

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

GILBERTO HENRIQUE SIMÕES

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS NO
LEITE CRU E PONTOS CRÍTICOS DE CONTAMINAÇÃO

Marechal Cândido Rondon – PR

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

GILBERTO HENRIQUE SIMÕES

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS NO
LEITE CRU E PONTOS CRÍTICOS DE CONTAMINAÇÃO**

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - na Área de Concentração: Produção e Nutrição Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Magali Soares dos Santos Pozza
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maximiliane A. Zambom

Marechal Cândido Rondon - PR

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S593i Simões, Gilberto Henrique
 Isolamento e identificação de bactérias gram negativas no leite cru e
 pontos críticos de contaminação. / Gilberto Henrique Simões.— Marechal
 Cândido Rondon, 2014.
 83p.

 Orientador: Prof^a. Dr^a. Magali Soares dos Santos Pozza
 Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Maximiliane A. Zambom
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
 Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

 1. Produção animal. 2. Agentes. 3. Estafilococos. 4. Lipolítica. 5. Manejo.
 6. Proteolítica. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 636

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 9^a/965

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

GILBERTO HENRIQUE SIMÕES

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS NO
LEITE CRU E PONTOS CRÍTICOS DE CONTAMINAÇÃO**

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - na Área de Concentração: Produção e Nutrição Animal. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Magali Soares dos Santos Pozza. Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maximiliane Alavarse Zambom.

Marechal Cândido Rondon, 15 de abril de 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Magali Soares dos Santos Pozza
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof.^a Dr.^a Patrícia Barcellos Costa
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Ferenc Itsvan Bankuti
Universidade Estadual de Maringá

“O homem não é nada além daquilo que a educação faz dele”

Immanuel Kant

Aos meus pais, Avelino (in memoriam) e Ilda, pela educação e amor incondicional, obrigado por tudo. Amo vocês!

A minha esposa, Caroline, pelo companheirismo e amor sincero, amizade verdadeira,

Aos amigos que de alguma forma contribuíram para esta realização.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Á Deus por iluminar minha vida e caminhos traçados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade e conhecimentos adquiridos.

A minha orientadora Prof. Dr^a. Magali Soares do Santos, pela dedicação, paciência, conhecimentos, valores e amizade passados, obrigado por ter acreditado em mim.

À minha coorientadora Prof. Dr^a. Maximiliane Alavarse Zambom, por suas contribuições no desenvolvimento destes trabalhos.

Aos professores Dr. Ferenc Istvan Bankuti e Dr^a. Patrícia Barcellos Costa, por suas colaborações e ensinamentos repassados.

Aos amigos Maichel Lange, Marcelo Neumann, Deise Castagnara, Rodrigo Tinini, Josias, Fernando e a todos os outros, pela convivência, disponibilidade de tempo e ajuda na realização destes estudos.

À minha esposa, Caroline, por todo o seu carinho, amor, paciência e apoio durante todos estes anos juntos.

A minha família por estar presente em todos os momentos, mesmo quando não foi possível compartilhar.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram nesta conquista.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS NO LEITE CRU E PONTOS CRÍTICOS DE CONTAMINAÇÃO

RESUMO

A complexidade e diversidade da cadeia produtiva leiteira existente no país devem-se aos diferentes tipos de sistemas produtivos leiteiros e as características próprias que os envolvem, entre elas as diferenças espaciais e culturais encontradas em todo o território nacional, dificultando assim uma padronização na produção, planejamento, tecnificação e principalmente da qualidade de produção microbiológica da matéria-prima na cadeia leiteira. Afim de caracterizar os sistemas de produção leiteiros, os manejos empregados, pontos críticos de contaminação e de isolamento e identificação dos principais agentes envolvidos nas contaminações da microrregião de Marechal Cândido Rondon – PR, estudos foram realizados. Inicialmente efetuou-se seleção dentre 735 sistemas de produção leiteiros, nestes foram aplicados guias semiestruturados para levantamento de características de produção e manejo produtivo. A partir destes resultados foram empregadas técnicas de formação de clusters. Foram definidos cinco grupos homogêneos e distintos. Em cada grupo, 10% dos casos foram selecionados, totalizando 73 sistemas produtivos leiteiros. Posteriormente analisou-se o leite dos tanques de resfriamento para contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT). Após as contagens, 35 propriedades foram selecionadas para as pesquisas, pois obtiveram contaminações acima dos limites vigentes de CCS e CBT de acordo com IN 62 do MAPA. Após a formação dos sistemas sucedeu-se coletas referentes às pesquisas, que consistiram de questionário semi-estruturado, contemplando variáveis relativas ao manejo higiênico-sanitário, bem como, coleta de leite do tanque e swabs de pontos críticos de contaminação na produção leiteira, tais como: mão do ordenhador, ordenhadeira e tanque de resfriamento. Procedeu-se com análises microbiológicas e a quantificação de *Staphylococcus* sp da mão-do-ordenhador, ordenhadeira, tanque e leite $9,6 \times 10^3$, $2,2 \times 10^4$, $1,4 \times 10^4$ e $3,8 \times 10^3$ UFC/mL respectivamente; e quantificação, isolamento e identificação de bactérias proteolíticas e lipolíticas, nos quais os agentes de maior incidência foram a *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella oxytoca* e *Yersinia enterocolitica* ambos com 8,6% de frequência nos diferentes sistemas de produção leiteiros estudados.

Palavras-chave: agentes, estafilococos, lipolítica, manejo, proteolítica.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF GRAM NEGATIVE BACTERIA IN RAW MILK AND CRITICAL CONTAMINATION POINTS

ABSTRACT

The complexity and diversity of the dairy production chain in the country are due to the different types of dairy production systems and their specific characteristics, among them, the spatial and cultural differences found across the country, making it difficult to standardize the production, planning, technicization and especially the microbiological quality of the raw material in the dairy chain. In order to illustrate the dairy production systems, the managements, critical points of contamination, isolation and identification of the main factors involved in the contamination in Marechal Cândido Rondon - PR, some experiments were conducted. Initially it was performed a selection among 735 dairy production systems for semi - structured guides (production characteristics and general management) and cluster analyzes, which formed five distinct and homogeneous groups of dairy production systems. Only 10% of properties were selected to represent each group, totalizing 73 properties. Subsequently it was analyzed the milk cooling tanks for the somatic cell count (SCC) and total the bacterial count (TBC). After the counts, only 35 properties were selected for the research because they showed contaminations rates above current limits for SCC and TBC according to the MAPA regulation (IN 62). After the formation of the systems, collections related to the research were made, which consisted of the semi-structured questionnaire guide (hygienic-sanitary management), milk collection of the tank and swabs of critical points of contamination in milk production (hand of the milker, milking machine and cooling tank). The experiment was proceeded with microbiological analysis and quantification of *Staphylococcus sp*, hand of the milker, milking machine, tank and milk 9.6×10^3 , 2.2×10^4 , 1.4×10^4 and 3.8×10^3 CFU/mL respectively, and quantification, isolation and identification of proteolytic and lipolytic bacterias, in which the agents of highest incidence were *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Yersinia enterocolitica* and *Klebsiella oxytoca* both with 8.6% frequency in the different dairy production systems studied.

Keywords: agents, staphylococci, lipolytic, management, proteolytic.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACM	Análise de Correspondência Múltipla
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
IN 62	Instrução normativa 62
SPL's	Sistemas de produção leiteiros
UFC	Unidade formadora de colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das variáveis e suas contribuições para formação das dimensões da ACM.....	61
Figura 2. Representação das tipologias dos SPL's sobre o plano fatorial para a ACM.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e desvio padrão das amostras de CCS e CBT dos SPL's	33
Tabela 2. Frequências dos manejos higiênicos-sanitários (variáveis qualitativas) utilizados nos SPL's do Grupo 4, conforme os parâmetros de CCS e CBT encontrados.....	35
Tabela 3. Frequências dos manejos higiênicos-sanitários (variáveis qualitativas) utilizados nos SPL's do Grupo 3, conforme os parâmetros de CCS e CBT encontrados.	37
Tabela 4. Frequências dos manejos higiênicos-sanitários (variáveis qualitativas) utilizados nos SPL's do Grupo 1, conforme os parâmetros de CCS e CBT encontrados.....	38
Tabela 5. Frequências dos manejos higiênicos-sanitários (variáveis qualitativas) utilizados nos SPL's do Grupo 2, conforme os parâmetros de CCS e CBT encontrados.....	39
Tabela 6. Contagem médias de mesófilos proteolíticos e lipolíticos dos Sistemas de Produção de Leiteiro analisados.....	41
Tabela 7. Bactérias Gram negativas identificadas e suas frequências encontradas utilizando o kit Bactray I e II, nos diferentes SPL's.	44
Tabela 8. Relação de variáveis submetidas a Análise de Correspondência Múltipla, e suas respectivas descrições dos níveis.....	57
Tabela 9. Médias de CCS e CBT, e porcentagem de propriedades acima dos limites, dados referentes as duas amostragens nas coletas de leite dos sistemas de produção leiteiros.	65
Tabela 10. Médias de contaminações por estafilococos (UFC/cm ² ; UFC/mão ou UFC/ml) no pontos de coleta das amostras; conjunto de ordenhadeira (teteira), mão-do-ordenhador, tanque de armazenamento e leite, nas referidas propriedades dos seus respectivos grupos (cluster).	66

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Produção leiteira	14
2.2. Sistemas de produção leiteiro	16
2.3. Qualidade microbiológica do leite	18
2.4. Fatores de risco e influência na composição e qualidade do leite	21
2.5. Referências	22
3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS NO LEITE CRU REFRIGERADO DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO LEITEIROS E SEUS MANEJOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS ADOTADOS.....	27
3.1. Introdução.....	29
3.2. Material e Métodos	30
3.3. Resultados e Discussão	33
3.4. Conclusão	45
3.5. Referências	45
4. PONTOS CRÍTICOS DE CONTAMINAÇÃO EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO LEITEIROS.....	51
4.1. Introdução.....	53
4.2. Material e Métodos	54
4.3. Resultados e Discussão	59
4.4. Conclusão	70
4.5. Referências	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

O crescimento econômico e biotecnológico nas diversas áreas da agropecuária vem demonstrando o grande potencial que o país possui, sendo a cadeia leiteira uma das atividades com maior relevância. A produção leiteira no Brasil tem fundamental importância na agropecuária brasileira, o seu papel de destaque nos últimos anos é devido ao alto crescimento produtivo. No ano de 2012 foram cerca de 32 bilhões de litros produzidos (IBGE, 2012).

A complexidade e diversidade na cadeia produtiva leiteira deve-se aos diferentes tipos de sistemas produtivos leiteiros e as características próprias que os envolvem, entre elas as diferenças espaciais e culturais encontradas em todo o território nacional, dificultando assim uma padronização na produção, planejamento e tecnificação da cadeia leiteira.

A propriedade leiteira ou unidade de produção de leite deve ser considerada como um “Sistema de Produção”, sendo este representado por um conjunto de componentes, processos e produtos inter-relacionados, gerenciados de forma harmônica, visando otimizar seus resultados (STUMPF et al., 2000).

A qualidade do leite é um termo muito genérico e possui um histórico muito grande de discussões sobre isto, com a preocupação e avanço da busca pela qualidade dos produtos, origem e processamento das matérias-primas. Isso se deve aos consumidores almejarem uma melhor qualidade de vida, principalmente relacionada à alimentação, envolvendo a qualidade microbiológica destes alimentos. O principal parâmetro para verificar a qualidade é o perfil microbiológico e o índice de contaminação microbiana (NERO et al., 2009).

O aspecto microbiológico é um fator decisivo na obtenção de leite com qualidade nas propriedades rurais, já que inúmeros fatores podem interferir no processo produtivo. Os microrganismos de maior importância na produção leiteira são aqueles que contaminam o produto durante e após a ordenha. A contaminação é muito variável, qualitativamente e quantitativamente, em função das condições de higiene presentes (MIGUEL, 2010).

Os principais microrganismos envolvidos na contaminação e qualidade microbiológica são fungos, bactérias, vírus e leveduras. Dentre estes inúmeros microrganismos, as bactérias são provavelmente as mais estudadas e que causam grandes problemas alimentares e tecnológicos devido à atividade enzimática proteolítica e lipolítica.

A necessidade e a realização de maiores estudos na identificação e profilaxia das principais bactérias envolvidas nos diferentes tipos de sistemas de produção é de extrema importância, pois contribuirá para o melhor entendimento dos pontos críticos na produção e para o melhoramento da qualidade da matéria-prima obtida.

Assim, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de identificar as principais bactérias mesófilas proteolíticas e lipolíticas envolvidas em diferentes sistemas de produção leiteiro, e os principais agentes contaminantes lipolíticos. Objetivou-se também o isolamento e identificação das principais bactérias Gram-negativas do leite oriundos de tanques de resfriamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção leiteira

A atividade da pecuária leiteira é de fato umas das mais importantes no contexto histórico e atual do Brasil. A cadeia produtiva do leite pode ser encontrada, mesmo que em diferentes aspectos, em todas as regiões brasileiras, atuando como uma atividade geradora de renda, tributos e empregos (LOPES et al., 2013).

A produção leiteira no Brasil tem grande representatividade no cenário internacional, e vem obtendo ótimo crescimento nos últimos anos. No ano de 2012 o país alcançou a terceira posição mundial, com uma produção de 32,3 bilhões de litros (IBGE, 2012).

Dados coletados desde 1975 mostram o crescimento gradativo que o país vem alcançando na atividade, estima-se que em 2011 o Brasil obteve uma produtividade 1.374 litros/animal/ano, com um pouco mais de 30,5 milhões de animais ordenhados, 9,75% maior que o ano de 2010 (EMBRAPA, 2010). Existe ainda uma distância muito grande dos países altamente tecnificados, como Arábia Saudita, Israel e Estados Unidos, com 14.9, 10.3 e 9.5 mil respectivamente, mas evidencia-se o crescimento acelerado que o país alcançou nesta última década, de 21,2% na produção litros/animal/ano.

