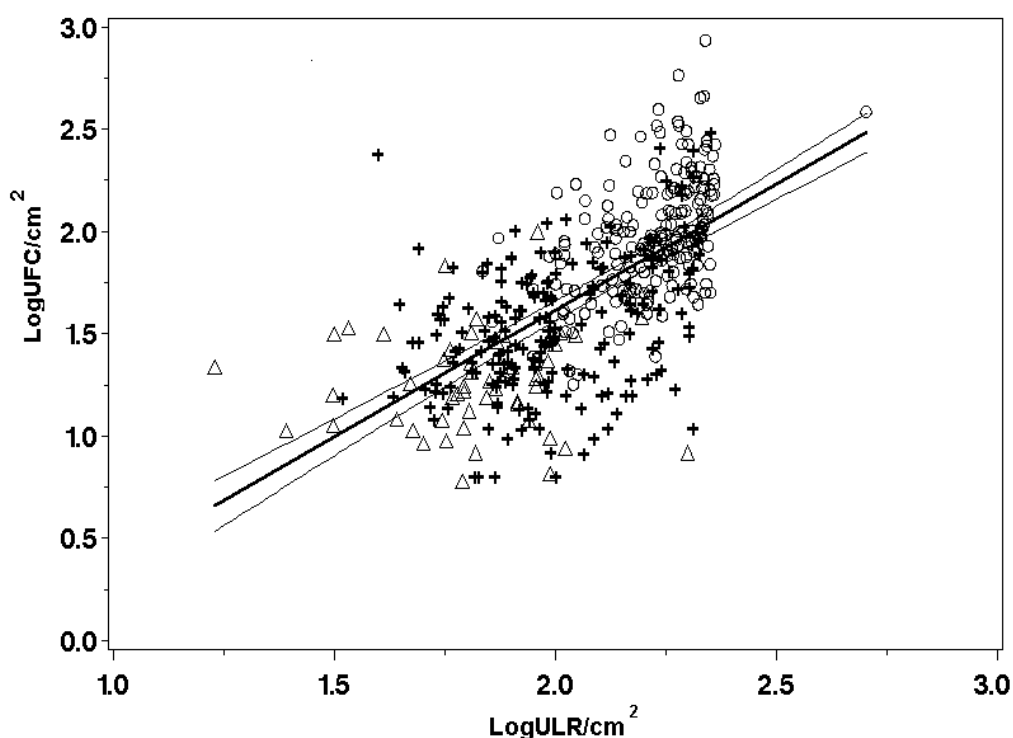


Figura 2 – Regressão linear (—) do $\log_{10}\text{ULR}/\text{cm}^2$ versus o $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$, com as linhas dos limites de confiança de 90 % (.....). A equação calculada foi: $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2 = -0,86 + 1,24 * \log_{10}\text{ULR}/\text{cm}^2$, $r = 0,80$. o = Valores das amostras da pré-lavagem, Δ = pós-lavagem, + = pré-ordenha (após sanitização).

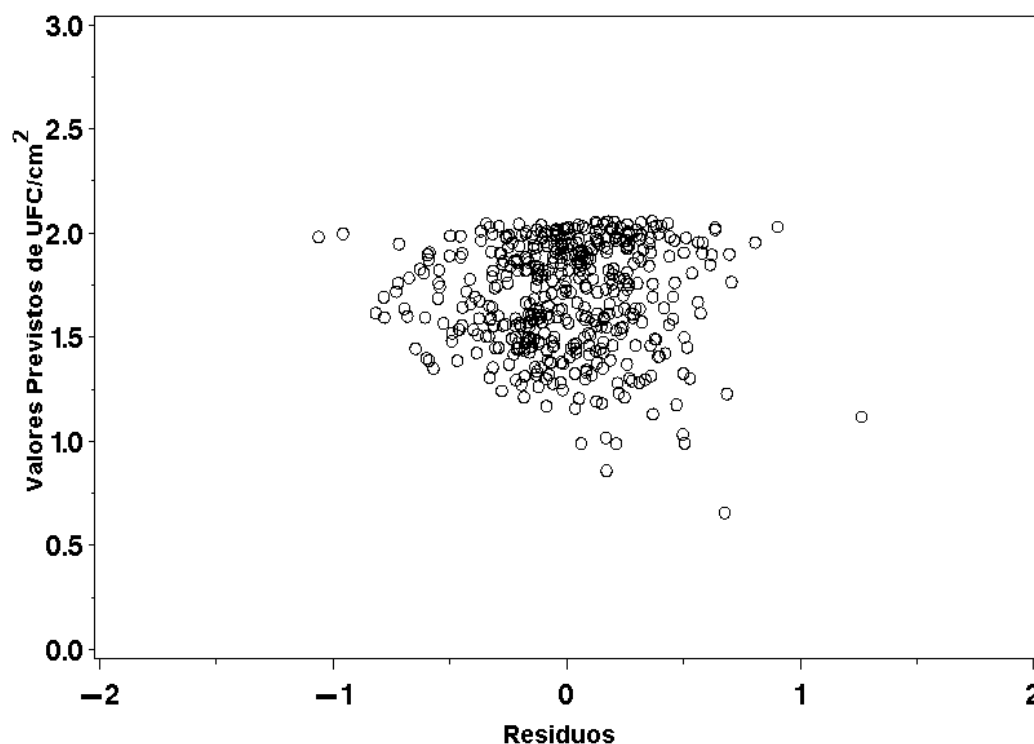


Figura 3 – Correlação dos valores estimados do $\log \text{UFC/cm}^2$, obtidos com a regressão do $\log_{10} \text{ULR/cm}^2$ versus o $\log_{10} \text{UFC/cm}^2$, calculados para os valores residuais dessa mesma regressão.

A grande variação dos resultados da bioluminescência pode ter sido influenciada por fatores como a presença de células somáticas e as diferentes respostas à quantificação dos ATP, por diferentes tipos de bactérias. Os testes de bioluminescência têm sido aperfeiçoados para eliminar os ATPs oriundos de células somáticas para quantificar apenas os ATPs bacterianos.

Estes testes aperfeiçoados talvez possam eliminar as variações encontradas nesse estudo. SIRAGUSA et al. (1995) reportaram coeficientes de correlação maiores que 0,90 na detecção de bactéria em carcaças de boi e porco quando extraiu das amostras o ATP não-bacteriano presente nas células somáticas.

Na Figura 3 pode-se observar que existem algumas amostras que tiveram resultados altos de UFC e ao mesmo tempo resultados baixos de ULR. Deve-se considerar que no meio de cultura não só as células de bactérias, mas

também os esporos encontram condições propícias ao crescimento. Essas amostras que tiveram baixos valores de UFC e ao mesmo tempo altos valores de ULR, provavelmente, possuíam alto número de esporos.

Os esporos são pobres em ATP e quando exposto à reação do complexo enzimático da luciferina-luciferase produzem menos luminescência, quando comparado com as células vegetativas (SETLOW, 1983). Outra explicação para a baixa correlação de luminescência é que as células de bactérias que passaram por estresse também contém pouco ATP (KYRIAKIDES et al., 1991).

Resultados semelhantes também foram encontrados por BAUTISTA e MCINTYRE (1992), quando compararam os dois métodos para a detecção de bactérias em superfícies de aço inoxidável. Esses pesquisadores usaram um método não-seletivo de detecção do ATP. Os autores analisaram 205 amostras de superfície de equipamentos em laticínios e 18 apresentaram-se limpas pela detecção do ATP, mas foram consideradas não-limpas pela contagem total em placas.

Na Figura 3 pode-se ainda observar que outras amostras tiveram resultados baixos de contagem-padrão em placas e resultados altos de luminescência. Isso talvez possa ser explicado pela presença de ATP de origem não-bacteriana na amostra.

Alguns pesquisadores têm testado kits de reação para detecção de ATPs bacterianos em amostras que possuem ATP de origem não-bacteriana. Esses kits permitem uma separação entre os ATPs de células somáticas e ATPs de origem bacterianas. Fazem parte desses kits substâncias que rompem seletivamente a membrana celular das células somáticas e conseqüentemente liberam o ATP não-bacteriano.

Através da filtração das amostras tratadas, as bactérias são retidas em filtros e os resíduos de células somáticas e respectivos ATPs são descartados. Nesse estágio, a amostra possui apenas os ATPs bacterianos, os quais são submetidos à reação com o complexo enzimático luciferina-luciferase e a emissão de luminescência é quantificada (STANNARD e GIBBS, 1986;

BAUTISTA e MCINTYRE 1992; KYRIAKIDES, 1992; MURPHY et al., 1998).