O país apresenta grande diversificação de produção, e estados, como as regiões Sul e Sudeste são os que apresentam as maiores produtividades e grandes avanços tecnológicos na área. O Estado do Paraná é caracterizado por uma atividade leiteira entre umas das mais desenvolvidas do país e com grande importância socioeconômica. Estima-se que em 2011 alcançou o percentual de 11,9% da produção total nacional, perdendo apenas para Minas Gerais e Rio Grande do Sul, com uma produção de aproximadamente 3,8 bilhões de litros, representando um crescimento de 5,9% em relação ao ano de 2010 (IBGE, 2011).

Em relação às produções municipais, o Paraná tem excelente representatividade onde Castro (PR) o maior produtor de leite do Brasil com 210 bilhões de litros, conhecido também como a “capital do leite” no país. Ainda mais três municípios se destacam: Carambeí (5° - 120 bilhões de litros), Marechal Cândido Rondon (13° - 95 bilhões de litros) e Toledo (18° - 84

bilhões de litros), entre os 20 maiores produtores nacionais (IBGE, 2011). Estes dados evidenciam a importância da Região Oeste do Estado do Paraná na pecuária leiteira.

A região Oeste do Paraná tem grande importância na atividade leiteira para a federação, além da fundamentação econômica e social que este empreendimento envolve. Por mais que o estado apresente alta produtividade em relação a produção nacional, existe pouca homogeneidade entre os produtores de leite. Na grande maioria ainda há o predomínio de pequenos produtores com baixas produções e pouca ou quase nenhuma tecnificação. Uma pequena parcela responde pelos grandes produtores, com alta produtividade e tecnologia, correspondendo por boa porcentagem da produção total de leite (IPARDES, 2009).

Segundo Bazotti et al. (2012) pode-se classificar os produtores do estado quanto a produção diária (litros/dia) em três dimensões distintas; até 50 litros/dia, 51 até 250 litros/dia e acima de 251 litros, onde respectivamente tem-se 55,3%, 38,8% e 5,9%. Esta produtividade está intimamente ligada ao porte que os produtores se enquadram, evidenciando que na sua grande maioria de pequeno e médio porte, assim enquadrados devido à baixa tecnificação, produção voltada a pasto ou até mesmo consumo próprio e pouca ou nenhuma higienização.

Quanto ao nível tecnológico apresentado na Região Oeste, os produtores têm os seguintes percentuais, baixo (48,5%), médio (31,4%) e alto (20,1%) com um total de 20.731 produtores. Esta classificação apresentou como variáveis as benfeitorias, raças leiteiras, máquinas, equipamentos e tipo de ordenha (BAZOTTI et al., 2012).

O incremento em tecnologia na pecuária leiteira trouxe conjuntamente a preocupação com um produto de melhor qualidade, basicamente dois aspectos fundamentais: a contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT). Estas mensurações são importantes para avaliar a qualidade do leite, pois tem interferência direta no processamento da matéria-prima visando assim produtos de alta qualidade e principalmente, níveis microbiológicos seguros.

Toda cadeia produtiva, desde órgãos públicos e privados, lançam algumas medidas para melhorias dos índices e a qualidade da matéria-prima, com altos ganhos na padronização e tecnificação das propriedades. Nos dias atuais, diversas variáveis entram como forma de melhorar a remuneração e valorização para estes produtores, dentre elas a gordura, proteína, lactose,

CCS, CBT e volume, motivando estes produtores a buscar especialização, levando a produção de leite de qualidade.

Sabe-se que as dificuldades que envolvem toda a cadeia produtiva são inúmeras e algumas vezes particulares. Para que o desenvolvimento ocorra cada vez mais acelerado e corretamente, é necessário que exista uma tríade entre o produtor, indústria e pesquisadores, pois é possível um desenvolvimento quantitativo e qualitativo, em especial da produtividade e qualidade do leite.

A propriedade é hoje o local onde buscam-se melhorias em seus aspectos físicos e biológicos, e a partir do animal é que se iniciam os cuidados para que possamos ter um alimento seguro e de boa qualidade. Toda cadeia produtiva, desde órgãos privados e públicos, buscam estes objetivos de várias formas e maneiras.

2.2. Sistemas de produção leiteiro

A classificação e o conhecimento pleno dos diversos tipos de sistemas agroindustriais leiteiros e de suas variáveis envolvidas, é de grande relevância para o entendimento e melhorias na produtividade final da matéria-prima essencial que é o leite. Moura et al. (2013) ressaltaram a importância da caracterização técnica de um sistema de produção, identificando as estruturas e os componentes próprios, iniciando um processo que possa melhorar e promover a pecuária, estudando as unidades de produção encontradas em cada subsistema e procurando orientar a tomada de decisões para novas pesquisas.

Lieber (2012) aplica o conceito de sistema como uma forma lógica de apreensão da realidade. Ao se formular sistemas, não se busca um reflexo do mundo real, mas sim a descrição ou destaque dos “traços” da realidade, cujo conjunto permite a percepção de uma condição de ordem e a proposição de uma forma operativa voltada para um dado objetivo.

O sistema de produção leiteiro (SPL's) pode ser definido segundo Smith (1999) como o conjunto de manejos ou práticas agropecuárias, tais como, manejo reprodutivo e sanitário dos animais, ou manejo de pastagem e os fatores fixos e variáveis tais como solo, mão-de-obra, rebanho, maquinários, concentrado e fertilizantes, que quando integrados de uma forma mais

ou menos organizada em um processo de produção, definem os níveis de produção e eficiência que pode alcançar a exploração leiteira.

Uma das principais dificuldades do setor lácteo brasileiro é a padronização da qualidade do leite no país, com base nas exigências internacionais de qualidade, segurança do alimento e mercados consumidores (MILINSKI, 2008). As exigências cada vez mais rigorosas são maneiras para acelerar estas padronizações, melhorando a qualidade dos produtos e homogeneização dos SPL's existentes. Estas inúmeras diferenças existentes entre os sistemas representa uma das dificuldades, pois as barreiras sanitárias impostas pelos países importadores estão mais rígidas, exigindo desde a seleção do rebanho, passando por métodos de criação e manutenção, vacinação e controle de saúde dos animais, ambiente e manejo adequados de ordenha, armazenamento, estocagem, transporte e manuseio do leite, afim de uma rastreabilidade da produção desde a saída do leite a partir da glândula mamária.

A complexidade existente da inter-relação de variáveis e componentes dos sistemas de produção leiteiros dificultam a classificação e padronização, tanto da qualidade quanto dos sistemas produtores, onde o grande espaço territorial brasileiro corrobora, apresentando diversas culturas e ampla variabilidade ambiental; contribuindo para a presença de sistemas heterogêneos.

A forma de produção e as variações da mesma podem estar ligadas a diversos fatores como: fisicobiológicos, socioeconômicos, e culturais (BALCÃO, 2012). Devido a isso é indispensável identificar as distintas combinações entre estes fatores e sua relação com as formas de fazer agricultura (ESCOBAR E BERDEGUE, 2010).

Tipificar sistemas de produção ou grupos geralmente fazem o uso de algum método estatístico multivariado devido ao grande volume de informações e também a grande variabilidade de dados (BALCÃO, 2012). Normalmente estes tipos de pesquisas vão além de apenas descrever sistemas de produção e suas particularidades, incluindo comparações entre os sistemas identificados em relação às principais características que estes apresentam.

As indústrias captadoras possuem uma base de informações mensais das características do leite, tais como volume, teores de proteína, lactose, gordura e sólidos totais, contagem de células somáticas e contagem microbiana. Essas informações auxiliam a definir os valores a serem pagos aos produtores e as ações de assistência técnica, entretanto, a eficiência com que

essa base de dados tem sido utilizada tem esbarrado na ausência de ferramentas de análises que simplificam o campo de ação (BODENMÜLLER FILHO et al., 2010).

2.3. Qualidade microbiológica do leite

A palavra qualidade ou até mesmo avaliação da qualidade de um item ou produto deve ser muito bem interpretada e ter requisitos mínimos e variáveis que possam ser mensuradas ou estipuladas, para que assim aprove ou rejeite o produto avaliado em questão. O leite é um dos alimentos que possui uma composição físico-química e nutricional completa. Devido a isso ele ocupa lugar de destaque entre os alimentos de elevado valor biológico, sendo fundamental para a dieta humana. Isso também constitui um excelente substrato para o desenvolvimento microbiano, principalmente os patogênicos (MOURA, 2012).

Segundo a legislação brasileira da Instrução Normativa 62 (IN 62), a definição legal do produto conforme o anexo I é: “Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas.” (BRASIL, 2011).

A qualidade do leite pode ser definida em termos de sua integridade, ou seja, sem sofrer adição de substâncias e/ou remoção de componentes de sua composição química, características físicas e livre de deterioração microbiológica e presença de patógenos (DURR, 2004).

O leite para ser considerado de boa qualidade deve apresentar as seguintes características: sabor agradável, alto valor nutritivo, ausência de agentes patogênicos e contaminantes (antibióticos, adição de água e sujidades), reduzida contagem de células somáticas e baixa carga microbiana (FONSECA E SANTOS, 2000)

O leite bovino é um fluido composto por uma série de nutrientes sintetizados na glândula mamária, a partir de precursores derivados da alimentação e do metabolismo. Os componentes incluem água, glicídeos (basicamente lactose), gordura, proteína (principalmente caseína e albumina), minerais e vitaminas (GONZÁLEZ E CAMPOS, 2003).

A qualidade do leite é determinada por um conjunto de fatores. De acordo com a legislação no país, para ser considerado de qualidade, o leite deve apresentar determinada

composição e requisitos físicos, químicos, organolépticos e microbiológicos (BRASIL, 2011). Basicamente, nos dias atuais, o leite cru refrigerado deve apresentar os seguintes requisitos microbiológicos para a região Sul do país: no máximo 600.000 CS/ml e 600.000 UFC/ml, para CCS e CBT, respectivamente.

A microbiota que pode ser encontrada no leite cru é muito variável, mas tem influência direta na qualidade dos produtos lácteos. Os principais contaminadores envolvidos são as bactérias. Existem inúmeras, mas basicamente elas podem ser classificadas em três categorias distintas; segundo a faixa ótima para o seu crescimento e multiplicação, bactérias psicrófilas (faixa ótima de crescimento 0° até 15 °C), bactérias mesófilas (faixa ótima de crescimento 20 até 40 °C) e bactérias termófilas (faixa ótima de crescimento entre 44 até 55 °C). Duas outras categorias são de extrema importância: as bactérias psicrotróficas (abaixo de 7 °C) e as termodúricas, que são bactérias capazes de resistir ao processo de pasteurização (FONSECA E SANTOS, 2000).

Os grupos de mesófilas e psicrotróficas são as bactérias que estão intimamente ligadas, em proporção, com as contaminações no leite. Segundo Silveira et al. (1998), um grande número de espécies estritamente mesófilas, já estão sendo incluídas também em psicrotróficas.

A grande maioria dos microrganismos patogênicos e deteriorantes é encontrado na microbiota mesofílica. A contagem de aeróbios mesófilos funciona como indicador de qualidade dos alimentos. Está enumeração fornece informações relevantes como a eficácia da higiene no processo de fabricação, o efeito da temperatura de conservação, o grau de alteração do alimento e consequentemente a vida útil dos alimentos (CARVALHO, 2001).

Sabe-se que o processo de resfriamento favorece a redução da reprodução microbiana, em particular as bactérias mesófilas. Aplicação desta prática facilita, por outro lado, a seleção e crescimento, em especial, de bactérias psicrotróficas dos gêneros *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e outras. Muitos desses microrganismos conseguem se multiplicar e produzir enzimas, proteases e lipases, capazes de deteriorar o leite sob refrigeração. Assim, a vida de prateleira do leite cru resfriado não consegue exceder a cinco dias (TEBALDI et. al., 2008).

Fonseca e Santos (2000) ressaltam que as principais bactérias psicrotróficas são *Pseudomonas spp*, *Bacillus spp*, *Serratia spp*, *Listeria spp*, *Yersinia spp*, *Lactobacillus spp*, *Flavobacterium spp*, *Corynebacterium spp*, *Micrococcus spp* e *Clostridium spp*.

A prática corrente de estocagem do leite cru a 4-7 °C por 3 a 4 dias antes do processamento, permite o crescimento de bactérias psicrotróficas. Este armazenamento do leite em temperatura de refrigeração tem resultado em novos problemas de qualidade para a indústria (SILVEIRA et. al., 1998).

A baixa contagem de microrganismos psicrotróficos no leite é de fundamental importância para sua qualidade, pois a atividade metabólica desses microrganismos leva a alterações bioquímicas nos constituintes do leite, as quais limitam a vida útil dos produtos. Uma ampla variedade de problemas relacionados à qualidade de produtos lácteos pode estar associada à ação das lipases e proteases de origem microbiana, como alteração do sabor e odor do leite, e gelatinização do leite longa-vida (FONSECA E SANTOS, 2000).

Os microrganismos mesófilos também têm a capacidade de multiplicar-se produzindo enzimas extracelulares como lipases e proteases, contribuindo para deterioração do leite. Necessitam apenas de temperatura mais elevada, e devido aos tanques de refrigeração, podem permanecer por mais do que 24 horas dentro do mesmo em temperaturas ótimas para o crescimento, sendo esse um fator a mais para contribuir com a alteração do número da microbiota mesofílica (TEBALDI et. al., 2008).