O uso de um desses kits permitiu que SIRAGUSA et al. (1995) obtivessem correlações acima de 90% entre a enumeração de bactérias em placas de meio de cultura e a medição do ATP na carcaça de porco e boi, respectivamente. Já para amostras de leite cru, BAUTISTA et al. (1992) encontraram baixas correlações entre a bioluminescência e a contagem bacteriana (0,65 a 0,78%), mesmo tendo usado um método seletivo de detecção de ATP bacteriano pela luminescência.

Embora a metodologia de medição dos ATPs usada nesse experimento não tenha sido seletiva só para ATP bacteriano, e embora o modelo de regressão linear do $\log_{10}\text{ULR}/\text{cm}^2$ em função do $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$ tenha apresentado baixa correlação (0,80), o mesmo ilustra a performance do método de bioluminescência e sugere que em valores médios da curva a medição de bioluminescência pode ser útil no monitoramento da limpeza das tetas da vaca nos eventos de pré-ordenha.

Para avaliar a sensibilidade e a especificidade do método de bioluminescência para a enumeração de bactérias nas tetas das vacas durante a pré-ordenha, o método da contagem-padrão em placas foi usado como método-padrão. A sensibilidade e a especificidade são valores que medem a habilidade de um método de análise em correlacionar com um método-padrão. Nesse trabalho, é a capacidade do método de bioluminescência de avaliar a quantidade de bactérias presentes na superfície externa das tetas dos animais nas diversas fases da ordenha.

Tanto a sensibilidade como a especificidade são dependentes do ponto de corte dos resultados. Ponto de corte é o valor ou a resposta a um tratamento a partir do qual é considerada positiva ou negativa. Os pontos de corte usados nesse experimento foram os valores da média dos $\log_{10}\text{ULR}/\text{cm}^2$ e dos $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$ encontrados após lavagem e secagem das tetas dos animais. Para o $\log_{10}\text{ULR}/\text{cm}^2$ o valor encontrado foi 1,99 e para o $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$ 1,53. Esses pontos de corte estão demonstrados na Figura 4.

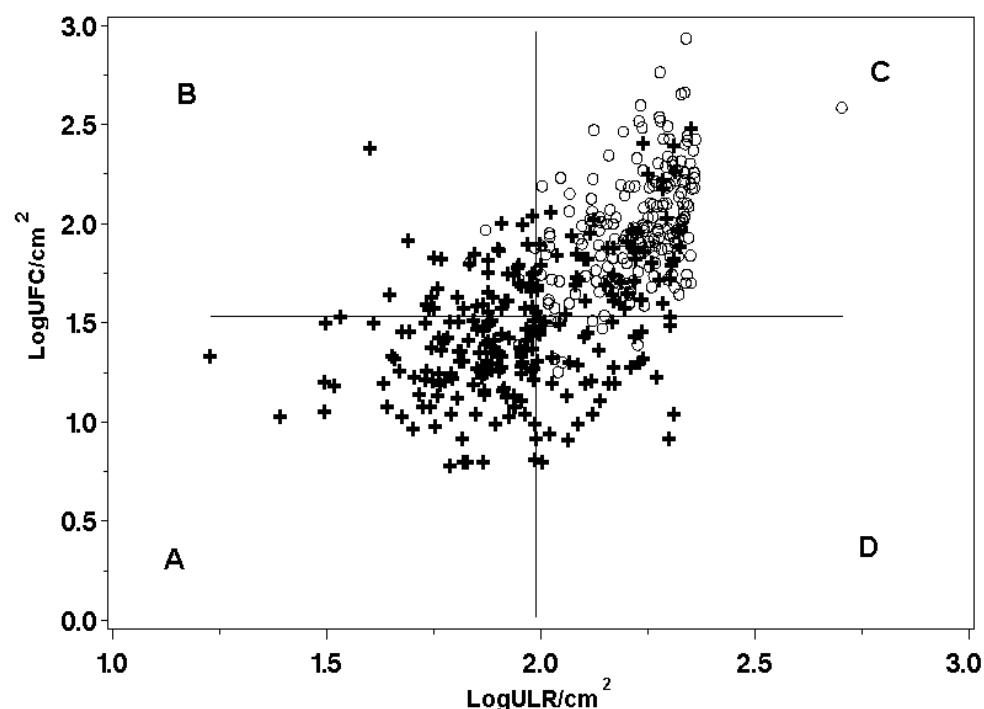


Figura 4 - *Scatter plot* do $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$ contra o $\log_{10}\text{ULR}/\text{cm}^2$. As linhas perpendiculares representam os valores dos pontos de corte a partir dos quais as tetas das vacas foram consideradas limpas, ou seja, amostras com resultados inferiores a $1,53 \log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$ e inferiores a $1,99 \log_{10}\text{ULR}/\text{cm}^2$. No quadrante **A**, encontram-se as amostras positivas (limpas pelo dois métodos), no quadrante **B**, as falsas positivas (consideradas sujas pelo método do CPP e limpas pelo método da bioluminescência), no quadrante **C**, as negativas (sujas por ambos os métodos) e no quadrante **D**, as falsas negativas (limpas pelo método do CPP e sujas pelo método da bioluminescência). o = amostras da pré limpeza; + = Amostras da pós-limpeza e pré-ordenha (depois da sanitização)

O número de amostras que foram consideradas limpas e não-limpas pelos métodos de contagem-padrão em placas e da bioluminescência, e também o número de amostras que são discordantes entre os dois métodos estão no Quadro 4. A sensibilidade calculada foi de 0,71 (115/161, 90% IC = 0,65-0,77); a especificidade foi de 0,83 (235/284, 90% IC = 0,79-0,86).

Os valores de sensibilidade e especificidade não indicam uma boa performance do método de bioluminescência, o método de bioluminescência é conservativo e raramente classifica as tetas das vacas como limpas antes da

Quadro 4 – Resultados da classificação da limpeza das tetas pelo método da contagem-padrão em placas e pelo método da medição do ATP bacteriano através da bioluminescência, durante eventos do processo de ordenha

Contagem-Padrão em Placas				
		Limpas	Não Limpas	Total
Bioluminescência	Limpas	115 ¹	49	164
	Não limpas	46	235 ²	281
Total		161	284	445

Concordância = 79 %

¹ Número de tetas que foram consideradas limpas pelos dois métodos, usando como critério de corte a média dos quadrados mínimos dos valores encontrados após a lavagem e secagem das tetas: $< 1,99 \log_{10} \text{ULR/cm}^2$ para a bioluminescência e $< 1,53 \log_{10} \text{UFC/cm}^2$ para a contagem total em placas.

² Número de tetas que foram consideradas não limpas pelos dois métodos, usando como critério de corte a média dos quadrados mínimos dos valores encontrados após a lavagem e secagem das tetas: $> 1,99 \log_{10} \text{ULR/cm}^2$ para a bioluminescência e $> 1,53 \log_{10} \text{UFC/cm}^2$ para a contagem total em placas.

limpeza e também raramente classifica as tetas das vacas como sujas quando as mesmas estão limpas (Figura 4). A concordância da classificação do estado de limpeza determinada pelos dois métodos foi de 79% (Quadro 4).

Resultados semelhantes foram encontrados por MURPHY et al. (1998), quando compararam o método da contagem-padrão em placas com a detecção de ATP em superfície de aço inoxidável. Eles também usaram um kit que não fazia a prévia separação dos ATPs bacterianos dos ATPs das células somáticas. Os autores analisaram amostras retiradas após a limpeza de superfícies de equipamentos e de tubulações de leite pasteurizado. A concordância entre os dois métodos foi de 74%.

Já BAUTISTA et al. (1992) utilizaram um kit de medição de ATPs que faz uma separação prévia dos ATPs bacterianos antes da medição da bioluminescência. As amostras investigadas foram leite cru, leite pasteurizado, e superfícies de equipamentos de laticínios após a limpeza. A concordância entre o método da contagem-padrão em placas e o método da medição do ATP foi de 78% para as amostras de leite cru e 74% para as amostras de superfícies dos equipamentos.

4.3. Análise de fatores de riscos

4.3.1. Análises descritivas das fazendas

A concentração elevada de bactérias no leite pode afetar adversamente a sua qualidade. As bactérias podem causar envelhecimento prematuro, reduzir a vida de prateleira dos produtos derivados de leite, reduzir rendimento industrial de queijos e leite em pó, entre muitas outras conseqüências. *O Pasteurized Milk Ordinance* estabelece nos Estados Unidos da América que o número de bactérias mesofílicas aeróbias que podem ser encontradas no leite cru é de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL.

Entretanto os estabelecimentos que processam o leite estabelecem os suas próprias especificações bacteriológicas que são sempre mais rigorosos. O Quadro 5 mostra as especificações de qualidade usados pela Cooperativa situada no sudoeste do *San Joaquim Valley*, na Califórnia - EUA para avaliar a qualidade de leite de cada fazenda produtora.