A vulnerabilidade da gordura do leite e da proteína podem acarretar alterações físico-químicas e também conduzir à deterioração, assim, reduzindo a sua qualidade. De acordo com Cromie (1991), os fatores que influenciam a vida de prateleira do leite pasteurizado incluem a qualidade da matéria-prima, a temperatura/tempo de pasteurização binomial, microrganismos resistentes à pasteurização (particularmente psicrotróficos), a presença e a atividade de contaminantes pós pasteurização, o sistema de embalagem e a armazenagem. A temperatura pós pasteurização tem o maior impacto sobre a estabilidade do produto e a vida de prateleira de leite pasteurizado.

As proteases atuam sobre as proteínas, hidrolisando-as para compostos menores acarretando perdas de rendimento e dando origem a peptídeos, que podem ser responsáveis por sabores desagradáveis, principalmente o amargor. As lipases agem sobre a gordura do leite,

produzem uma lipólise excessiva e descontrolada, que pode descaracterizar o produto, conferindo-lhe um sabor de ranço, sabão e outros (MOURA, 1997).

2.4 Fatores de risco e influência na composição e qualidade do leite

Há inúmeras variáveis que interferem direta e indiretamente na composição e qualidade da matéria-prima. O conhecimento da composição do leite é essencial para a determinação de sua qualidade, pois define diversas propriedades organolépticas e industriais (NORO et al., 2006).

Segundo Machado Filho (2011) a qualidade do leite baseia-se em três parâmetros: higiene e saúde (livre de patógenos e contaminantes, boa aparência, cor e viscosidade); valor biológico do produto (nutrientes esperados e existentes no alimento, constituição química) e aspectos éticos (“custo ético” de produção: impacto ambiental, social, cultural e bem-estar).

A composição do leite pode ser determinada por vários fatores, entre estes os metabólico-nutricionais, podem ser divididos em; fatores extrínsecos ao meio-ambiente, nutrição (composição da dieta), tipo de alimentação (pastagem, ração, suplementos), manejo (nível de produção) e época do ano; e os fatores intrínsecos aos animais, divididos em: genéticos, sanitários, grau de adaptação metabólico e período de lactação (BARROS, 2001).

Os parâmetros de qualidade são cada vez mais utilizados para detecção de falhas nas práticas de manejo, servindo como referência na valorização da matéria-prima (DURR, 2004). Os principais parâmetros utilizados pela maioria dos programas de qualidade industrial são os conteúdos de gordura, proteína, sólidos totais e a contagem de células somáticas (MONARDES, 1998).

De acordo com Fava e Pinto (2010), a garantia de qualidade do leite entregue depende da conscientização dos produtores quanto ao manejo dos animais e ao cuidado com a higiene das instalações e dos equipamentos. Os manejos adotados são imprescindíveis na qualidade e contaminação que possa ocorrer no leite produzido.

A contaminação microbiana do leite cru é diretamente afetada pela saúde da glândula mamária, a higiene da ordenha, o ambiente em que a vaca fica alojada e os procedimentos de

limpeza dos equipamentos (GUERREIRO et al., 2005). Sendo que um dos mais importantes fatores na avaliação da qualidade do leite é a contagem bacteriana, que cada vez mais é exigida com índices rigorosos, pois tem alta interferência na produção dos derivados lácteos.

De acordo com Taffarel et al. (2013), a elevada contagem bacteriana total (CBT) é indicativo da deficiência na limpeza e higienização dos equipamentos de ordenha, do sistema de refrigeração, dos tetos e também da presença de mastite nas vacas.

As células somáticas encontradas no leite são constituídas por células de defesa e epiteliais provenientes da descamação do tecido de revestimento e secretor interno da glândula mamária (GRAZZIOTIN, 2013). A magnitude da contagem de células somáticas (CCS) indicam os prejuízos que são causados aos animais e alterações na composição do leite, pois este aumento da CCS ocasiona em redução na porcentagem de gordura. Entretanto, se a redução da produção de leite for mais acentuada que o decréscimo da produção de gordura, ocorrerá concentração deste componente, aumento da porcentagem de proteína, e redução das porcentagens de lactose e sólidos totais (PEREIRA et al. 1997).

Além dos prejuízos à produção, composição e qualidade do leite, a CCS também evidencia que a glândula mamária pode apresentar infecções e demais prejuízos ocasionados ao animal, por isso é o indicador de avaliação da saúde da glândula mamária. O nível elevado de células somáticas afeta negativamente a qualidade do leite fluído pasteurizado, desenvolvendo defeitos sensoriais como a rancidez e sabor amargo, sendo causados pelos processos de lipólise e proteólise respectivamente (MA et al. 2000).

Outros prejuízos de grande importância são o rendimento e qualidade de produtos lácteos, diminuindo rendimento de queijos e tempo de coagulação, aumento da perda de gordura e caseína para o soro e alcalinidade do pH (RANGEL et al., 2013).

Sabe-se que são numerosos os fatores de risco e de influência na qualidade e composição da matéria-prima nas propriedades de leite. Cada fator pode inferir tanto quantitativamente quanto qualitativamente, esses fatores ou variáveis tem as suas mensurações e podem acarretar prejuízos relevantes a qualidade final do leite.

2.5 Referências

- BALCÃO, L. F. Tipologia da atividade leiteira na região noroeste de Santa Catarina. 2012. 105p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras, 2001, Passo Fundo. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, p.44-57, 2001.
- BAZOTTI, A.; NAZARENO, L. R.; SUGAMOSTO, M. Caracterização socioeconômica e técnica da atividade leiteira do Paraná. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, Curitiba, n.123, p.213-234, jul./dez. 2012.
- BONDERMULLER FILHO, A.; DAMASCENO, J.C.; PREVIDELLI, I.T.S. et al. Tipologia de sistemas de produção baseado nas características do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.8, p.1832-1839, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, 29 dez. 20011. Seção 1, p.13-14, 2011.
- CARVALHO, E. P. de. **Microbiologia de alimentos**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. 128p.
- CROMIE, S. J. Microbiological aspects of extended shelf life products. **Australian Journal of Dairy Technology**, 46, p.101-104, 1991.
- DÜRR, J.W. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite: uma oportunidade única. In: DÜRR, J.W. et al. (Ed.). **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: UPF, 2004. 331p.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGOPECUÁRIA. Tabela 02.11. Principais países produtores de leite no mundo. 2010. 1p. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0211.php>> acessado 04/09/2013> Acessado em: 04/09/2013.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGOPECUÁRIA. Tabela 02.19. Produtividade animal em países selecionados – 2010. 2010. 1p. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0219.php>> acessado 04/09/2013> Acessado em: 04/09/2013.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGOPECUÁRIA. Tabela 02.32. Efetivo bovino, vacas ordenhadas e produção de leite no Brasil 1975 a 2010. 2010. 1p. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0232.php>> acessado 04/09/2013> Acessado em: 04/09/2013.

- ESCOBAR, G.; BERDEGUÉ, J. **Tipificacion sistemas produccion agricola**, Santiago de Chile: Gráfica Andes Ltda. 1990. 282p.
- FAVA, L. W.; PINTO, A. T. Ocorrência de leite ácido e de resíduos de antimicrobianos no leite cru entregue em laticínio na região do Vale do Taquari, RS, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre: p. 419-423, mar. 2010.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos, 2000. 175p.
- GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n. 1, p. 216-222, jan/fev. 2005.
- GONZÁLEZ, F.H.D. CAMPOS, R. Indicadores metabólico nutricionais do leite. In: GONZÁLEZ, F.H.D., CAMPOS, R. (eds.): **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica da Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 31-47, 2003.
- GRAZZIOTIN, S. Z.; FRAGA, D. R., BARONI, J. I.; MINUZZI, T. SARTORI, C. O.; SCHENEIDER, R. Qualidade, composição e nitrogênio uréico do leite de vacas das raças Jersey e holandesa nas diferentes estações do ano. In: XXI Seminário de Iniciação Científica. Salão do conhecimento, Unijuí, 2013.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013. Tabela 23. Produção de leite no período de 01.01 a 31.12 e participações no total da produção segundo as Unidades da Federação e os 20 municípios com as maiores produções em ordem decrescente. 2011. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/tabelas_pdf/tab23.pdf>. Acesso em 13/05/2013.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v.40, p.1-71, 2012.
- IPARDES. Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná. Curitiba, 2009. Convênio IPARDES, SETI, EMATER. In: BAZOTTI, A.; NAZARENO, L. R.; SUGAMOSTO, M. Caracterização socioeconômica e técnica da atividade leiteira do Paraná. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, Curitiba, n.123, p.213-234, jul./dez. 2012.
- LIEBER, R. R. **Teoria dos sistemas**. 2012. 23p.
- LOPES, P. F.; YAMAGUCHI, L. C. T.; REIS, R. P.; LOPES, C. F. Centro de custos e escala de produção na pecuária leiteira dos principais estados produtores do Brasil. In: XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Econômica e Sociologia Rural. Fortaleza – Ceará. 23 a 27 de Julho de 2006.

- MA, Y. et al. Effects of somatic cell count on quality and shelf life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, n.2, p.264-274, feb. 2000.
- MACHADO FILHO, L. C. P. Perspectivas globais da pecuária leiteira, segurança alimentar e qualidade ambiental. In: SANTOS, G. T.; SILVA KAZAMA, D. C.; DAMASCENO, J. C.; CECATO, U.; BRANCO, A. F. (Org.). **Anais do 4º Simpósio sobre sustentabilidade de pecuária leiteira na região sul do Brasil**. Maringá: Sthampa, p. 73-95, 2011.
- MIGUEL, P. R. R. Incidência de Contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade e agentes antimicrobianos. 2010. 58p. Dissertação, (Mestrado em Zootecnia), Unioeste, Marechal Cândido Rondon, 2010.
- MILINSKI, C. C.; GUEDINE, P. S. M.; VENTURA, C. A. A. O sistema agroindustrial do leite no Brasil: uma análise sistêmica. **Anais do 4º Congresso Brasileiro de Sistemas**, Franca, SP, 2008.
- MONARDES, H. Programa de pagamento de leite por qualidade em Quebec, Canadá. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1. 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, p.40-43, 1998.
- MOURA, J. F. O. de; PIMENTA FILHO, E. C.; GONZAGA NETO, S.; CÂNDIDO, E. P. Avaliação tecnológica dos sistemas de produção de leite bovino no Cariri da Paraíba. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.14, n.1, p.121-131, jan./mar., 2013.
- MOURA, L. B. Análise microbiológica de leite pasteurizado tipo C destinado ao programa leite é saúde no Ceará. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró – RN. V. 7, n. 5, p. 87-90, dezembro de 2012 (Edição Especial).
- MOURA, C. J. Efeito do resfriamento do leite sobre o rendimento e lipólise do queijo tipo parmesão. 1997. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.
- NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por característica de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 29(2): 386-390, abr.-jun. 2009.
- NORO, G.; GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R.; DURR, J. W. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.1129-1135, 2006.
- PEREIRA, A.R., MACHADO, P.F., BARANCELLI, G. et al. Contagem de células somáticas e qualidade do leite. **Revista dos Criadores**. v.67. p.19-21, 1997.
- RANGEL, A. H. N.; ARAÚJO, V. M.; BEZERRA, K. C.; BARRETO, M. L. J.; MEDEIROS, H. R.; JÚNIOR, D. M. L. Avaliação da qualidade do leite cru com base na contagem de

células somáticas em rebanhos bovinos comerciais no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Archives of Veterinary Science**. V.18, n.1, p.40-45, 2013.

SIMTH, R. Caracterización de los sistemas productivos lecheros de Chile. In: Competitividad de La producción lechera nacional, 1999, Valdivia. **Anales...** Valdivia: Universidad Austral de Chile – Facultad de Ciencias Agrarias, p.274-302, 1999.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P.; TEIXEIRA, D. Influência de Microrganismos Psicrotróficos sobre a Qualidade do Leite Refrigerado: Uma Revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.55, p.21-27, 1998.

STUMPF, W.J.; BITTENCOURT, D.; GOMES, J.F. et al. (Eds.) **Sistemas de pecuária de leite: uma visão na região de clima temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. 195p.

TAFFAREL, L. E.; COSTA, P. B.; OLIVEIRA, N. T. E.; BRAGA, G. C.; ZONIN, W. J. Contagem Bacteriana total do leite em diferentes sistemas de ordenha e de resfriamento. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.80, n.1, p.7-11, jan./mar., 2013.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(3): 753-760, jul-set, 2008.

3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS NO LEITE CRU REFRIGERADO DE DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO LEITEIROS E SEUS MANEJOS HIGIÊNICO-SANITÁRIOS ADOTADOS

Resumo: A região Oeste do Paraná destaca-se como uma das maiores produtoras de leite do estado e possui alto número de sistemas de produção leiteiros com diferentes características de produção e tecnologias. Um ponto crítico, comum a estes sistemas, é a qualidade microbiológica do leite, que sofre influência de condições de manejo e agentes bacterianos. O objetivo deste trabalho foi quantificar, isolar e identificar os principais agentes mesófilos existentes nos diferentes sistemas de produção e suas características de manejo higiênico-sanitário. Foram coletas 35 amostras de leite cru refrigerado no período de setembro-outubro de 2012, no município de Marechal Cândido Rondon - PR, estas foram distribuídas em 4 grupos, conforme as contagens de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT): grupo 1 (> 600 mil CCS/mL), grupo 2 (>600 mil UFC/mL), grupo 3 (>600 mil CCS/mL e UFC/mL) e grupo 4 (< 600 mil CCS/mL e UFC/mL). Realizou-se a contagem de bactérias mesofílicas proteolíticas e lipolíticas, com médias totais de $1,3 \times 10^4$ e $1,4 \times 10^5$, respectivamente. Dezesesseis gêneros ou espécies de bactérias foram identificados; os principais gêneros ou espécies encontrados, e suas frequências foram: *Escherichia coli* (8,6%), *Escherichia fergusonii* (8,6%), *Klebsiella oxytoca* (8,6%), *Yersinia enterocolitica* (8,6%), *Hafnia alvei* (5,7%), *Serratia liquefaciens* (5,7%), *Serratia odorífera* (5,7%), *Citrobacter freundii* (2,85%), *Klebsiella ornithinolytica* (2,85%), *Klebsiella pneumoniae* (2,85%), *Proteus mirabilis* (2,85%), *Providencia rustigiani* (2,85%), *Providencia Stuart II* (2,85%), *Salmonella sp* (2,85%), *Serratia rubidaea* (2,85%) e *Shigella flexneri sorogrupo B* (2,85%). Independentemente das condições higiênicas identificadas na pesquisa, revelam alta incidência de agentes patogênicos nos sistemas de produção leiteiros. A orientação e adequação no manejo higiênico-sanitário das propriedades podem melhorar significativamente a qualidade microbiológica do leite produzido, tanto qualitativamente quanto quantitativamente.