Quadro 5 – Especificações de qualidade de leite para o número de bactérias aeróbias mesofílicas, bactérias termodúricas, bactérias do grupo dos coliformes, e número de células somáticas utilizados pela Cooperativa Cooperativa situada no sudoeste do *San Joaquim Valley*, na Califórnia-EUA, para classificar o leite fornecido pelos associados

	Classificação			
	Excelente	Bom	Razoável	Ruim
Contagem total em placas (CTP) (UFC)/mL	< 5.000	5.000 - 15.000	16.000-30.000	31.000-50.000
Bactérias termodúricas (UFC/mL)	< 100	100 - 200	210 – 400	410 - 750
Coliformes (UFC/mL)	< 50	50 - 100	110 – 300	310 - 750
Células somáticas unidades/mL (x 1.000)	< 125	125 - 200	201 – 350	351 - 450

¹ Dados fornecidos pela cooperativa situada no *San Joaquim Valley*, na Califórnia-USA.

No caso da Cooperativa situada no sudoeste do *San JoaquimValley*, na California-EUA, cujos padrões mínimos de qualidade estão no Quadro 5, o produtor começa a ser penalizado quando a concentração de bactérias mesófilas aeróbias atinge valores maiores do que $3,0 \times 10^4$ UFC/por três dias consecutivos.

São muitas as variáveis que podem contribuir para a elevação da população bacteriana no leite. O leite produzido por vacas sadias com equipamentos de ordenha e resfriamento com adequada limpeza e sanitização, pode manter uma concentração bacteriana de 1.000 até 5.000 UFC/mL (COUSINS, 1972). Quando esses valores atingem mais de 10.000 UFC/mL, as indústrias geralmente tomam atitudes que penalizam os produtores, pois existe uma evidência clara de que o processo de produção da fazenda não esteja sendo feito de maneira correta.

Infelizmente, o número total de bactérias no leite não indica a fonte de contaminação, ou seja, se ela é decorrente de úbere infeccionado, ou tetas e úbere com sujidades, ou equipamentos de ordenha e estocagem mal higienizados, ou a combinação desses fatores. Portanto, torna-se quase impossível estudar, em conjunto, todos os esses fatores que estão associados com a qualidade microbiológica do leite. Nesse estudo, estudou-se apenas a associação entre as práticas de limpeza na ordenha e o manejo das vacas, com a contagem bacteriana do leite.

No Quadro 6 encontra-se a distribuição em quartis dos valores médios do período de um ano (1987), da contagem de bactérias aeróbias mesofílicas (contagem total em placas – CTP), de bactérias termodúricas, de bactérias do grupo coliformes, e de células somáticas do leite, do conjunto de todas as fazendas que entregam leite na cooperativa, situada no sudoeste do *San JoaquimValley*, na California - EUA.

Para os valores de CTP, os resultados mostram que 75% das fazendas produzem um leite com qualidade razoável a excelente, enquanto 25% produzem leite de qualidade ruim, segundo os padrões da Cooperativa situada no sudoeste do *San JoaquimValley*, na California – EUA (compare o Quadro 5 com o Quadro 6).

Quadro 6 – Distribuição em quartil da média do número de bactérias aeróbias mesófilas, bactérias termodúricas, bactérias do grupo dos coliformes, e células somáticas por mL, no leite conjunto do tanque de estocagem de 244 fazendas produtoras de leite. Resultados de janeiro a dezembro de 1998

Quartil ¹	CTP (UFC/mL)	Termodúricos (UFC/mL)	Coliformes Totais (UFC/mL)	Células Somáticas (CM/mL)
0-25	< 6.970	<159	<144	< 219,000
26-50	6.970 – 14.508	159 - 361	144-242	219,969 - 275,000
51-75	14.508 – 27.893	360 - 618	242-350	275,000 - 385,000
76-100	27.893 – 316.911	618 – 4.238	350-915	385,000 - 951,000

¹ Porcentagem em classe.

Nos Quadros 7 e 8 encontram-se a média dos resultados das análises do número de bactérias aeróbicas mesófilas, bactérias termodúricas, bactérias do grupo coliformes e células somáticas do leite conjunto do tanque de estocagem, das cinquenta fazendas que estavam incluídas nos extremos de qualidade e que foram selecionadas para participar deste estudo.

As fazendas que apresentavam menor resultado médio de CTP no leite de conjunto do tanque de estocagem possuíam em média um rebanho de 800 vacas, com valores extremos de 80 a 1.436 animais. As fazendas incluídas no quartil do leite de pior qualidade o valor médio foi de 1.000 vacas por fazenda, com valores extremos de 98 a 2.400 animais. A análise estatística demonstrou que a classificação da fazenda em quartis não depende do seu número de vacas em produção ($P>0,01$).

No grupo com maior número de CTP, a densidade de vacas nas fazendas que possuíam currais do tipo *dry lot* variou entre 3 a 60 a vacas por 100 m², com média de 14 vacas. Já no grupo de menor número de CTP, o valor médio foi de nove animais, com extremos de 4 a 20 vacas por curral. A análise estatística demonstrou que a classificação da fazenda em quartis não depende da densidade de vacas ($P>0,01$).

Quadro 7 - Distribuição das concentrações médias de bactérias mesófilas totais, bactérias termodúricas, coliformes totais, e contagem de células somáticas do leite do quartil de produtores que se destacaram pela qualidade ruim (maior do que 27.000 UFC/mL)¹

Identificação do Produtor	Bactérias (UFC/mL)			Células Somáticas X 1.000
	Aeróbicas Mesófilas	Termodúricas	Grupo dos Coliformes	
3	49.272	507	244	409
10	72.377	357	383	346
16	37.404	679	163	679
23	46.576	126	446	549
24	55.027	804	470	320
50	128.153	691	134	417
70	38.234	1.225	505	461
87	30.772	297	434	461
92	110.571	866	94	951
96	29.550	551	331	413
101	35.076	487	387	222
108	101.673	1.042	560	418
111	57.212	944	447	554
117	22.727	260	90	535
126	28.150	1.430	313	608
140	60.000	280	146	484
151	66.494	1.537	553	425
203	40.349	102	168	410
222	248.409	1.469	407	392
320	34.921	600	152	229
1.000	41.484	110	655	404
1.002	110.571	866	94	951
1.003	31.061	898	222	302
1.004	34.508	402	288	249
1.006	29.550	551	331	413

¹ Dados referentes ao ano de 1997.

O tamanho desses currais também não apresentou influência na distribuição dos quartis. No grupo de maior concentração de bactérias mesófilas, o tamanho dos currais variou entre 257 a 3.636 m², com média de 1.447 m². Já no grupo de menor número de CTP, esses valores foram 220 a 2.355, com média de 1.239 m².

Nas fazendas que possuíam currais do tipo *free stall*, o número de cama de vacas era diretamente proporcional ao número de animais. Para o quartil com maior CTP, a população variou entre 113 a 218 animais, com média de 155 vacas por curral. Já para o quartil com menor CTP esses valores encontravam-se entre 80 a 169, com média de 115 vacas por curral.

Quadro 8 - Distribuição das concentrações médias de bactérias mesófilas totais, bactérias termodúricas, coliformes totais, e contagem de células somáticas do leite do quartil de produtores que se destacaram pela qualidade excelente (menor do que 7.000 UFC/mL)¹

Identificação do Produtor	Bactérias (UFC/mL)			Células Somáticas X 1.000
	Aeróbicas Mesofílicas	Termodúricas	Grupo dos Coliformes	
7	2.854	95	107	207
15	6.321	566	381	434
34	1.880	92	128	136
42	5.517	102	234	258.
74	6.642	56	149	366
83	6.829	140	90	216
86	6.303	630	355	518
123	1.791	630	200	214
130	6.966	134	137	185
132	4.625	405	186	159
139	3.269	824	226	165
141	4.410	190	257	268
184	2.961	74	230	202
187	2.840	322	261	139
188	1.920	48	136	77
197	6.800	222	37	234
206	6.408	146	141	234
217	2.701	528	213	165
224	6.307	263	310	181
247	3.905	156	44	162
278	3.750	55	192	242
298	3.773	86	241	237
342	1.000	22	165	192
336	5.125	104	24	456
1007	4.965	629	186	148

¹Dados referentes ao ano de 1997.

4.3.2. Análise de regressão logística

Nesse estudo foram estimados alguns dos fatores de risco que influenciam na qualidade de leite. Cinquenta fazendas participaram desse estudo, sendo que 27 fizeram parte do grupo de estudo de caso e 23 fizeram parte do grupo controle.

A confirmação da permanência de cada fazenda em determinado quartil foi confirmada com a análise descritiva dos dados recentes referentes às bactérias mesófilas totais (CTP), bactérias termodúricas, coliformes totais, e

contagem de células somáticas do leite conjunto do tanque, das 50 fazendas que participaram desse estudo.

O resultado dessa confirmação encontra-se nos Quadros 9 e 10. Nota-se que houve uma variação nos valores de número de bactérias aeróbias, bactérias termodúricas, bactérias do grupo dos coliformes, e células somáticas (compare com os Quadros 7 e 8). Em algumas fazendas essa variação foi suficiente para que a mesma passasse a fazer parte de outro quartil.

É importante salientar que as fazendas que participaram do grupo de estudo de caso apresentaram sempre valores de CTP maior do que 8.622 UFC/mL (Quadro 9), enquanto as do grupo de controle apresentaram valores menores que 8,622 UFC/mL (Quadro 10). Escolheu-se esse valor porque o mesmo é condizente com a distribuição de parâmetros de qualidade da cooperativa (Quadro 6).

4.3.2.1. Variáveis da regressão logística

As variáveis escolhidas para análise de regressão logística foram:

Úbere limpo – é a ausência de sujidades visíveis nas tetas e no úbere das vacas, antes que a máquina da ordenha seja acoplada;

Mãos secas – é a ausência de resíduos de água, detergente ou qualquer substância líquida nas mãos dos ordenhadores, durante a manipulação ou preparação das tetas para a ordenha.

Currais – No estado da Califórnia existem dois tipos de currais:

O primeiro é denominado *dry lot*, e é um espaço delimitado por cercas retangulares e de superfície formada por terra compactada. Em um dos lados existe um corredor de piso cimentado (*feed alley*), onde os animais permanecem durante o consumo dos alimentos. Os alimentos são colocados fora do curral, sendo alcançados através de grades com espaçamento suficiente para caber a cabeça do animal. Nesse tipo de curral, os animais são livres para percorrer toda a extensão do mesmo. Para o fornecimento de sombras aos animais existem pequenos galpões onde os animais podem entrar e sair livremente.

Quadro 9 - Distribuição das concentrações médias de bactérias mesófilas totais (CTP), bactérias termodúricas, coliformes totais, e contagem de células somáticas do leite do quartil de 27 produtores que apresentaram CTP maiores do que 8.622 UFC/mL (grupo de estudo de caso)¹

Identificação do Produtor	Bactérias (UFC/mL)			Células Somáticas X 1.000
	Aeróbicas Mesofílicas	Termodúricas	Grupo dos Coliformes	
3	45.776	528	122	365
10	15.351	332	262	262
15	11.612	547	280	254
16	13.500	233	179	559
23	46.485	121	423	547
24	50.570	865	429	304
34	27.913	90	102	133
50	120.222	683	105	407
70	34.387	74	439	344
74	21.909	53	106	323
86	31.718	409	277	479
92	69.821	685	83	982
96	30.912	390	98	299
101	40.662	573	237	264
108	107.848	361	452	420
111	16.095	747	45	385
117	123.078	92	603	270
126	30.620	1.381	128	600
140	34.422	1.992	210	431
151	70.458	1.600	456	414
203	38.829	103	136	411
222	10.435	1.106	527	384
320	23.079	408	87	206
336	31.419	142	133	364
1.000	16.083	93	292	258
1.003	12.167	117	424	315
1.004	13.226	370	336	189

¹ Dados referentes ao período de um ano antes da entrevista e coleta de amostra em cada fazenda.

O segundo tipo de curral é denominado *free stall*, e é um galpão de confinamento de vacas. Nesse tipo de curral os animais dispõem de camas individuais forradas com terra tratada, areia ou até mesmo tapetes especiais. O acesso às camas é livre. A relação cama por vaca é de 1:1. O formato também é retangular e no lado mais comprido também existe o *feed alley*, semelhante ao que existe no *dry lot*. As vacas permanecem nesse local por todo o período da lactação.

Quadro 10 - Distribuição das concentrações médias de bactérias mesófilas totais (CTP), bactérias termodúricas, coliformes totais, e contagem de células somáticas do leite do quartil de produtores que apresentaram CTP menores do que 8.622 UFC/mL (grupo de estudo de controle)¹

Identificação do Produtor	Bactérias (UFC/mL)			Células Somáticas X 1.000
	Aeróbicas Mesofílicas	Termodúricas	Grupo dos Coliformes	
7	2.702	101	139	221
42	4.292	45	227	211
83	8.622	106	111	259
87	4.873	425	181	309
123	1.429	404	101	184
130	6.426	132	59	182
132	4.227	443	143	141
139	7.320	883	234	170
141	3.882	146	301	196
184	4.864	62	137	219
187	2.045	268	218	130
188	1.657	238	116	65
197	4.680	263	115	234
206	4.795	130	186	207
217	2.560	322	183	194
224	7.750	279	400	201
278	3.615	43	87	224
298	3.818	202	307	228
1.001	2.080	122	114	122
1.002	6.968	173	151	225
1.005	6.412	195	115	163
1.006	6.955	149	126	104
1.007	4.965	629	186	148

¹ Dados referentes ao período de um ano antes da entrevista e coleta de amostra em cada fazenda.

Água no *feed alley* – é a presença ou evidência de estagnação de água no *feed alley*.

Úbere seco – é ausência de água no úbere e nas tetas das vacas, quando as mesmas se encontram na sala de ordenha.

Água com aditivo – é a presença na água de lavagem do úbere das vacas de substâncias para ajudar na remoção de sujidades.

Tempo de secagem – é o tempo que os animais permanecem na sala de secagem (*drip pen*), após a lavagem do úbere e antes da ordenha.

Lavagem do úbere – é o processo de lavagem do úbere das vacas, antes que os animais sejam transferidos para a sala de ordenha.

Sanitização das tetas – é o processo de imersão ou aspersão das tetas das vacas em solução sanitizante.

Uso de toalhas – é a prática do uso de toalhas de papel ou de algodão, para secar as tetas, remover excesso de sanitizante, ou até mesmo para remover sujidades.

Úbere molhado – é a presença de água no úbere do animal provocada pela ausência de secagem após a lavagem. Pode também ser devido à prática inadequada de ordenha, como o vazamento em tubulações de água com pressão suficiente para chegar até o úbere dos animais.

Sala de ordenha – existem dois tipos de salas de ordenha, quanto a posição da vaca em relação ao ordenhador: No primeiro tipo, os equipamentos de ordenha estão instalados próximos do chão (*flatbarn*). Portanto, tanto as vacas como os ordenhadores permanecem no mesmo nível durante a ordenha. No segundo tipo, os equipamentos de ordenha estão instalados em uma plataforma (*pitbarn*). Nesse caso, os animais ficam num nível mais alto que o ordenhador.

4.3.2.2. Análises de regressão logística

No Quadro 11 encontra-se a frequência das variáveis testadas nos modelos de regressão logística.

Pelo fato de que muitas variáveis podem influenciar na carga bacteriana do leite, escolheu-se o delineamento estatístico do tipo caso controle. A principal característica desse tipo de estudo é a comparação de dois grupos, um com específica característica e outro com a ausência desta. A frequência de fatores que influenciam na característica estudada é comparada nos dois grupos e permite avaliar os fatores de riscos que contribuem para que um indivíduo ou população seja incluído em um grupo com características definidas (ARMENIAN e LILIENFELD, 1994).

Quadro 11 – Distribuição das observações registradas no questionário para levantar as condições de ordenha das vacas de fazendas fornecedoras de leite para a Cooperativa no Vale de *San Joaquim Valley* em Tulare, California-EUA. Período de 1998 a 1999

Variável	Níveis da Variável	Caso	%	Controle	%
Instalações					
Curral	<i>Drylot</i>	18	66,7	12	52,2
	<i>Frestall</i>	4	14,8	7	30,4
	Combinação	5	18,5	4	17,4
	<i>Flatbarn</i>	7	25,9	8	34,8
Sala de ordenha	<i>Pitbarn</i>	20	74,1	15	65,22
Água acumulada nos corredores do currais	Sim	9	33,3	1	4,35
	Não	18	66,7	22	95,6
Condições de ordenha					
Lavagem do úbere	Sempre	25	92,3	19	82,6
	Nem sempre	2	7,41	4	17,39
Sanitizante ou sabão na água de lavagem da tetas	Adiciona sanitizante ou sabão na água de lavagem das vacas	13	48,1	5	21,7
	Não adiciona sanitizante ou sabão na água de lavagem das vacas	14	51,8	18	78,3
	Algum tempo para secagem das tetas	20	74,1	21	91,3
Tempo de secagem	Nenhum tempo para secagem das tetas	7	26,0	2	8,7
	Úberes e tetas de 20 animais limpos	7	25,9	18	78,3
Úbere e tetas limpos	Úberes e tetas de < = 20 animais não limpos	20	74,1	5	21,7
	<i>Dip</i> – imersão das tetas em um sanitizante	6	22,2	4	17,4
	<i>Spray</i> – aspersão das tetas com um sanitizante	4	14,8	1	4,35
<i>Pre-dipping</i>	Não-sanitização antes da ordenha	17	63,0	18	78,3
	Sim, antes do acoplamento da máquina de ordenha	19	70,4	23	100,0
	Não, antes do acoplamento da máquina de ordenha	8	29,6	0	0,0
Mãos secas	Sim, ao manipular as tetas	26	96,3	22	95,6
	Não, ao manipular as tetas	1	3,7	1	4,35
Uso de toalhas para secagem e, ou, remoção de sujidades	Algodão	7	25,9	7	30,4
	Papel	16	59,3	12	52,2
	Não usa tolhas	4	14,8	4	17,4

Nesse estudo, procurou-se quantificar quais os fatores de riscos que contribuem para que uma fazenda seja incluída no grupo de maior número de bactérias aeróbicas mesofílicas.