Palavras-chave: bactérias, CBT, CCS, lipase, protease.

Abstract: The western region of Paraná stands out as one of the largest milk-producer area in the state and has a high number of dairy systems, with different production characteristics and technologies. A common factor to these systems is the microbiological quality of the milk,

which is influenced by the management conditions and also bacterial agents. The aim of this study was to quantify, isolate and identify the main mesophilic agents in the production systems and the hygienic-sanitary management involved. Thus, 35 samples of refrigerated raw milk were collected in the period of September, 2012 to October, 2012 in Marechal Cândido Rondon – PR. The samples were divided into 4 groups, according to the range of the somatic cells count (SCC) and colony forming unit (CFU) : group 1 (> 600.000 SCC/mL) group 2 (> 600.000 CFU/ml), group 3 (> 600.000 SCC/mL and CFU/ml) and group 4 (< 600.000 SCC/mL and CFU/ml). The count of proteolytic, lipolytic and mesophilic bacteria was performed with a total average of 1.3×10^4 ad 1.4×10^5 , respectively. Sixteen genres or species of bacteria were identified. The incidence and main genres or species found were: *Escherichia coli* (8.6%), *Escherichia Fergusoni* (8.6%), *Klebsiella oxytoca* (8.6%), *Yersinia enterocolitica* (8.6%), *Hafnia alvei* (5.7%), *Serratia liquefaciens* (5.7%), *Serratia odoriferous* (5.7%), *Citrobacter freundii* (2.85%), *Klebsiella ornithinolytica* (2.85 %), *Klebsiella pneumoniae* (2.85%), *Proteus mirabilis* (2.85%), *Providencia rustigiani* (2.85%), *Providencia Stuart II* (2.85%), *Salmonella sp* (2.85%), *Serratia rubidaea* (2.85%) and *Shigella flexneri serogroup B* (2.85%). The results showed a high incidence of pathogens in dairy production systems, regardless of the hygienic conditions. The orientation and adaptation in the hygienic-sanitary management of the properties may, significantly, improve the microbiological status of the milk produced, both in quality and quantity.

Keywords: bacteria, TBC, SCC, lipase, protease.

3.1 Introdução

São inúmeras bactérias que possuem grande importância na contaminação do leite, estas podem prejudicar a qualidade físico-química e principalmente microbiológica, sendo um risco elevado a saúde pública, pois na sua grande maioria são patogênicas. Dentre esta vasta gama de bactérias mesofílicas, a sua grande maioria apresentam alto envolvimento na degradação do leite cru refrigerado e seus derivados lácteos.

A contagem de mesófilos aeróbios é um dos indicadores mais utilizados, sendo possível obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, práticas de manufatura, matérias-primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira (RODRIGUES E MARQUES, 2012).

Os mesófilos tem alta incidência onde há falta de condições de higiene básicas e refrigeração do leite. Essas bactérias atuam fermentando a lactose, produzindo ácido láctico e acidificando o leite (SANTOS E FONSECA, 2002)

As enzimas produzidas apresentam capacidade termoresistente, com ação proteolítica e lipolítica, sendo que estas mantém a atividade enzimática após a pasteurização, ou até mesmo ao tratamento *ultra high temperature* (UHT) (SANTOS E FONSECA, 2001). Além disso, problemas na qualidade do leite estão relacionados à influência das mesmas, resultando em alteração de sabor do leite, perda de consistência na formação de coágulo para fabricação de queijos e gelatinização do leite longa vida.

O aumento do uso da tecnologia do resfriamento, como estratégia para manutenção das características microbiológicas e organolépticas, não associada aos cuidados básicos de higiene na obtenção do produto, fez com que esse grupo de microrganismos surgisse como o mais impactante na indústria de laticínios (IZIDORO et al., 2013).

Os parâmetros de avaliação da qualidade intrínseca do leite são: contagem bacteriana total (CBT) e a contagem de células somáticas (CCS). Segundo a legislação vigente no país, a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011), o limite máximo é de 600.000 UFC/mL e 600.000 células/mL para o leite cru refrigerado. As altas contaminações existentes devem-se a deficiência que pode ocorrer nos sistemas de produção leiteiros (SPL's), decorrentes da má eficiência no manejo higiênico-sanitário dos utensílios e equipamentos de ordenha, dos animais, água residual e dos sistemas de refrigeração.

Além da importância da contaminação da matéria-prima, o isolamento e identificação das principais bactérias existentes é de suma importância para que possam ser traçados objetivos e metas para otimização do manejo e metodologias higiênico-sanitárias específicas de controle.

Observando a problemática existente na atividade leiteira, este trabalho teve por objetivo a quantificação de bactérias lipolíticas e proteolíticas; e o isolamento e identificação de bactérias Gram negativas proteolíticas em diferentes sistema de produção leiteiros na região Oeste do Paraná.

3.2 Material e Métodos

A pesquisa e coleta de dados foi realizada no município de Marechal Cândido Rondon, localizado na região Oeste do Estado do Paraná. A coleta de dados e amostras foi realizada durante o período de Setembro a Outubro de 2012. O município pertence ao Terceiro Planalto Paranaense (Planalto de Guarapuava), possui clima predominante do tipo subtropical úmido (Cfa), segundo Koppen, com verão quente, geadas menos frequentes e concentração de chuvas nos meses de verão (IAPAR, 1994). O solo é composto por latossolo vermelho férreo, nitossolo vermelho e neossolo litólico (CUNHA E MORESCO, 2003). A precipitação média é de 1700 mm, sendo outubro o mês mais chuvoso e julho o mais seco, com temperatura média anual de 21 °C (PARANÁ, 1998).

Inicialmente foi realizada uma coleta primária, onde ocorreram entrevistas com o auxílio de questionários guia semi-estruturados aos produtores, onde objetivou-se mensurar informações básicas a respeito dos tipos de sistema de produção leiteiros existentes na microrregião, manejos produtivos inseridos e particularidades de produção envolvidos nos referidos SPL's, com um total de 735 SPL's entrevistadas.

Após a entrevista primária de dados e com o auxílio da estatística multivariada, análise e correspondência múltipla (ACM) e análise de clusters hierárquicos (CHA), os SPL's foram divididos em cinco grupos homogêneos. Após a formação dos grupos escolheu-se aleatoriamente 10% dos SPL's de cada grupo, para representação de cada grupo, totalizando 73 casos.

Em seguida foi realizada uma coleta secundária de dados (questionário guia semi-estruturado) e amostras do leite das 73 propriedades. O questionário foi voltado ao sistema de produção, características higiênico-sanitárias e armazenamento; e análises do leite quanto a

CBT e CCS. Este leite coletado do tanque de resfriamento foi acondicionado em frascos padronizados de aproximadamente 70 mL, transportados sob refrigeração (máximo 5°C) até a realização das análises. Um dos frascos continha o conservante Bronopol® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) para análise de contagem de células somáticas (CCS) e o outro frasco continha o conservante Azidíol®, o qual era destinado para contagem bacteriana total (CBT). As análises foram realizadas na Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa – APCBRH, utilizando-se do equipamento Somacount 500® para CCS e Bactocount IBC® para a quantificação do CBT.

A partir desta segunda coleta de dados foram selecionadas apenas os SPL's que apresentaram CCS e/ou CBT, acima dos limites da IN 62 de $6,0 \times 10^5$ céls/ml e $6,0 \times 10^5$ UFC/ml respectivamente. Sendo assim, foram selecionadas um total de 35 propriedades que não atingiram as exigências mínimas da legislação, conforme tabela a seguir (Anexo 1), para posteriores coletas de amostras.

Após a triagem das propriedades foi realizada uma terceira coleta de dados e uma secundária de amostras para realização desta pesquisa. Esta etapa consistiu da realização de um novo questionário guia semi-estruturado (Anexo 2) aplicado diretamente aos produtores no momento da coleta das amostras, no período referente aos meses de Setembro e Outubro de 2012.

Os questionários utilizados e formulados, também chamados de “questionários semi-estruturados”, foram formulados e baseados em pesquisas sobre colheita de dados de SPL's por docentes e discentes participantes do projeto PLESXUS, havendo suas devidas adaptações a realidade cultural e espacial produtiva da região. As questões, opções de respostas e sequência de indagações foram idênticas para todos entrevistados, assegurando variações apenas as diferenças individuais e não aos entrevistados (LANGE, 2013; SILVA et al., 2013; DAMASCENO et al. 2008).

O questionário baseava-se no conhecimento das características básicas de produção e principalmente do manejo higiênico-sanitário utilizado, com o objetivo de qualificar as propriedades frente as suas diversidades produtivas. As variáveis abordadas compreenderam características do produtor e propriedade, caracterização e composição do rebanho, produção, manejo de ordenha, práticas de higienização dos equipamentos e utensílios, e bonificações na qualidade da matéria-prima (NERO et al., 2009).

Dentro da colheita de amostras foi coletado leite dos tanques de resfriamento, acondicionados em frascos com cerca de 200 mL em caixa térmica refrigerada (até 5°C), estando estes identificados com as suas respectivas propriedades.

As análises microbiológicas ocorreram no laboratório de Microbiologia da Unioeste, no campus de Marechal Cândido Rondon. Após a coleta preparou-se diluições decimais seriadas contendo água peptonada estéril em tubos de ensaio, até 10^4 para as referidas amostras dos tanques. Após as devidas diluições e homogeneizações, alíquotas de 100 µl de cada diluição foram inoculadas em placas de petri contendo meio de cultura Tributirina e outro inoculação conjunta contendo o meio Caseinato, ambas incubadas a 35-37 °C durante 24-48 horas em estufa B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio), para posteriores leituras e contagem das unidade formadoras de colônias (UFC) (FRANK et al. 1992).

Após a realização da enumeração das colônias presentes nas placas, apenas às que apresentaram entre 25 à 250 UFC foram selecionadas e o resultado multiplicado pelo fator de diluição das placas correspondentes e por 10 (VIDAL MARTINS et al., 2005; MARTINS et al., 2013), sendo posteriormente os resultados encontrados expressos em UFC ou UFC/ml.

Em seguida a quantificação das amostras foi realizada, onde apenas as UFC do meio de cultura Caseinato foram selecionados para posteriores análises de isolamento e identificação dos agentes pertinentes das contaminações. As UFC capturadas foram inoculadas no meio de cultura E.C. durante 24-48 horas a 35-37 °C em estufa B.O.D.

Seguidamente as unidades que obtiveram crescimento foram inoculadas em outro meio de cultura, o Ágar Eosina Azul de Metileno (E.M.B.) a 35-37 °C durante 24-48 horas em estufa B.O.D. Após a inoculação as colônias que alcançaram seu crescimento adequado foram novamente capturadas e inoculadas no Kit Bactray I e II, com o intuito de identificação das bactérias Gram negativas oxidase negativas. A inoculação perdurou de 18-24 horas a 35-37 °C, e após sucedeu-se a leitura e identificação das bactérias isoladas. Todos os procedimentos foram efetuados conforme a recomendação do fabricante e os horários respeitados rigorosamente para que não ocorresse oscilações e diferenças nos resultados posteriormente.

Os testes bioquímicos efetuados, no kit de identificação, foram: hidrólise da beta-galactosidase, do tiosulfato de sódio e uréia; redução da arginina, lisina e ornitina; metabolização do triptofano (Reativo de Kovac's), citrato de sódio, malonato e carboidratos; degradação da glicose (Alfa Naftol e KOH); e desaminação da fenilalanina (Cloreto férrico).

As análises estatísticas foram realizadas no software IBM SPSS Statistics 20.0; utilizando-se da análise de variância, teste de comparação múltipla (médias) e estatística descritiva, de ambas as variáveis quantitativas e qualitativas (ANDRADE et al., 2009; MACHADO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2007).

3.3 Resultados e Discussão

A partir das amostragens foi possível identificar 4 grupos (tratamentos) distintos a partir das contaminações encontradas, grupo 1 (> 600 mil céls/mL), grupo 2 (>600 mil UFC/mL), grupo 3 (>600 mil céls/mL e UFC/mL) e grupo 4 (< 600 mil céls/mL e UFC/mL). Os valores encontrados estão evidenciados na Tabela 2.

Tabela 1. Médias e desvio padrão das amostras de CCS e CBT dos SPL's

	Tratamentos			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
CCS (céls/mL)	937 ^b ± 285,5	312 ^b ± 176,7	2.078 ^a ± 1838,6	449 ^b ± 141,1
CBT (UFC/mL)	228 ^b ± 151,5	3.049 ^{ab} ± 3080,9	3.992 ^a ± 3791,3	202 ^b ± 95,2
Nº de SPL's	10	10	7	8

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Pode-se evidenciar que o Grupo 3 é o que apresenta os piores índices de contaminação, com 346% e 665% acima dos limites praticados atualmente no país, em CCS e CBT respectivamente. Estes resultados podem evidenciar produtores com manejo higiênico e manejo de ordenha pouco eficientes. Busso et al. (2012) ressalta os cuidados redobrados que os produtores devem ter com a higiene do ambiente e no manejo na hora da ordenha, em épocas de elevação de umidade, devido a maior incidência de chuvas, visando manter a qualidade do leite.