Os fatores de riscos foram avaliados usando-se a regressão logística multivariada, porque esse tipo de análise permite avaliar os fatores de risco de muitas variáveis e suas interações (KLEINBAUM, 1992).

Testaram-se no modelo todas as variáveis que estão quantificadas na Quadro 11. Das variáveis que se referem às instalações da fazenda apenas a variável referente ao acúmulo de água nos corredores dos currais permaneceu no modelo. As outras variáveis foram eliminadas porque não tinham valores significativos no teste de Wald para os modelos testados.

Quanto às condições de ordenha, apenas a variável “úbere e tetas limpos”, antes do acoplamento da ordenhadeira, apresentou significância no modelo. Deve-se ressaltar que foram testadas todas as combinações das variáveis do Quadro 11. A combinação dessas duas variáveis, “úbere e tetas limpos” e “água acumulada nos corredores dos currais”, permite concluir que é realmente importante a condição de limpeza das tetas antes da ordenha.

Entretanto, desde que outras variáveis que se referem aos diferentes procedimentos de limpeza não foram significativas, a maneira como essa condição ou estágio de limpeza é alcançada aparentemente não é importante para o modelo testado.

Usando-se a análise de regressão logística multivariada foi estimado que as fazendas cujas vacas estão com o úbere limpo (inspeção visual) durante a ordenha têm a chance 10 vezes maior de estar no grupo de fazendas que produzem leite com menor número de bactérias aeróbias mesófilas (razão de risco = 0,10, 90% IC = 0,029-0,305).

Também as fazendas que mantêm os currais com corredores sempre secos e sem condições de acúmulo de água, terão 10 vezes mais chance de serem classificadas no grupo de fazendas com menor CTP no leite na fazenda (razão de risco = 0,095, 90% IC 0,008-0,533).

A presença de água acumulada nos corredores dos currais foi detectada em apenas 4,35% das fazendas do grupo com menor CTP, contra 33,3% no grupo de maior CTP. O acúmulo de água nos currais e corredores leva a uma maior contaminação das tetas das vacas entre cada ordenha. Esse fator é muito importante na região do *San Joaquin Valley*, onde o clima é quente e árido no verão. A presença de qualquer água estagnada serve de cama, onde os animais permanecem buscando fugir do clima adverso.

Essas observações são valiosas para mostrar que quando se seguem normas para ordenhar vacas nos EUA, o que importa não é o fato de cumprir com todas as exigências, mas a maneira como as mesmas são desempenhadas.

A variável “úbere e tetas secas” não pôde ser testada no modelo, pois o sistema de análise SAS não permite a análise de variável com valor zero para modelos de regressão logística. Analisando descritivamente essa variável nota-se que 100% das fazendas que fazem parte do grupo de menor CTP apresentaram úberes e tetas secas antes do acoplamento da ordenhadeira, por conseguinte esse fato levou a valor zero em relação a úbere e tetas não secos antes do acoplamento da ordenhadeira. GALTON et al. (1984) encontraram a menor contaminação bacteriana no leite após o processo de lavagem e secagem das tetas com toalhas individuais de papel, ou quando sanitizaram e secaram as tetas.

Foram testadas também todas as outras variáveis no modelo com as duas variáveis que foram significantes, “úbere e tetas limpos” e “água acumulada nos corredores dos currais”, entretanto, essas duas variáveis continuaram significativas para o modelo, enquanto as outras não apresentaram significância. Isso indica a importância da limpeza e secagem do úbere antes da ordenha e também da ausência de água estagnada nos corredores.

Como o *Pasteurized milk Ordinance* é explícito quanto ao processo de sanitização da teta antes da ordenha, tentou-se forçar a variável *pre-dipping* no modelo. Embora a mesma não tenha sido significativa para explicar a sua permanência como fator determinante de fazendas com maior CTP no leite,

essa variável pode permanecer no modelo, pois interfere de maneira positiva com os valores de significância das outras duas variáveis (Quadro 12).

Nos Quadros 12 e 13 estão os dados referentes a outro modelo I e II de regressão logística que justificam a posição das fazendas num maior ou menor quartil de qualidade de leite. No Modelo II foi forçada a variável *pre-dipping* com as duas variáveis que foram significativas no Modelo I.

Quadro 12 – Fatores de riscos associados com probabilidade de uma fazenda ser classificada no grupo de fazendas que produzem leite com maior CTP. Modelo I

Variável	Nível	Razão de Risco	90% Intervalo de Confiança
Úbere e tetas limpas	Limpos	0,100	0,029 –0,305
	Não limpos	1,00	
Água acumulada nos corredores e currais	Não	0,095	0,013-0,674
	Sim	1,00	

Quadro 13 – Fatores de riscos associados com probabilidade de uma fazenda ser classificada no grupo de fazendas que produzem leite com maior CTP. Modelo II

Variável	Nível	Razão de Risco	90% Intervalo de Confiança
Úbere e tetas limpas	Limpos	0,096	0,03 –0,33
	Não limpos	1,00	
Água acumulada nos corredores e currais	Não	0,079	0,01-0,59
	Sim	1,00	
<i>Pré dipping</i>	Imersão	0,19	0,016-2,46
	Aspersão	1,00	
	Sem <i>pre-dipping</i>	0,164	0,017 –1,54
	Aspersão	1,00	

É importante salientar que os produtores de leite têm a chance maior de estar no grupo de fazendas com maior número de CTP quando o *pre-dipping* é feito pelo processo de aspersão. Isso pode ser explicado pelo fato de que a aspersão quando comparado com o processo de imersão não atinge de maneira eficiente toda a superfície das tetas que precisa ser sanitizada.

Os resultados também mostraram (Quadro 12) que a decisão de evitar o *pre-dipping* com aspersão é mais vantajosa no sentido de favorecer a permanência no grupo de menor CTP. Recomendação semelhante já foi feita por SARAN (1995) ao revisar as técnicas de aplicação de sanitizantes nas tetas.

4.3.3. Análise microbiológica das superfícies externas das tetas

A condição de limpeza das tetas antes da ordenha, que gerou a variável “úbere e tetas limpos”, foi avaliada pela simples inspeção visual. Para avaliar o efeito do *pre-dipping* na CTP das superfícies das tetas, optou-se por fazer uma avaliação através da CTP na superfície das tetas dos animais das fazendas que utilizavam e não utilizavam esse procedimento.

A amostra foi coletada de forma rápida e precisa, pois era realizada enquanto a ordenha se processava na fazenda. Nessa coleta apenas 2,5 cm² da superfície externa da teta foi amostrada, em contraste com outros pesquisadores, que geralmente fazem uma amostragem de toda a superfície das tetas, ou coletam o leite em sistemas de jarras totalmente esterilizados (COUSINS, 1972; GALTON et al., 1984).

Das 50 fazendas amostradas, apenas 13 utilizavam a prática de *pre-dipping* durante o processo de ordenha. Em cinco vacas destas 13 fazendas foram retiradas amostras para CTP nos eventos de pré-lavagem, pós-lavagem, pré-ordenha ou pós-sanitização, e pós-ordenha. Nas fazendas em que o *pre-dipping* não era utilizado foram retiradas também cinco vacas amostras na pré-lavagem, pré-ordenha e pós-ordenha.

Os resultados referentes a CTP das superfícies das tetas dos animais encontram-se no Quadro 14. Foi observada uma redução do número de

Quadro 14 – Avaliação pela CTP do processo de limpeza das tetas das vacas durante a ordenha. Os resultados são expressos como as médias do $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$ da CTP na superfícies das tetas das vacas em cada evento da ordenha

Evento ¹	N	Log ₁₀ UFC/cm ²	Diferença entre as Médias ²	P ³
Pré-lavagem	996	2,01	0,63	<0,001
Pós-lavagem e pré-ordenha	997	1,53	0,15	<0,001
Pós-sanitização e pré ordenha ⁴	259	1,35	-0,03	0,1615
Pós-ordenha	998	1,38		

¹ Comparando os modelos com e sem as variáveis evento, quartil e interação, resulta em -2 *Residual Log Likelihood Ratio* χ^2 1769.5, g.l. = 7, P<0.001

² Diferença dos valores dos eventos de pré lavagem, pós-lavagem e pré-ordenha, pós- sanitização e pré-ordenha, subtraídos dos valores da pós-ordenha

³ Valores de P entre as diferenças das médias obtidos pelo teste de Tukey

⁴ Apenas 13 fazendas *pre-dipping* ou sanitizam as tetas dos animais antes da ordenha.

bactérias na superfície das tetas à medida que os animais foram passando pelos eventos de preparação para a ordenha. Deve-se ressaltar que os valores mais baixos de CTP no leite foram obtidos em animais que haviam passado pelo processo de sanitização, que são os valores da pós-sanitização e pré-ordenha.

O Quadro 14 apresenta os resultados de todas as fazendas que lavam as tetas das vacas antes da ordenha. Os resultados apresentados para a pós-sanitização ocorreram nas fazendas que, além de lavar as tetas, também as sanitizam. Também fazem parte desse grupo as fazendas que não lavam as tetas dos animais antes da ordenha. Essas fazendas apenas sanitizam pelo processo de *pre-dipping*.

Na comparação entre os dois grupos de fazendas com maior e menor CTP no leite (Quadro 15) o número de bactérias na superfícies das tetas do grupo de menor CTP foi significativamente menor que o do grupo de maior CTP apenas após a sanitização e pós-ordenha.

Para comparar a CTP nas tetas dos animais antes do acoplamento da ordenhadeira, os resultados referentes ao evento de pós-lavagem das fazendas que apenas lavam e não sanitizam as tetas foram adicionados dos dados das fazendas cujas tetas são sanitizadas depois da lavagem.

Quadro 15 - Log₁₀ UFC/cm² dos valores médios da CTP na superfície das tetas das vacas durante os eventos da ordenha, nos grupos de maior e menor CTP

Evento	Maior CTP	Menor CTP	Diferença entre Médias ¹	P-Valores da Diferença ¹
Pré-lavagem	2.03	1,99	0,04	0,46
Pós-lavagem e pré-ordenha	1.55	1,52	0,02	0,68
Pós-sanitização e pré ordenha ⁴	1.40	1,30	0,10	0,09
Pós-ordenha	1.41	1,35	0,06	0,03

¹ Médias comparadas entre os grupos de alto e baixo número de CTP pelo test T.

² Apenas 13 fazendas realizam o *pré dip* ou sanitizam as tetas dos animais antes da ordenha.

A análise desses resultados pela ANOVA mostra que nas fazendas que possuem maior número de CTP no leite esse valor é de 1,50 UFC/cm², e 1,44 UFC/cm² nas fazendas com menor número de CTP. Foi notada uma diferença entre essas médias (p<0,05). As fazendas com menor número de CTP/cm² no leite conjunto do tanque de estocagem apresentaram vacas com menor número de bactérias nas tetas antes da ordenha.

Em contraste com avaliação da limpeza pela inspeção visual, que foi avaliado como fator de risco para que uma fazenda seja classificada como produtora de leite com maior ou menor CTP, o processo de *pre-dipping* não foi significativo no modelo. A razão para esse contraste está na frequência da não utilização de *pre-dipping* observado nas fazendas dos dois grupos.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A variação bacteriana na superfície das tetas de cinco vacas foi investigada nos eventos de pré-lavagem, pós-lavagem ou pré-ordenha, pós sanitização ou pré-ordenha e pós-ordenha. As amostras foram obtidas usando-se um *swab* de algodão em uma superfície externa da teta de 2,5 cm². A contagem total em placas (CTP) foi usada para a quantificação das bactérias mesófilas aeróbias nas amostras. Embora o processo de limpeza (lavagem com água) e sanitização (solução a base de iodo) na superfície externa das tetas das vacas diminuiu a CTP, não foi verificada a variação da carga bacteriana entre as superfícies das tetas das vacas em nenhum dos eventos da ordenha.

Testou-se a correlação entre a técnica da bioluminescência e a técnica de CTP para a quantificação de bactérias da superfície externa das tetas das vacas durante os eventos da ordenha. Para coleta de amostras nos dois métodos, foram utilizados *swabs* na amostragem da superfície externa das tetas. Ambas as técnicas de contagem-padrão em placas e a luminescência foram capazes de detectar as reduções do número de bactérias nas superfícies externas das tetas das vacas, à medida que as mesmas eram lavadas e sanitizadas durante o processo de ordenha.

A equação encontrada para correlacionar os valores de bioluminescência, medidos pela unidade de luminescência relativa e o número

de bactérias presentes na superfície externa das tetas, medida pela contagem-padrão em placas foi: $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2 = -0,86 + 1,24\log_{10}\text{ULR}/\text{cm}^2$ ($r = 0,80$). Essa equação demonstra que para cada unidade de URL há uma alteração de 1,24 unidade na UFC.

A sensibilidade e a especificidade do método de bioluminescência na detecção de bactérias da superfície externa das tetas de vacas foram avaliadas considerando-se como padrão de limpeza as médias dos quadrados mínimos do $\log_{10}\text{UFC}/\text{cm}^2$, após a lavagem das tetas. O valor para a sensibilidade foi de 0,73 e o de especificidade foi 0,81. Esses valores foram relativamente baixos quando comparados com outras aplicações de bioluminescência, porém o método de bioluminescência mostrou-se conservador e classificou poucas tetas (7 em 164) que fisicamente não foram lavadas como limpas.

O método de bioluminescência foi capaz de mostrar as diferenças do decréscimo do número de bactérias nas tetas das vacas à medida que os mesmos passaram pelo processo de lavagem e sanitização. Portanto, o método de bioluminescência é viável para acompanhar o processo de limpeza das tetas das vacas durante a pré-ordenha.

A técnica de medição do ATP por bioluminescência é viável porque é simples, rápida e pode ser aplicado pelo pessoal que trabalha na ordenha. Essa técnica permite que o processo de limpeza das tetas seja avaliado e modificado de acordo com o nível de CTP.

Para o cálculo dos fatores de riscos relacionados com a produção de leite com alta CTP foi utilizado o método de investigação caso-controle. As fazendas selecionadas entregam o leite em uma cooperativa no San Joaquín Valley, na Califórnia-EUA. O grupo de estudo foi formado por fazendas que produzem leite com alto número de bactérias, medidas pela CTP, e o grupo-controle foi formado por fazendas que produzem leite com baixo número de bactérias.

Um questionário foi aplicado em cada fazenda para realizar um levantamento das condições de produção de leite. Usou-se a análise de regressão logística para testar as razões de riscos envolvidas com a produção de leite com alta contaminação por bactérias.

Duas variáveis tiveram significância na estimação da razão de risco que pode levar à produção de leite com alto número de bactérias. Para a variável “úbere limpo”, foi estimado que as fazendas cujas vacas estão com o úbere limpo (inspeção visual) durante a ordenha têm a probabilidade dez vezes maior de produzir leite com baixo número de bactérias (razão de risco = 0,10, 90% IC 0,029-0,305).

Para a variável “água acumulada nos corredores dos currais” estimou-se que as fazendas que mantêm os currais com corredores sempre secos e sem condições de acúmulo de água terão dez vezes mais probabilidade de produzir leite com menor número de bactérias no leite (razão de risco = 0,095, 90% IC 0,008-0,533).

Nos animais das fazendas dos dois grupos de maior e menor CTP no leite foi observada uma redução do número de bactérias nos tetos, à medida que os animais foram passando pelos eventos de preparação para a ordenha. Foi observada menor quantidade de bactéria nas superfícies das tetas de animais que haviam sido sanitizados, mas o fato de sanitizar as tetas das vacas não leva a fazenda a produzir leite com baixo número de bactérias, uma vez que a sanitização das tetas investigada como a variável *pre-dipping* não contribuiu como fator de risco para que a fazenda produza leite com alto número de bactéria.

Esse estudo sugere que para produzir leite de alta qualidade nem sempre é necessário seguir todas as recomendações do PMO no processo de ordenha.