Períodos similares de chuva ocorreram durante a pesquisa, época na qual iniciavam-se elevação do índice pluviométrico na região e altas temperaturas, o que pode ter facilitado ainda mais as contaminações elevadas, além dos manejos deficitários e higiene inadequada nestes SPL's.

O grupo 1 e 2 apenas um dos fatores acima dos limites permitidos, em CCS e CBT (937 mil céls/mL e 3.049 mil UFC/mL) respectivamente. A CCS, que é um parâmetro de avaliação

de mastites subclínicas e clínicas presentes no rebanho, aponta a contagem de células presentes no leite, células de descamação do epitélio da glândula secretora e células do sangue (FONSECA E SANTOS, 2000). O valor de CBT é indicativo de deficiência na limpeza e higienização dos equipamentos de ordenha, do sistema de refrigeração, das tetas e também da presença de mastite das vacas (TAFFAREL et al., 2013). Contaminações ocorridas na CCS e CBT, em ambos os grupos, são oriundas a falhas no manejo higiênico-sanitário específicas e acarretam suas elevadas contaminações.

Ambos os parâmetros evidenciam que cada grupo possuía falhas nos manejos adotados em seus SPL's. Dentre eles, o grupo 1 e 3 têm a CCS elevada, pois estão relacionados com a saúde do animal, em especial da glândula mamária, onde condições ambientais e de higiene ruins são fatores agravantes, com consequências ruins para a qualidade do leite, tais como: características organolépticas, tempo de prateleira e rendimento dos derivados inferior (MACHADO, 2008).

A contaminação bacteriana é um fator que fornece indicativos de falhas ou erros nos cuidados de higiene empregados na obtenção e manuseio durante a produção (SIMIONI et al., 2013), contaminações nos equipamentos, metodologia e higiene na ordenha, e condições de armazenamento do leite.

Os melhores resultados obtidos foram do grupo 4, isso demonstra SPL's mais tecnificados, com manejos técnicos gerais e higiênico-sanitários adequados e eficientes. De acordo com Battaglini et al. (2012), a implantação das práticas de higiene de ordenha e a informação da importância da qualidade e procedimentos são suficientes para melhoria significativa na qualidade microbiológica e qualidade do leite.

A eficiência e metodologia adotada das técnicas de manejo são cruciais para a atividade leiteira. Os sistemas mais tecnificados obtêm resultados e índices mais satisfatórios, devido ao seu tipo de sistema de produção não permitirem tantos erros ou falhas, ao contrário dos sistemas com pouca ou nenhuma tecnificação. Mesmo assim estes últimos podem atingir resultados de excelência, desde que os cuidados e metodologias sejam mais rigorosos para que não tenham contaminações elevadas.

Os manejos higiênico-sanitários adotados são de suma importância para o sucesso da produção e qualidade da matéria-prima. A identificação das características adotadas dos SPL's foram adquiridas conforme os questionários guias semi-estruturados realizados no momento da

coleta das amostras e ressaltam os pontos que possam prejudicar ou melhorar esses resultados (Anexo 3).

Analisando criteriosamente os resultados das variáveis qualitativas recolhidas, podemos verificar que o grupo 4 é o que possui as melhores frequências de boas práticas e consequentemente os bons índices nos resultados quantitativos de CCS e CBT (Tabela 2). As principais variáveis de destaque deste grupo são: tipo de ordenha (62,5% mecanizada), pré e pós *dipping* (25% realiza pré e 12,5% pré e pós), secagem dos tetos (25%, papel toalha), local pós ordenha (62,5% sala de alimentação), tratamento de mastite seca e clínica (75% e 100%), detergente alcalino e ácido (62,5% e 37,5% a cada ordenha, respectivamente), limpeza de sala de ordenha (87,5% a cada ordenha), tempo de limpeza (50% > 30 minutos), lavagem das mãos (25% antes de cada animal com H₂O e sabão) e bonificação (87,5% quantidade e qualidade).

Tabela 2. Frequências dos manejos higiênicos-sanitários (variáveis qualitativas) utilizados nos SPL's do Grupo 4, conforme os parâmetros de CCS e CBT encontrados

Variáveis qualitativas	Frequência (%)
Tipo de ordenha (mecanizada)	62,5
Pré e Pós <i>dipping</i> (apenas pré)	25,0
(pré e pós)	12,5
Secagem dos tetos (papel toalha)	25,0
Local pós ordenha (sala de alimentação)	62,5
Imersão dos conjuntos (sempre)	25,0
Tratamento preventivo mastite seca (sim)	75,0
Tratamento mastite clínica (sim)	100,0
Detergente alcalino (a cada ordenha)	62,5
Detergente ácido (a cada ordenha)	37,5
Limpeza sala de ordenha (a cada ordenha)	87,5
Tempo de limpeza (> 30 min.)	50,0
Lavagem das mãos (antes de cada animal com água e sabão)	12,5
Bonificação (quantidade e qualidade)	87,5

A grande maioria é representada por variáveis de interferência direta e indireta em ambos os índices de avaliações. Os seus percentuais foram os maiores (melhores frequências) para estas variáveis evidenciando a importância de um manejo higiênico sanitário adequado. As variáveis limpeza de sala de ordenha, tempo de limpeza e lavagem das mãos interferem diretamente na contaminação microbiológica, pois são pontos que podem conter variados microrganismos e altas cargas de agentes (BRITO et al., 2003).

Santos e Fonseca (2001) já ressaltavam a importância da higiene de ordenha, o ambiente em que os animais ficam alojados, os procedimentos de limpeza do equipamento e saúde da glândula mamária, como sendo fatores predominantes na contaminação microbiana do leite cru. A limpeza e higienização dos equipamentos é uma das melhores formas de controlar as contaminações microbiológicas, reduzindo ao mínimo os níveis das cargas bacterianas.

A contaminação bacteriana do leite cru pode ocorrer a partir do próprio animal, do homem e do ambiente (ARCURI et al., 2006). Após contaminado, o tempo e a temperatura no momento da refrigeração, serão fatores cruciais para que estas cargas não tenham elevações e não prejudiquem qualitativamente a matéria-prima nos processamentos subsequentes.

Outras variáveis como tipo de ordenha, pré e pós *dipping*, secagem dos tetos, local onde os animais permanecem após ordenha e tratamento de mastite seca e clínica tem contribuição na CCS. Estes fatores tem uma relação direta na saúde da glândula mamária dos animais e afeta diretamente o tipo de microrganismo contaminante de uma provável mastite. Nero et al. (2009) observou em seu estudo que a grande maioria dos produtores estudados adotava medidas higiênicas na obtenção e conservação do leite.

A realização do pré e pós *dipping* e o método de secagem dos tetos são técnicas de grande importância pois veiculariam certos agentes ou contaminantes causadores de mastite subclínica e até mesmo clínica em algumas situações. Segundo Muller (2002), os tetos devem ser secos com papel toalha, pois esta etapa associada a lavagem pode reduzir em 50-80% os índices de novas infecções.

Mesquita e Bueno (2005) destacam que a secagem dos animais com antibiótico é o procedimento mais eficiente no controle da mastite subclínica. O tratamento da mastite clínica normalmente é iniciado tardiamente e erroneamente, tendo consequências graves para saúde mamária, com efeitos agravantes na qualidade do leite, tipo de agente causador, gastos financeiros extras e perdas de produção devido a essas enfermidades.

Outro ponto importante de salientar é a bonificação que os SPL's recebiam, em quantidade e qualidade, do leite produzido. Este fator mostra a importância principalmente do pagamento por qualidade como forma de motivação dos produtores para melhoria da qualidade do leite produzido (BOZO et al., 2013).

O grupo 3 foi que apresentou as frequências mais elevadas em ambas variáveis, para CCS e CBT (Tabela 3), principalmente para limpeza do animal (28,57%, úbere inteiro), primeiros jatos (57,15% não realizava), desmonte dos conjuntos (85,72% não realizava), limpeza do tanque (100% a cada saída do leite sem sanitizante) e tempo de limpeza (57,15%, 10 minutos).

Foram os SPL's que obtiveram as piores quantificações de CCS e CBT, isso se deve aos fatores acima citados serem realizados de maneira totalmente equivocada e consequentemente, prejudicando ainda mais a contaminação. A limpeza total do úbere é um veiculador de agente para dentro da glândula mamária, leva a alta carga microbiana existente no úbere para dentro do sistema de ordenha e eleva o número de contaminantes. De acordo com Fonseca e Santos (2000), a desinfecção antes e após a ordenha, estimulação da ejeção e extração rápida e eficiente, compõem estratégias competentes na prevenção dos agentes contagiosos e ambientais (menor escala), durante a ordenha.

Tabela 3. Frequências dos manejos higiênicos-sanitários (variáveis qualitativas) utilizados nos SPL's do Grupo 3, conforme os parâmetros de CCS e CBT encontrados.

Variáveis qualitativas	Frequência (%)
Limpeza do animal (úbere inteiro)	62,5
Primeiros jatos (não realizava)	57,1
Desmonte dos conjuntos (não realizava)	85,7
Limpeza do tanque (a cada saída sem sanitizante)	100,0
Tempo de limpeza (> 30 min.)	57,1

Os primeiros jatos tem eficiência na detecção, e a gravidade de cada caso associado ao prognóstico para a cura e ao período de tempo transcorrido entre o diagnóstico e o tratamento (LANGONI, 2013). A não realização faz com que qualquer animal, com altas quantificações

de CCS, inclua a sua contaminação no leite total, elevando e muito, o número de células existentes.

Outra variável importante de contaminação são os equipamentos, o desmonte dos conjuntos e limpeza do tanque são importantes técnicas de higienização e limpeza para retirada de sujidades e crostas que possam ficar aderidas aos equipamentos, e está não retirada pode acarretar elevações significativas e aumento da contagem bacteriana total.

O tempo gasto para limpeza e higienização dos utensílios e equipamentos é crucial para sucesso do manejo higiênico, associado a uma limpeza eficiente, pois na grande maioria das limpezas realizadas em tempos curtos, além de propiciar falhas também não possibilitam que o sanitizante ou detergente utilizados faça o seu real efeito, devido justamente ao pouco tempo. Com isso é possível termos muitos problemas futuros de sujidades e contaminações cada vez mais elevadas.

Ambos os grupos 1 e 2 tiveram frequência elevadas nas suas variáveis que determinaram os resultados obtidos acima dos limites, em CCS e CBT respectivamente (Tabela 4 e 5).

Tabela 4. Frequências dos manejos higiênicos-sanitários (variáveis qualitativas) utilizados nos SPL's do Grupo 1, conforme os parâmetros de CCS e CBT encontrados

Variáveis qualitativas	Frequência (%)
Pré e pós <i>dipping</i> (não realizava)	60,0
Secagem dos tetos (tecido)	70,0
Imersão dos conjuntos (não realizava)	70,0
Tratamento mastite clínica (não realizava)	30,0
Sanitizante (não realizava)	90,0
Leite com grumos mastíticos (juntamente com leite bom)	10,0

O grupo 1 obteve as frequências mais elevadas nas seguintes variáveis: pré e pós *dipping* (60% não realizava), secagem dos tetos (70% tecido), imersão dos conjuntos (70% não realizava), tratamento mastite clínica (30% não realizava), sanitizante (90% não realizava) e leite mastítico (10% vendia como leite bom). Analisando as variáveis acima podemos deduzir que em quase sua totalidade são de interferência direta principalmente no CCS,

consequentemente há ineficiência de cada uma delas, as quais colaboram para a elevação do percentual de células somáticas encontradas no leite.

No grupo 2 é possível visualizar variáveis diretamente ligadas com a contaminação microbiana. As principais foram: tipo de ordenha (90% balde ao pé), primeiros jatos (60% não realizava), pré e pós *dipping* (90% não realizava), secagem dos tetos (30% não realizava e 70% tecido), imersão conjuntos (90% não realizava), tratamento mastite seca (70% não realizava), água quente (70% não realizava), detergente alcalino e ácido (60% não realizava em ambos), limpeza tanque (30% não realizava), limpeza sala de ordenha (30% não realizava), lavagem das mãos (60% não realizava), coleta do leite (30% mais que 5 ordenha para coleta) e bonificação (20% não recebia).

Tabela 5. Frequências dos manejos higiênicos-sanitários (variáveis qualitativas) utilizados nos SPL's do Grupo 2, conforme os parâmetros de CCS e CBT encontrados

Variáveis qualitativas	Frequência (%)
Tipo de ordenha (balde ao pé)	90,0
Primeiros jatos (não realizava)	60,0
Pré e pós <i>dipping</i> (não realizava)	90,0
Secagem dos tetos (tecido)	30,0
Imersão dos conjuntos (não realizava)	90,0
Tratamento preventivo mastite seca (não realizava)	70,0
Água quente (não realizava)	70,0
Detergente alcalino (não realizava)	60,0
Detergente ácido (não realizava)	60,0
Limpeza do tanque (não realizava)	30,0
Limpeza da sala de ordenha (não realizava)	10,0
Lavagem das mãos (não realizava)	60,0
Coleta do leite (> 5 ordenhas)	30,0
Bonificação (não recebia)	20,0

Para a maioria das variáveis avaliadas no grupo 2, foi possível evidenciar a elevada frequência de não realização de atividades de higiene e limpeza de ordenha, o que, em sua

maioria, estava diretamente relacionado com a contaminação microbiana. Acentuadamente, estes fatores resultaram a contaminação encontrada neste grupo, mais de cinco vezes acima do limite vigente (3.049 mil UFC/ml).

O tempo de armazenagem é crucial na qualidade do leite. Algumas bactérias conseguem dobrar sua população a cada 20 a 30 minutos, mesmo sob refrigeração, desde o momento da ordenha até as indústrias beneficiadores e consumidores finais (GUERREIRO et al., 2005). Por isso o perfeito armazenamento, manuseio e tempo deve ser rigorosamente realizados para a obtenção de um produto de qualidade.