Sugere-se também que a produção de leite com baixo número de bactéria é menos influenciada pela preparação do animal do que pelo alto nível das instalações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, M., ANDREWS T. Progressive changes in individual milk protein concentrations associated with high somatic cell counts. **Journal of Dairy Research**, n.44, p.223, 1977.
- ANDERSON, R.R., COLLIER, R.J., GUIDRY, A.J., HEALD, C.W., JENNESS, R., LARSON, B.R. **Lactation**. In: LARSON, B.L. (Ed.). 1. Ames, Iowa: the Iowa State University Press/Ames. 1985.
- ARMENIAN, H.K., LILIENFELD, D.E. Epidemiologic Reviews - Overview and historical perspective. **Epidemiologic Reviews**, v.16, n.1, p.1-5, 1994.
- BAKER, J.M., GRIFFITHS, M.W., COLLINS-THOMPSON, D.L. Bacterial bioluminescence: Applications in food microbiology. **Journal of Food Protection**, v.55, n.1, p.62-70, 1992.
- BARBANO, D.M., RASMUSSEN, R.R., LYNCH, J.M. Influence of milk somatic cell count and milk age on cheese yield. **Journal of Dairy Science**, n.74, p.369-88, 1991.
- BARKEMA, H.W., SCHUKKEN, Y.H., LAM, T.J., 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.411-9, 1998.
- BASELGA, R., ALBIZU, I., AMORENA, B. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. **Veterinary Microbiology**, v.39, n.3-4, p.195-204, 1994.

- BAUTISTA, D.A., McINTYRE, L., LALEYE, GRIFFITHS, M. The application of bioluminescence for the assessment of milk quality and factory hygiene. **Journal of Rapid Methods Automated in Microbiology**, n.1, p.179-93, 1992.
- BEMRAH, N., SANAA, M., CASSIN, M.H., GRIFFITHS, O.C. Quantitative risk assement of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. **Preventive Veterinary Medicine**, n.37, p.129-145, 1998.
- BERNING, L.M., SHOOK, G.E. Prediction of mastitis using milk somatic cell count, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, and lactose. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.7, p.1840-8, 1992.
- BOSSUYT, R. Usefulness of an ATP assay technique in evaluating the somatic cell content of milk. **Milchwissenschaft**, n.33, p.11-3, 1978.
- BROLUND, L. Cell counts in bovine milk, cause variation and applicability for diagnosis of subclinical mastitis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, n.80, p.1-123, 1985 (Supplement).
- BUZBY, J.C., ROBERTS, C.T., JORDAN, L., MacDONALD, J.M. **Bacterial foodborne disease: Medical costs & productivity losses**. USDA: Economic Research Service. Ag. Econ. Rpt., p.741, 1996.
- CASELL, B.G. Using somatic cell score evaluations for management decisions. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.7, p.2130-6, 1994.
- CHAPELLE, E.W., LEVIN, G.V. Use of firefly bioluminescence reaction reaction for the rapid detection and counting of bacteria. **Biochemistry Medical**, n.2, p.41-52, 1968.
- CHRIST, P.G. Is our milk good enough? **Proceedings Annual Meeting National Mastitis Council**, 7 pp. 1996.
- COUSINS, C.M. Source of bacteria in bulk tank milk. **Journal of Society of Dairy Tecnology**, v.25, n.4, p.200-204, 1972.
- CSAPÃO, J., CSAPÃO-KISS, Z., STEFLER, J., MARTIN, T.G., NÂEMETHY, S. Influence of mastitis on D-amino acid content of milk. **Journal of Dairy Science**, v.78, n.11, p.2375-81, 1995.
- CULLOR, J.S. Implementing the HACCP program on your clients dairies. **Veterinary Medicine**, v.90, n.3, p.290-5, 1995.
- D'EUTACHIO, A.J., JOHNSON, D.R., LEVIN, G.V. Rapid assay of bacterial populations. **Bacteriology Procedures**, n.21, p.13, 1968.

- DANIEL, W.W. **Bioestatistic**: A foundation for analysis in the health sciences. [Anonymous] 4. New York: John Willey & Sons. p.733, 1998.
- DeKONING, P.J., KAPPER, J., ROLLEMA, H.S., DRIESSEN, F.M. Age-thinning and gelation in unconcentrated and concentrated UHT-sterilized skim milk. Effect of native milk proteinase. **Netherland Milk and Dairy Journal**, n.39, p.71, 1985.
- DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Food and Drugs Administration**: Food and Safety Assurance Program. 1994. Development of Hazard Analysis Critical Control Points. Proposed Rule, 21 CFR Ch. 1.
- DRUCE, R.G., THOMAS, S.B. Bacteriological studies on bulk milk collection: pipeline milking plants and bulk milk tanks as sources of bacterial contamination of milk a review. **Journal of Applied Bacteriology**, 1972 Jun, 35(2):253-70.
- FAHEY, T., MORGAN, D., GUNNEBURG, C., ADAK, G.K., MAJID, F., KACZMARSKI, E. An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis associated with failed milk pasteurization. **Journal of Infection**, v.31, n.2, p.137-43, 1995.
- FERRARI, P. Harzad Analysis Critical Control Points (HACCP) in Public Catering Services: A modified Method, combined to Bacteriological assay. **Annual 1ST Super. Sanita**, v.28, n.4, p.459-64, 1992.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - U.S. Department of Agriculture - U.S. Environmental Protection Agency, and Centers for Disease Control and Prevention. Food Safety from Farm to Table: A National Safety Initiative. Report to the President, May 1997 41 p.
- GALTON, D.M., PETERSSON, L.G., MERRILL, W.G., BANDLER, D.K., SHUSTER, D.E. Effect of pre-milking udder preparation on bacterial population, sediment and iodine in milk. **Journal of Dairy Science**, n.67, p.2580-2589, 1984.
- GRIFFITHS, M.W. Applications of bioluminescence in the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, n.76, p.3118-25, 1993.
- GRIFFITHS, M.W. Rapid estimation of microbial numbers in dairy products using ATP technology. In: NELSON, W.H. (Ed.). **Physical methods for microorganisms detection**. Boca Raton FL: CRC Press, 1991. p 29-62.
- GRIFFITHS, M.W. Rapid microbiological methods with hazard analysis critical control point. **Journal of AOAC International**, v.80, n.6, p.1143-50, 1997.

- GRIFFITHS, M.W. The Role of ATP Bioluminescence in the Food Industry: New Light on Old Problems. **Food Technology**, v.50, n.6, p.62-8, 1996.
- HASTING, J.W., POITRIKUS, C.J., GUPTA, S.C., KURFUST, M. Biochemistry and physiology of bioluminescent bacteria. In: Rose, A.H.; Tempest, D.W. editors. **Advances in Microbial Physiology**, p.236-91, 1985.
- HASTINGS J.W. Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. **Journal of Molecular Evolution**, v.19, p.309-321, 1983.
- HAWRONSKYJ, J.M., ADAMS, M.R., KYRIAKIDES, A.L. Rapid detection of antibiotics in raw milk by ATP bioluminescence. **Journal of the Society of Dairy Technology**, n.4, p.31-3, 1993.
- HEESCHEN, W.H., REICHMUTH, J., SUHREN, G. **Quality milk production** - Potential hazard critical control points and application of risk analysis. In: National Mastitis Council 36th Annual Meeting February 16-19:4-8, 1997.
- HOUGHTBY, G.A., McDONNELL, R.J., KOVECSES, F. Microbiological count methods. In: MARSHALL, R.T. (Ed.) **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington-DC: American Health Association, 1993. p.213-46.
- HUSS, H.H. Development and use of the HACCP concept in fish processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, n.1-2, p.33-4, 1992.
- HYSET, D.W., KOVECSES, F., MORRISON, N.M. A firefly bioluminescence ATP assay method for rapid detection and enumeration of brewery microorganisms. **Journal of American Society Brewing Chemistry**, n.34, p.145-50, 1976.
- JANSEN, G.L., GREENLES, K.L. Public health issues in aquaculture. **Review Scientific et Technique**, v.16, n.2, p.641-51, 1997.
- JENSEN, N.E., AARESTRUP, F.M., JENSEN, J., WEGENER, H.C. *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis. Implication for human health. **International Journal of Food Microbiology**, v.32, n.1-2, p.209-16, 1996.
- KEEFE, G.P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v.38, n.7, p.429-37, 1997.
- KEENE, W.E., HEDBERG, K., HERRIOTT, D.E., HANCOCK, D.D., BARRETT, T.J., FLEMING, D.W. A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. **Journal of Infectious Diseases**, v.3, n.176, p.815-8, 1997.