A água, além de ser um veículo muito importante de transmissão, também tem atuação importante na limpeza, desde que em temperatura ideal. Na limpeza dos equipamentos, a sua temperatura ideal é importantíssima na eficácia da limpeza, na utilização de detergentes alcalinos (70 °C) e ácidos (45 °C) (MURICY, 2003). A não utilização de água previamente aquecida fomentará o acúmulo de agentes microbianos em todo o equipamento e utensílios, com consequentes contaminações elevadas e até mesmo perda do equipamento pelo mau uso e agravamento do mau funcionamento do mesmo.

Nenhuma das atividades foi realizada em sua totalidade, com exceção de tratamento da mastite clínica (grupo 4), isto pode ser devido a dificuldades em efetuar-las ou pela falta de instrução técnica de como executá-las. Tavolaro et al. (2006), em trabalho na avaliação dos ordenhadores verificaram que mudanças na rotina acabam sendo afetadas por uma série de barreiras técnicas à implantação dos programas, além de evidenciarem as dificuldades de se trabalhar com educação para a mudança de comportamento de ordenhadores. Com isso, é possível indicar que são uma série de fatores e co-fatores que podem interferir direta e indiretamente na produção de uma matéria-prima de qualidade, que é o leite. Além de manejos adequados e cuidadosamente realizados é necessário um trabalho de reeducação técnica, para aperfeiçoamento e qualificação da mão-de-obra.

São inúmeras bactérias que podem colonizar e contaminar o leite, as mais estudadas e conhecidas são as proteolíticas e lipolíticas, pois são muito prejudiciais e causam deterioração com várias alterações na qualidade sensorial e intrínseca. Os microrganismos proteolíticos constituem um grupo heterogêneo que produzem enzimas extracelulares com atividade proteolítica que resultarão em alterações como sabor, redução da qualidade nutricional e diminuição do tempo de prateleira (SABEDOT et al., 2011).

Outras enzimas que influenciam e deterioram o leite são as lipases, estas produzidas por bactérias lipolíticas, que quebram as gorduras (triglicerídeos) existentes no leite (COLLA et al., 2012). Além da diminuição do nível de gordura, elas podem alterar características sensoriais de sabor, aroma e odor, como ácidos de cadeia curta (butírico, capróico, caprílico e cáprico) e rendimento de alguns derivados lácteos (SANTOS, 2010).

A tabela 6 mostra os resultados obtidos das contaminações das diferentes propriedades e suas amostras de leite coletadas, evidenciando as contaminações existentes de ambas as bactérias.

Tabela 6. Contagem médias de mesófilos proteolíticos e lipolíticos dos Sistemas de Produção de Leiteiro analisados.

	Bactérias Proteolíticas (UFC.mL⁻¹)	Bactérias Lipolíticas (UFC.mL⁻¹)	Nº de Amostras
Grupo 1	2,7x10 ³ a	1,0x10 ⁵ a	10
Grupo 2	1,8x10 ⁴ a	2,1x10 ⁵ a	10
Grupo 3	1,9x10 ⁴ a	2,0x10 ⁵ a	7
Grupo 4	1,4x10 ⁴ a	6,2x10 ⁴ a	8
Total	1,3x10 ⁴	1,4x10 ⁵	35

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p>0,05$), pelo teste Tukey.

Pode-se observar que ambos os grupos obtiveram $1,3 \times 10^4$ e $1,4 \times 10^5$ UFC/mL de mesófilos proteolíticos e lipolíticos quantificados em todas as amostras coletadas, não apresentando diferenças estatísticas entre os mesmos ($p>0,05$). Estes resultados corroboram com outras pesquisas realizadas nas contaminações de bactérias mesófilas do leite. Martins e Lima (2013) estudando leite de dois tipos de ordenhas encontraram valores máximos muito similares de mesófilos de $4,0 \times 10^5$ UFC/mL e $6,4 \times 10^4$ UFC/mL, em ordenhas manuais e mecanizadas respectivamente.

Resultados similares foram encontrados por Catanio et al. (2012) em Londrina-PR em tanques individuais e coletivos (6,0 log UFC/mL e 6,1 log UFC/mL), e por Citadin et al. (2009) na comparação de tanques, coletivo e individuais, onde 25,8% das amostras estavam em desacordo com a legislação ($9,6 \times 10^5$ UFC/mL).

Pinto et al. (2006) encontraram contaminações para mesófilos proteolíticos de 4,65, 4,85 e 5,66 log UFC/mL para tanque individual, tanque coletivo e silo industrial respectivamente. Contaminações superiores às encontradas neste trabalho. As contagens evidenciam higiene

adequada dos utensílios e equipamentos, sem possíveis resíduos que constituem nutrientes para o crescimento das bactérias, além de melhores ambientes, animais com boa sanidade e higiene.

Das amostras irregulares, 87,5% delas possuíam ordenha do tipo balde ao pé contra 12,5% do tipo ordenha canalizada. Em cima destes dados é possível verificar que o sistema balde ao pé possui amostras mais elevadas, pois o leite passa por vários utensílios (taros, baldes e tanques) devido ao tipo da ordenha, e má higienização possibilita a contaminação elevada. Deve-se considerar que contaminações adicionais e o crescimento microbiano podem ocorrer durante o transporte e a estocagem na indústria.

Contaminações acima de 10^5 UFC/mL de mesófilos aeróbios são indicativos de sérios problemas higiênicos na obtenção, conservação e transporte do leite cru (CHAMBERS, 2002). São muitos os SPL's que apresentavam falhas em seus manejos higiênicos-sanitários, como estudados anteriormente, isto evidência que contaminações elevadas podem prejudicar ainda mais a qualidade do leite, mesmo que não sejam acima dos limites, pois existem diferentes tipos de bactérias e principalmente, enzimas ou toxinas extracelulares com capacidades proteolíticas e lipolíticas.

O grupo 2 foi o que apresentou mais propriedades com contagens acima dos limites vigentes, isto mostra que o grupo 2 realmente era o que possuía maiores problemas ou deficiências no manejo higiênico-sanitário, apresentando a maior quantidade de contagens bacterianas fora dos limites vigentes do país.

As frequências encontradas indicam que cada SPL's pode apresentar falhas no manejo higiênico-sanitário, independente de toda a prática realizada, pois cada propriedade pode possuir diferentes microrganismos, e estes, levarem a contaminações elevadas.

A importância do tipo de agente a ser identificado auxilia nos principais pontos que possam ocorrer contaminação e o programa de práticas com objetivos de melhorar os manejos higiênicos-sanitários, e consequentemente baixar as contaminações a níveis seguros, não afetando a qualidade microbiológica do leite e suas características qualitativas. Conforme os resultados a seguir, podemos verificar as principais bactérias mesófilas proteolíticas Gram negativas encontradas em todos os sistemas de produção leiteiros (Anexo 4).

De um total de 35 amostras coletadas, 27 apresentaram isolamento e identificação de algum tipo de agente (Tabela 7), com 77, 1% de bactérias isoladas. As frequências das espécies isoladas foram as seguintes: *Escherichia coli* (8,6%), *Escherichia fergusonii* (8,6%), *Klebsiella oxytoca* (8,6%), *Yersinia enterocolitica* (8,6%), *Hafnia alvei* (5,7%), *Serratia liquefaciens*

(5,7%), *Serratia odorifera* (5,7%), *Citrobacter freundii* (2,85%), *Klebsiella ornithinolytica* (2,85%), *Klebsiella pneumoniae* (2,85%), *Proteus mirabilis* (2,85%), *Providencia rustigiani* (2,85%), *Providencia Stuart II* (2,85%), *Salmonela* (2,85%), *Serratia rubidaea* (2,85%) e *Shiguelia flexneri* sorogrupo B (2,85%).

Das 27 bactérias identificadas os principais gêneros foram: *Citrobacter* (3,7% - uma), *Escherichia* (22,2% - seis), *Hafnia* (7,4% - duas), *Klebsiella* (18,5% - cinco), *Proteus* (3,7% - uma), *Providencia* (7,4% - duas), *Salmonela* (3,7% - uma), *Serratia* (18,5% - cinco), *Shiguelia* (3,7% - uma) e *Yersinia* (11,1% - três); corroborando com as bactérias isoladas por Arcuri et al. (2008), em pesquisa de contaminantes em leite cru refrigerado.

Dos isolados identificados 42,85% deles pertenciam a família *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Hafnia*, *Serratia*, *Yersinia*, *Salmonela*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Providencia*). As enterobactérias são indicadores de má higiene em processos de fabricação e podem causar doenças diarréicas. Alguns gêneros são contaminantes ambientais, patógenos para os seres humanos e podem conferir as mudanças no sabor dos alimentos (CATANIO et al., 2012).

A atividade enzimática desses microrganismos é espécie específica e depende da temperatura de armazenamento (ALATOSSAVE E ALATOSSAVA, 2006). As enzimas proteolíticas tem ação em especial sobre as caseínas, mais especificamente sobre as porções glicolisadas e hidrofílicas da κ -caseína (IZIDORO et al., 2013). As proteinases produzidas por essa microbiota são termoestáveis, mantêm-se íntegras e ativas após o tratamento térmico, e os prejuízos econômicos são consideráveis (ROWE et al., 2003).

Dos agentes isolados e identificados alguns tiveram frequências mais expressivas como a *Escherichia coli*, *Escherichia Fergusoni*, *Klebsiella oxytoca* e *Yersinia enterocolitica*, onde representaram 34,4% das espécies encontradas.

A *Escherichia coli* é um gênero/espécie patogênico, e foi isolado em 3 SPL's. A presença do mesmo é indicador de contaminação fecal. As recomendações de literatura ressaltam que os coliformes totais não podem exceder 100 UFC/mL (CHAMBERS, 2002). A *Yersinia enterocolitica* é um enteropatógeno invasivo de humanos, provoca uma série de sintomas clínicos intestinais e extra-intestinais, podendo evoluir em casos graves há uma septicemia (FALCÃO E FALCÃO, 2006).

Tabela 7. Bactérias Gram negativas identificadas e suas frequências encontradas utilizando o kit Bactray I e II, nos diferentes SPL's.

Gênero / Espécie	Frequência (%)
<i>Escherichia coli</i>	8,60
<i>Escherichia fergusonii</i>	8,60
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8,60
<i>Yersinia enterocolitica</i>	8,60
<i>Hafnia alvei</i>	5,70
<i>Serratia liquefaciens</i>	5,70
<i>Serratia odorífera</i>	5,70
<i>Citrobacter freundii</i>	2,85
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	2,85
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,85
<i>Proteus mirabilis</i>	2,85
<i>Providencia rustigiani</i>	2,85
<i>Providencia Stuart II</i>	2,85
<i>Salmonella</i>	2,85
<i>Serratia rubidaea</i>	2,85
<i>Shigella flexneri</i> sorogruppo B	2,85
Não identificado	22,90

A alta incidência de agentes patogênicos ressalta uma preocupação elevada para a identificação e rastreamento mais específicos dos mesmos, pois pode-se acarretar riscos à saúde pública. Medidas e estudos devem ser direcionados e amplamente executados com o intuito da eliminação destes gêneros/espécies.

Okura et al. (2005) identificando patógenos em leite cru nas microrregiões do Triângulo Mineiro, encontrou frequências para os gêneros ou espécies de *Escherichia spp* (21,6%), seguidas por *Klebsiella spp* (19,7%), *Pseudomona spp* (15,7%), *Shigella spp* (10,8%), *Enterobacter spp* (9,5%), *Serratia spp* (8,9%), *Escherichia spp* (4,9%), *Salmonella spp* (1,8%) *Proteus spp* (1,8%), *Arizona spp* (1,8%), *Providencia spp* (1,2%) e *Citrobacter spp* (1,2%).

Resultados de Tebaldi et al. (2008) corroboraram com os encontrados neste estudo (*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia liquefaciens*), as bactérias da família *Enterobacteriaceae* causam deterioração do leite e para erradicar ou inibir o crescimento deles é necessário adotar medidas preventivas. O trabalho de prevenção é extremamente importante para possibilitar a melhora dos sistemas de produções existentes e aumento significativo da tecnificação da atividade leiteira.

Um dos gêneros encontrados são agentes etiológicos de doenças em vacas leiteiras, comumente conhecida como disenteria de inverno, a *Providencia sp* (BRANDÃO et al., 2007). São amplamente encontradas em águas contaminadas e esgotos. Esta identificação pode levar a três possíveis contaminações para sua identificação, sendo elas: a utilização de água contaminada como veiculador, ou a possibilidade de que estas bactérias possam ter sido excretadas via glândula mamária (menos provável), ou a mais provável, que seria a contaminação pelas fezes dos animais infectados onde é a principal via de eliminação destes animais. Mais estudos devem ser realizados para sua rastreabilidade das possíveis contaminações no leite deste tipo de agente.

Todos os grupos apresentaram diferentes contaminantes em seus sistemas de produção, evidenciando a presença de contaminantes extremamente patogênicos, independentemente dos seus manejos higiênico-sanitários adotados. Isso se deve em especial aos vários meios de veiculação existentes dos contaminantes, dificultando e muito ações práticas com intuito de eliminar estes microrganismos.

3.4 Conclusão

Evidenciou-se que qualquer um dos sistema de produção leiteiro, independentemente do manejo higiênico-sanitário adotado, pode apresentar contaminantes no leite cru refrigerado de bactérias patogênicas. As quantificações apresentaram-se menores nos SPL's que adotaram as melhores práticas higiênico-sanitárias. As bactérias da família *Enterobacteriaceae* foram isoladas e identificadas na grande maioria, produzindo proteases, como evidenciado neste estudo, deteriorando a qualidade do leite, além de serem agentes patógenos causadores graves problemas à saúde pública.

3.5 Referências

- ANDRADE, U. V. C.; HARTMANN, W.; MASSON, M. L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, São Paulo, v.25, n.3, 129-135, 2009.
- ALATOSSAVA, P.M.; ALATOSSAVA, T. Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria. In: ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e

- caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.8, p.2250-2255, nov, 2008.
- ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; LANGE, C. C.; MAGALHÃES, M. M. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicrotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.8, p.2250-2255, nov, 2008.
- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M. ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, .58, n.3, p.440-446, 2006
- BATTAGLINI, A. P. P.; FAGNANI, R.; DUNGA, K. S.; BELOTI, V. Difusão de boas práticas e caracterização de propriedades leiteiras. **Archivos de Zootecnia**. 62 (237): 151-154. 2013.
- BRANDÃO, P. E.; VILLAREAL, L. Y. B.; GREGORI, F.; SOUZA, S. L. P.; LOPES, M. A. E.; GOMES, C. R.; SFORSIN, A. J.; SANCHES, A. A.; ROSALES, C. A. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; FERREIRA, A. J. P.; JEREZ, A. A. On the of outbreak of winter dysentery in dairy cows in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 27(10):398-402, outubro, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, 29 dez. 2011. Seção 1, p.13-14, 2011.
- BRITO, M. A. V. P.; PORTUGAL, J. A. B.; DINIZ, F. H.; FONSECA, P. C.; ANGELO, F. F.; PORTO, M. A. C. Qualidade do leite armazenado em tanques de refrigeração comunitários. In: MARTINS, C. E.; FONSECA, P. C.; BERNARDO, W. F.; CÓSER, A. C.; FRANCO, P. R. V.; PORTUGAL, J. A. B.; CARVALHO, F. S. (Eds.). Alternativas tecnológicas, processuais e de políticas públicas para produção de leite em bases sustentáveis. Juiz de Fora:Embrapa Gado de Leite, 2003. p. 21-43.
- BOZO, G. A.; ALEGRO, L. C. A.; SILVA, L. C.; SANTANA, E. H. W.; OKANO, W.; SILVA, L. C. C. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.2, p.589-594, 2013.
- BUSO, R. R.; YAMASHITA, A. S.; LIMA-RIBEIRO, A. M. C. Análise anual de CCS e CBT em um rebanho de gado leiteiro do município de Campina Verde, MG. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.18, n.2 (supl.), p.105-109, jul-dez, 2012.
- CATANIO, F. S.; INAY, O. M.; SILVA, A. S.; PEREIRA, J. R.; TAMANINI, R.; BELOTI, V.; COSTA, M. R.; SOUZA, C. H. B.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. Qualidade do leite cru refrigerado de uma planta de processamento no norte do Paraná, após a implementação das mudanças impostas pela IN 62 de 2011. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, suplemento 2, p.3171-3180, 2012.

- CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA F. E. V. Qualidade microbiiológica do leite determinada por característica de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 29(2): 386-390, abr.-jun. 2009.
- CITADIN, A. S.; POZZA, M. S. S.; POZZA, P. C.; NUNES, R. V.; BORSATTI, L.; MANGONI, J. Qualidade microbiiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.1, p.52-59, jn/mar, 2009.
- COLLA, L. M.; REINHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC – UPF**, vol.4(2), p.p.1-14, 2012.
- CUNHA, J. E. & MORESCO, M. D. Características pedomorfológicas da topossequência de solos frentino de Marechal Cândido Rondon – PR: suas relações e implicações nos processos erosivos. **X Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada**, UERJ, Rio de Janeiro, p.230, 2003.
- DAMASCENO, J. C.; BOUNDERMULLER FILHO, A.; RAMOS, C. E. C. O.; SANTOS, J. C.; SANTOS, G. T. dos. O papel do homem na gestão e controle da qualidade na gestão e controle de qualidade da produção de leite. In: JUNIOR, J. F. L.; RAMOS, E. C. O.; SANTOS, G. T.; GRANDE, P. A.; DAMASCENO, J. C., MASSUDA, E. M. Análise das práticas de produtores em sistemas de produção leiteiros e seus resultados na produção e qualidade do leite. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 1199-1208, maio/jun. 2012.
- FALCÃO, J. P.; FALCÃO, D. P. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.27, n.1, p.9-19, 2006.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos, 2000. 175p.
- FRANK, J. F.; YOUSEF, A. E. Test for groups of microorganisms. In: PANTOJA, J. C. F.; ROEINEMANN, D. J.; RUEGG, P. L. Associations among milk quality indicators in raw bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v.92, m.10, 2009.
- GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZANER, A. S. M. Qualidade microbiiológicas de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.1, p.216-222, jan./fev., 2005.
- INSTITUTO AGRONÔMICO DO ESTADO DO PARANÁ. Cartas climáticas do Estado do Paraná 1994. Londrina, IAPAR, 1994, 49p.
- IZIDORO, T. B.; PEREIRA, J. G.; SOARES, V. M.; SPINA, T. L. B.; PINTO, A. N. Atividade proteolítica de bactérias psicrotróficas em leites estocados em diferentes temperaturas. **Revista Ceres**, Viçosa, v.60, n.4, p.452-457, jul/ago, 2013.

- LANGE, M. J. Caracterização dos sistemas de produção leiteiros e fatores de risco para mastites subclínicas do Município de Marechal Cândido Rondon – PR. Marechal Cândido Rondon – PR. Unioeste, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, 82p. 2013. (Dissertação de Mestrado).
- LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 33(5):620-626, maio 2013.
- MACHADO, P. F. Pagamento do leite por qualidade. In: BARBOSA, S. B. P., BATISTA, A. M. V., MONARDES, H. III Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008, v.1, p. 183-191.
- MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRÍES, G. A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29(6):1883-1886, 2000.
- MARTINS, E. S.; LIMA, C. M. F. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado obtido de propriedades rurais do município de Frutal – MG: comparação das ordenhas mecânica e manual. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v.7, n.01: p.955-964, 2013.
- MESQUITA, A.J.; BUENO, V.F.F. Estudos sobre a qualidade do leite no Estado de Goiás. In: CARVALHO, L.A.; ZOCCAL, R.; MARTINS, P.C. et al. **Tecnologia e gestão na atividade leiteira**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. p.99-103.
- MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. **Anais do II Sul – Leite: Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região Sul do Brasil**. Maringá: UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002.
- MURICY, R. F. Ocorrência de mastite subclínica em caprinos e qualidade higiênico-sanitária do leite produzido em propriedades associadas à cooperativa languiru, Teutônia-RS. Porto Alegre, UFRGS, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 84p. 2003. (Dissertação de Mestrado).
- NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por característica de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 29(2): 386-390, abr.-jun. 2009.
- OKURA, W. H.; RIGOBELLO, E. C.; ÁVILA, F. A. Isolamento e identificação de patógenos em leite cru produzido nas microrregiões do triângulo mineiro, MG. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, SP, Vol. 21, n.3, 324-331, 2005.
- OLIVEIRA, A. S.; CUNHA, D. N. F. V.; CAMPOS, J. M. S.; VALE, S. M. R.; ASSIS, A. J. Identificação e quantificação de indicadores-referência de sistemas de produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V.36, n.2, p.507-516, 2007.
- PARANÁ. Superintendência de Desenvolvimento de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental. Atlas de Recursos Hídricos do Estado do Paraná. In: SANDER, C.; SANTOS,

- M. L.; FERNANDEZ, O. V. Q. Variação da extensão do fluxo em canais fluviais de primeira ordem, porção superior da bacia do córrego Guavirá, Marechal Cândido Rondon, Oeste do Paraná. **Revista Perspectiva Geográfica**, Unioeste Colegiados de Geografia, n.2, p.7-19, 2006.
- PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 26(3): 645-651, jul.-set. 2006.
- RODRIGUES, V. C.; MARQUES, L. L. M. Avaliação microbiológica e físico-química de leite pasteurizado dos laticínios da região da COMCAM. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão (PR), v.3, n.1, p.63-67, jan./jun., 2012.
- ROWE, M. T.; DUNSTALL, G.; KILPATRICK, D.; WISDOM, G. B. Effect of growth phase on the subsequent growth kinetics of psychrotrophic bacteria of raw milk origin. In: IZIDORO, T. B.; PEREIRA, J. G.; SOARES, V. M.; SPINA, T. L. B.; PINTO, A. N. Atividade proteolítica de bactérias psicotróficas em leites estocados em diferentes temperaturas. **Revista Ceres**, Viçosa, v.60, n.4, p.452-457, jul/ago, 2013.
- SABEDOT, M. A.; POZZA, M. S. S.; POZZA, P. C.; ALMEIDA, R. Z.; NUNES, R. V.; ECKSTEIN, I. I. Correlação entre contagem de células somáticas, parâmetros microbiológicos e componentes do leite em amostras de leite *in natura*. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia, UNIPAR**, Umuarama, v.14, n.2, p.101-106, jul./dez. 2011.
- SANTOS, J. M. Leite cru refrigerado: características físico-químicas, microbiológicas e desenvolvimento de microrganismos psicotróficos. Diamantina, MG. UFMG. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Produção Animal, 55p. 2010. (Dissertação de Mestrado).
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Composição e propriedades físico-químicas do leite. IN: SHIRAI, M. A.; MASSON, M. L. Efeito acidificação do leite cru sobre micro-organismos psicotróficos. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimento**, Campo Mourão (PR), v.2, p.142-146, jul./dez., 2011.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n.82, p.13-19, 2001.
- SILVA, E. M. N.; SOUZA, B. B.; SILVA, G. A.; AZEVEDO, S. S.; MARQUE, B. A. A.; GOMES, T. L. S. Diagnóstico dos sistemas de produção de leite de cabra no município de Sumé cariri da Paraíba. **Revista Agropecuário Científico do Semiárido**. V.9, n.2, p.61-65, abr/jun, 2013.
- SIMIONI, F. J.; BARETTA, C. R. D. M.; STEFANI, L. M.; LOPES, L. S.; TIZZIANI, T. Qualidade do leite proveniente de propriedades com diferentes níveis de especialização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.34, n.4, p.1901-1912, jul./ago., 2013.

- TAFFAREL, L. E.; COSTA, P. B.; OLIVEIRA, N. T. E.; BRAGA, G. C.; ZONIN, W. J. Contagem bacteriana total do leite em diferentes sistemas de ordenha e de resfriamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.80, n.1, p.7-11, jan./mar., 2013.
- TAVOLARO, P. ET AL. Avaliação do conhecimento em práticas de higiene: uma abordagem qualitativa. *Interface - Comunic. Saúde Educ.*, v.10, n.19, p.243-54, jan/jun, 2006.
- TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(3):753-760, jul.-set., 2008.
- VIDAL MARTINS, A. M.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JUNIOR, O. D.; PENNA, A. L. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 25(4): 698-704, out.-dez. 2005.

4. PONTOS CRÍTICOS DE CONTAMINAÇÃO EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO LEITEIROS

Resumo: A produção leiteira atual possui diversidade em seus sistemas existentes, gerando e proporciona dificuldades em um padrão principalmente microbiológico. As práticas e manejos higiênico-sanitários adotadas são diversas e acarretam grande complexidade na evolução e melhora dos sistemas de produção. Com base nestes problemas, o objetivo do trabalho foi quantificar o agente *Staphylococcus sp.* em três pontos críticos na produção e de possíveis contaminações: ordenhadeira, mão-do-ordenhador, tanque de resfriamento e leite. Foram coletas 35 amostras de leite cru refrigerado conjuntamente com um guia semiestruturado referente ao manejo higiênico-sanitário existente, no período de setembro-outubro de 2012 no município de Marechal Cândido Rondon – PR. A partir destes dados foram formados 5 grupos, conforme técnica de análise de clusters (CHA). A análise de correspondências múltiplas (ACM), apresentou nas duas primeiras dimensões, CP1 (81,43%) e CP2 (36,87%), importância para a explicação das variáveis utilizadas, sendo estas de produção e manejos higiênicos; e contaminações e controle de mastite, na devida ordem (CP1 e CP2). Foram encontradas contaminações médias de $9,9 \times 10$, $2,2 \times 10^4$, 28 e $3,8 \times 10^3$ UFC/mL; para ordenhadeira, mãos do ordenhador, tanque de resfriamento e leite respectivamente. Os resultados encontrados revelam a presença do agente estafilococos nos sistemas de produção leiteiros, independentemente dos manejos higiênico-sanitários adotados. A orientação, planejamento e adequação dos manejos higiênico-sanitários podem melhorar significativamente a qualidade microbiológica do leite produzido, tanto qualitativamente quanto quantitativamente.

Palavras-chave: ACM, estafilococos, leite, ordenha, questionário, tanque.

Abstract: The current milk production has a diversity and heterogeneity in the existing systems and provides difficulties, mostly in a microbiological standard. The hygienic and sanitary practices and management strategies adopted are diverse and lead to great complexity in the evolution and improvement of the production systems. Based on these problems, the objective of the study was to quantify *Staphylococcus sp* agent in three critical points in the production and possible contamination: milking machine, hand of the milker, cooling tank and milk. It was collected 35 samples of refrigerated raw milk together with a semi structured guide related to the hygienic-sanitary management, in the period of September to October, 2012 in Marechal

Cândido Rondon town, state of Paraná. The samples were divided into 5 groups according to the cluster analysis (CHA). The multiple correspondence analysis (MCA) showed two proportions CP1 (81.43%) and PC2 (36.87%), with important illustrative variables for the hygienic production and managements; and contamination and mastitis control, in proper order (CP1 and CP2). It was found an average contamination of 9.6×10^3 , 2.2×10^3 , 1.4×10^4 and 3.8×10^3 CFU / mL in milking machine, hand of the milker, cooling tank and milk, respectively. The results reveal the presence of staphylococcal agent in dairy production systems, regardless of the hygienic-sanitary managements adopted. The orientation, planning and adequacy of hygienic-sanitary managements are able to improve, significantly, the microbiological quality of the milk produced, both qualitatively and quantitatively.