- KING, P. Implementing a HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points). Program. **Food Management**, v.27, n.12, p.54-8, 1992.
- KIRK, J., SISCHO, B. Bulk tank somatic cells counts in DHIA herds – Influence of facilities and management practices. **California Dairy Herd Improvement**, v.9, n.3, p.16-18, 2000.
- KIRK, J.H., GLENN, K., RUIZ, L., SMITH, E. Epidemiologic analysis of *Mycoplasma* spp isolated from bulk-tank milk samples obtained from dairy herds that were members of a milk cooperative. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.211, n.8, p.1036-8, 1997.
- KIRK, J.H., LAURERMAN, L.H. Mycoplasma mastitis in dairy cows. **Food Animal**, v.16, n.4, p.541-5, 1994.
- KLEI, L., YUN, J., LYNCH, J., BARBANO, D., SEARS, P., GALTON, D. Effects of milk somatic cell count on cottage cheese yield and quality. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.5, p.1205-13, 1998.
- KLEINBAUM, D.G. **Logistic regression**. A self-learning text. In: DIETZ, K., GAIL, M., KRICKEBERG, K., Singer, B. (Eds.), 1992. p.282.
- KYRIAKIDES, A.L. ATP bioluminescence applications for microbiological quality control in the dairy industry. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.45, n.4, p.91-3, 1992.
- McDONNELL, R.J., RAMPLING, A., CROOK, S., COCKCROFT, P.M., WILSHAW, G.A., CHESASTY, T., STUART, J. An outbreak of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* 0157 infection associated with take way sandwiches. Communicable Disease Reporter, **CDR Review**, v.7, n.13, p.R202-5, 1997.
- MEIGHEN, E.A. Enzymes and genes from *lux* operons of bioluminescent bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.42, p.151-76, 1988.
- MEIGHEN, E.A. Molecular biology of bacterial bioluminescence. **Microbiology Review**, n.55, p.23-42, 1991.
- MENG, J., DOYLE, M.P. Emerging issues in microbiological food safety. **Annual Review of Nutrition**, n.17, p.255-75, 1997.
- MILLER, L.F., MABEE, M.S., GRESS, H.S., JANGAARD, N.O. An ATP bioluminescence for the quantification of viable yeast for fermenter pitching. **Journal American Society Brewing Chemists**, n.36, p.59-62, 1978.
- MILTENBURG, J.D., DEKONING, C.J., van VLIET, J.H., LAM, T.J. Machine milking and udder health: a literature review. **Tijdschrift Voor Diergeneeskunde**, v.122, n.20, p.568-76, 1997.

- MORTIMORE, S.E., WALLACE, C. **HACCP** - A practical approach. Aspen Publishers. Inc. 1988. 320p.
- MURPHY, C.S., KOZLOWSKI, S.M., BLANDER, D.K., BOOR, K.J. Evaluation of adenosine triphosphate-bioluminescence hygiene monitoring for trouble-shooting fluid milk shelf-life problems. **Journal of Dairy Science**, n.81, p.17-20, 1998.
- NORTON, C. Preparing your operation for the HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points). **Process. Food Management**, v.27, n.5, p.64-5, 1992.
- RENDOS, J.J., EBERHART, R.J., KESLER, E.M. Microbial populations of teat ends of dairy cows and bedding materials. **J. Dairy Sci.**, v.58, p.1492-1500, 1975.
- REYBROEK, W., SCHARAM, E. Improved filtration method to assess bacteriological quality of raw milk based on bioluminescence of adenosine triphosphate. **Netherlands Milk Dairy**, n.49, p.1-4, 1995.
- SARAN, A. Disinfection in the dairy parlors. 1995. **Revue Scientifique et Technique**, v.14, n.1, p. 207-24.
- SCHEPERS, A.J., LAM, T.J.G.M., SCUKKEN, H.Y., WILMINK, J.B.M., HANEKAMP, W.J.A. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.8, p.1833-40, 1996.
- SCHUTZ, M.M. Genetic evaluation of somatic cell scores for United States dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.7, p.2113-29, 1994.
- SETLOW, P. Germination and outgrowth in the bacterial spores. In: CROMBRUGGE, J. van, WAES, G., REYBROEK, W. (Eds.) **The bacterial spore**. Vol. 2, London: Academic Press, p.211-254. 1983.
- SHARPE, A.N., WOODROW, M.N., JACKSON, A.K. Adenosine triphosphate (ATP) levels in food contaminated by bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v.2, p.767-58, 1970.
- SHOOK, G.E., SCHUTZ, M.M. Selection on somatic cell score to improve resistance to mastitis in the United States. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.2, p.648-58, 1994.
- SHOSHANI, E., BERMAN, A. Subclinical mastitis assessed by deviations in milk yield and electrical resistance. **Journal of Dairy Research**, v.65, n.1, p.31-41, 1998.
- SMITH, RD. **Veterinary clinical epidemiology**. [Anonymous] 2. London: CRC Press. 1995, p.1-52.

- SPERBER, W.H. Use of HACCP system to assure food safety. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.74. n.2, p.433-434, 1991.
- SUTHERLAND, A.D., BELL, C., LIMOND, A., DEAKIN, J., HUNTER, E.A. ATP biotrace method for estimating bacterial numbers in milk by bioluminescence. **Journal Society of Dairy Techonology**, n.47, p.117-20, 1994.
- SUTRA, L., POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, v.40, n.2, p.79-89, 1994.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Food Safety and Inspection Service. Guidebook for the Preparation of HACCP Plans. Washington, DC: US 1999.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Grade "A" Pasteurized milk ordinance**: Recommendations of the Health Service Publication, N^o 229. Washington-DC: US Govern. Print, Off. 1995 Rev.
- VANSTAEN, H. Applicability of bioluminescence for rapid detection of viable micro-organisms. **Laboratory Practice**, n.12, p.1281-3, 1980.
- VASAVADA, P.C. Rapid methods and automation in dairy microbiology. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.10, p.3101-13, 1993.

APÊNDICE

APÊNDICE A

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DO QUESTIONÁRIO

Todas as perguntas devem ser relacionadas com as vacas que estão em produção.

As questões que estão escritas em negrito devem ser respondidas pelo entrevistador, após a devida observação dos procedimentos de ordenha e manutenção da fazenda. As outras perguntas devem ser dirigidas à pessoa responsável pelo gerenciamento da fazenda.

Fazenda # _____ **Data** ____/____/____ **Hora** _____

1. Raça da vaca:

Holstein _____ % _____

Jersey _____ % _____

Other _____ % _____

2. Quantas vacas existem no curral do tipo *dry lot*?

3. Quantos currais do tipo *dry lot* existem na fazenda?

4. Qual é o intervalo em que os currais são limpos (*scrapped*)?

Verão _____

Inverno _____

5. Existe acúmulo de água nos corredores (*feed alleys*) onde as vacas permanecem enquanto são alimentadas?

a. Sim

b. Não

6. Qual é o total de vacas que são mantidos nos currais do tipo *freestall*?

7. Existe acúmulo de água nos corredores (*feed alleys*) onde as vacas permanecem enquanto são alimentadas?

a. Sim

b. Não

Sala de Limpeza das Vacas

8. As vacas são sempre lavadas antes da ordenha?

Verão Sim

 Não

Inverno Sim

 Não

9. Detergentes ou outros sanitizantes são adicionados na água de lavagem das vacas?

a. Sim. Tipo _____ Concentração _____%

b. Não

Sala de Secagem das Vacas

10. Quanto tempo as vacas permanecem na sala de secagem antes de serem ordenhadas?

_____ minutos

Pré-Sanitização das Vacas

11. As tetas das vacas são sanitizadas antes da ordenha (*predip*)?

a. Sim

b. Não

12. Como é aplicada o sanitizante?

- a. Com aspersão (*spray*)
- b. Com imersão (*dip*)

Sala de Ordenha

13. Quantas vezes por dia as vacas são ordenhadas?

- a. Duas
- b. Três

14. O úbere das primeiras vacas ordenhadas estão secos?

- a. Sim
- b. Não

15. Qual o % de vacas com as úberes molhadas no momento da ordenha?

- a. 76 - 100 %
- b. 51 - 75 %
- c. 26 - 50 %
- d. 0 - 25 %

16. Qual o % de vacas limpas na sala de ordenha?

- a. 76 - 100 %
- b. 51 - 75 %
- c. 26 - 50 %
- d. 0 - 25 %

17. Das 20 vacas amostradas para análise microbiológica quantas estão com as tetas sem sujidade visível?

18. Qual o tipo de sala de ordenha?

- a. *Herringbone* (espinha de peixe)
- b. *Parallel* (paralelo)
- c. *Flatbarn* (nivelado com o chão)
- d. *Rotary* (rotativo)
- e. *Side open* (aberto do lado)

19 - Qual é a média da contagem de células somáticas do leite do tanque de estocagem no último ano?

20 - Qual é a média da contagem de bactérias mesofílicas totais do leite do tanque de estocagem no último ano?

21 - Qual é a média da contagem de bactérias termodúricas do tanque de estocagem no último ano?

22 - Qual é a média da contagem de coliformes do leite do tanque de estocagem no último ano