Keywords: ACM, staphylococci, milk, milking, questionnaire, tank.

4.1. Introdução

A qualidade do leite é um dos aspectos de grande relevância na cadeia produtiva deste produto, devido principalmente ao aumento crescente, no últimos anos de exigências dos setores industrial, de fiscalização e do mercado consumidor. A busca pela descoberta dos principais pontos críticos de contaminação e manejo higiênico-sanitário adequado ocorre a décadas, e sabe-se das dificuldades devido a heterogeneidade dos sistemas de produção e a dimensão espacial do país.

Dentre os principais parâmetros de avaliação de qualidade da matéria-prima e microbiológica existentes, a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT) são os de maior prevalência. A legislação pertinente, no caso, a instrução normativa 62 (IN 62), prevê critérios de qualidade mais rigorosas, e define prazos para que resultados sejam alcançados para todo o território nacional. Na região Sul do Brasil os limites tolerados de contaminação numericamente são: $6,0 \times 10^5$ células somáticas/ml e unidades formadoras de colônia/ml, respectivamente para ambos no leite cru refrigerado, além de características físico-químicas específicas (BRASIL, 2011).

Nero et al. (2009), ressaltam que o principal parâmetro utilizado para comprovar a qualidade desse produto é o seu perfil microbiológico, determinado principalmente pela forma de obtenção, armazenamento e transporte do leite. Sabe-se no presente que existem inúmeras variáveis e fatores de interferência negativa na matéria-prima, poucas delas com estudos aprofundados, que, neste caso, é a contaminação.

A magnitude dos microrganismos do leite revela que o conhecimento sobre o seu índice de contaminação microbiana pode ser usado no julgamento de sua qualidade intrínseca, bem como das condições sanitárias de sua produção e saúde do rebanho (GUERREIRO et al., 2005). De acordo com Santos e Fonseca (2000), após secretado do úbere, o leite pode contaminar-se por microrganismos a partir de três principais fontes; dentro da glândula mamária, superfície externa do úbere e tetos, superfície de equipamentos, utensílios de ordenha e tanques.

Os critérios de qualidade são cada vez mais utilizados para detecção de falha nas práticas de manejo, servindo como referência na valorização da matéria-prima (DÜRR, 2004). O conhecimento aprofundado dos pontos críticos de controle e de contaminação no manejo higiênico sanitário são de suma importância, pois são passíveis de alterações para o aperfeiçoamento e melhora do produto final. De acordo com Eckstein (2012), determinar a

intensidade da contaminação desses microrganismos em cada ponto de ordenha permite definir os principais pontos e origem da contaminação, ou seja, ambiental, de origem fecal, por manipulação inadequada ou oriunda do animal, além do efeito das temperaturas de refrigeração na sua multiplicação.

Sabe-se das degradações em proteínas, gorduras e açúcares ocasionadas pelas bactérias, em especial os grupos de mesófilas e psicrotróficas (BRITO E BRITO, 1998). Ambas apresentam características particulares de temperatura, locais de predileção, agentes e síntese de enzimas degradadoras; podendo ter alta patogenicidade e alterarem significativamente as características sensoriais e físico-químicas do leite. Portanto, o objetivo definido para este trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica do leite pela quantificação de estafilococos, de diferentes sistemas de produção leiteiros, em três pontos críticos de contaminação; mão do ordenhador, conjunto de ordenhadeira e tanque de resfriamento, na região Oeste do Paraná.

4.2. Material e Métodos

A presente pesquisa e coleta de dados foi realizada no município de Marechal Cândido Rondon, localizado na região Oeste do Estado do Paraná. A coleta de dados e amostras foi realizada durante o período de Setembro a Outubro de 2012. O município pertence ao Terceiro Planalto Paranaense (Planalto de Guarapuava), possui clima predominante do tipo subtropical úmido (Cfa), segundo Koppen, com verão quente, geadas menos frequentes e concentração de chuvas nos meses de verão (IAPAR, 1994). O solo é composto por latossolo vermelho fértil, nitossolo vermelho e neossolo litólico (CUNHA E MORESCO, 2003). A precipitação média é de 1700 mm, sendo outubro o mês mais chuvoso e julho o mais seco, com temperatura média anual de 21 °C (PARANÁ, 1998).

Inicialmente foi realizada uma coleta primária, onde ocorreram entrevistas com o auxílio de questionários guia semiestruturados aos produtores. Mensurou-se as informações básicas a respeito dos tipos de sistema de produção leiteiros existentes na microrregião, manejos produtivos inseridos e particularidades de produção envolvidos nas referidas propriedades. Foram avaliados 735 Sistemas Produtivos Leiteiros (SPL's).

Após a coleta primária de dados e com o auxílio de técnicas de estatística multivariada, entre as quais, a análise e correspondência múltipla (ACM) e análise de clusters hierárquicos (CHA), os SPL's foram divididos em cinco grupos homogêneos. Após a formação dos grupos

escolheu-se aleatoriamente 10 % dos produtores de cada grupo, totalizando 73 propriedades selecionadas.

Em seguida foi realizada uma coleta secundária de dados (questionário guia semiestruturado) e a primeira de amostras do leite das 73 propriedades, o questionário foi voltado ao sistema de produção, características higiênico-sanitárias e armazenamento; e análises do leite quanto a CBT e CCS. Este leite coletado do tanque de resfriamento foi acondicionado em frascos padronizados de aproximadamente 70 mL, transportados sob refrigeração (máximo 5°C) até a realização das análises. Um dos frascos continha o conservante Bronopol® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) para análise de contagem de células somáticas (CCS) e o outro frasco continha o conservante Azidiol®, o qual era destinado para contagem bacteriana total (CBT).

As análises foram realizadas na Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa – APCBRH, utilizando-se do equipamento Somacount 500® para CCS e Bactocount IBC® para a quantificação do CBT.

A partir desta segunda coleta de dados foram selecionadas apenas os SPL's que apresentaram CCS e/ou CBT, acima dos limites da IN 62 de $6,0 \times 10^5$ céls/ml e $6,0 \times 10^5$ UFC/ml respectivamente. Sendo assim, foram selecionadas 35 propriedades que não atingiram as exigências mínimas da legislação, conforme tabela a seguir (Anexo 1), para posteriores coletas de amostras.

Após a triagem das propriedades foi realizada uma terceira coleta de dados e uma secundária de amostras para realização desta pesquisa. Esta etapa consistiu da realização de um novo questionário guia semiestruturado (Anexo 2) aplicado diretamente aos produtores no momento da coleta das amostras, no período referente aos meses de Setembro e Outubro de 2012.

Os questionários utilizados foram elaborados por docentes e discentes, baseado em estudos já realizados, sendo estes apenas adequados de acordo com realidades culturais e espaciais da produção leiteira da região em análise. As questões, opções de respostas e sequência de indagações foram idênticas para todos entrevistados, assegurando variações apenas as diferenças individuais e não aos entrevistados (LANGE, 2013; SILVA et al., 2013; DAMASCENO et al. 2008).

O questionário baseava-se no conhecimento das características básicas de produção e principalmente do manejo higiênico-sanitário utilizado, com o objetivo de qualificar as

propriedades frente as suas diversidades produtivas. As variáveis abordadas compreenderam características do produtor e propriedade, caracterização e composição do rebanho, produção, manejo de ordenha, práticas de higienização dos equipamentos e utensílios, e bonificações na qualidade da matéria-prima (NERO et al., 2009).

Dentro da colheita de amostras foram coletados swab's dos pontos críticos de contaminação e que possuíam alta influência na qualidade microbiológica do leite. Os três pontos selecionados foram: conjunto de ordenha, mão do ordenhador e tanque de armazenagem, além também da coleta de leite para posteriores análises laboratoriais microbiológicas. Todos os swab's foram acondicionados em tubos de ensaio com 9 mL de água peptonada estéril em caixa térmica refrigerada (até 5 °C), conjuntamente com o leite em frascos padronizados de 200 mL de cada propriedade.

As análises microbiológicas ocorreram no laboratório de Microbiologia da Unioeste, no *campus* de Marechal Cândido Rondon. Após a coleta preparou-se diluições decimais seriadas contendo água peptonada estéril em tubos de ensaio, até 10^{-3} para os referidos pontos de contaminação, apenas para o leite foi realizado até a diluição 10^{-2} . Após as devidas diluições e homogeneizações, alíquotas de 100 µL de cada diluição foram inoculadas em placas de petri contendo meio de cultura Baird Parker, e incubadas a 37 °C durante 48 horas, para posteriores leituras e contagem das unidade formadoras de colônias (UFC).

Após a realização da enumeração das colônias presentes na placas, apenas as que apresentaram entre 25 a 250 UFC foram selecionadas e o resultado multiplicado pelo fator de diluição das placas correspondentes e por 10 (VIDAL MARTINS et al., 2005), sendo posteriormente os resultados encontrados expressos em UFC ou UFC/ml ou UFC/cm².

Para uma melhor compreensão e entendimento dos pontos críticos de contaminação, pode-se aplicar métodos de análise para apontar estes pontos da qualidade do leite baseado na natureza dos sistemas e que ainda mapeiem esses sistemas quanto à intensidade e efetividade das ações para obter-se um produto de qualidade (JUNIOR et al., 2012).

A análise de correspondência múltipla (ACM) é uma das técnicas de análise estatística multivariada para seleção de um conjunto de variáveis. De acordo com Kubrusly (2001) as variáveis que obtiveram os maiores escores de contribuição para a formação do Componente Principal (CP), descrita em termos de variância explicada e ajuste fiel do dados originais (α de Crombach > 0,75), sendo construídas 35 variáveis, cada uma com seu nível de ocorrência (Tabela 8).

Tabela 8. Relação de variáveis submetidas a Análise de Correspondência Múltipla, e suas respectivas descrições dos níveis.

Variáveis	Níveis de cada variável e descrição
Vacas_lact (Vacac Lactação)	<i>Variáveis métricas</i>
Vacas_sec (Vacac Secas)	<i>Variáveis métricas</i>
Litros_dia (Litros dia)	<i>Variáveis métricas</i>
Tipo_orde (Tipo de ordenha)	1 = Manual 2 = Balde ao pé 3 = Canalizada
Raça_leiteira (Raça leiteira)	1 = SRD 2 = Cruzado 3 = Pura
Limpeza_anim (Limpeza Animal)	1 = Não lava 2 = Lavagem do úbere 3 = Lavagem dos tetos
Primei_jatos (Primeiros jatos)	1 = Não 2 = Sim
Realiz_pre_pós (Pré e Pós dipping)	1 = Não realiza 2 = Apenas pré dipping 3 = Apenas pós dipping 4 = Pré e Pós dipping
Seca_tetos (Secagem tetos)	1 = Não Seca 2 = Seca com tecido 3 = Seca Papel toalha
Alimento_ord (Alimento durante ordenha)	1 = Alimenta 2 = Não Alimenta
Tempo_ord (Tempo de ordenha)	<i>Variáveis métricas</i>
Local_pós_ord (Local pós ordenha)	1 = Pastagem 2 = Piquete de Descanso 3 = Sala de Alimentação
Desinf_entre_ord (Desinfetante entre ordenhas)	1 = Não realiza 2 = Apenas em caso de mastite 3 = Sempre
Trat_mast_seca (Tratamento preventivo de mastite seca)	1 = Não trata 2 = trata
Mast_casoscli (Mastite casos clínicos)	1 = Não trata 2 = Trata
Leite_mast (Leite com grumos mastíticos)	1 = vende com leite sem grumos mastíticos 2 = outro derivados 3 = Fornece aos bezerros 4 = Descarta
Agua_quente (Água quente)	1 = Não 2 = Sim

Desmont_conj (Desmonte dos conjuntos de ordenhadeira)	<i>1 = Não 2 = Sim</i>
Deterg_alca (Detergente alcalino)	<i>1 = Não 2 = Sim, semanalmente 3 = Sim, duas vezes por semana 4 = Sim uma vez por dia 5 = Sim, a cada ordenha</i>
Deterg_acid (Detergente ácido)	<i>1 = Não 2 = Sim, semanalmente 3 = Sim, duas vezes por semana 4 = Sim uma vez por dia 5 = Sim, a cada ordenha</i>
Sanit (Sanitizante)	<i>1 = Não 2 = Sim</i>
Limpeza_tan (Limpeza do Tanque de resfriamento)	<i>1 = Não 2 = Sim, semanalmente sem sanitizante 3 = Sim, semanalmente com sanitizante 4 = Sim a cada saída do leite sem sanitizante 5 = Sim, a cada saída do leite com sanitizante</i>
Limpeza_sala_ord (Limpeza da sala ordenha)	<i>1 = Não; 2 = Sim apenas quando está suja; 3 = Sim uma vez por semana; 4 = Sim duas vezes por semana; 5 = Sim uma vez ao dia; 6 = Sim a cada ordenha.</i>
Tempo_limp_ord (Tempo gasto durante limpeza de ordenha)	<i>1 = 10 minutos 2 = 15 minutos 3 = 20 minutos 4 = 25 minutos 5 = 30 minutos 6 = mais que 30 minutos</i>
Manut_ord (Manutenção da ordenhadeira)	<i>Variáveis métricas</i>
Orden (Ordenhador)	<i>1 = Não 2 = Sim</i>
Higieniz_mãos (Higienização das mãos)	<i>1 = Não realiza 2 = Sim, antes com água 3 = Sim, antes da ordenha com água e sabão 4 = Sim, antes de cada animal com água 5 = Sim, antes de cada animal com água e sabão</i>
Col_leite (Coleta leite)	<i>1 = Mais que cinco ordenhas 2 = a cada 4 ordenhas 3 = a cada 3 ordenhas</i>

				4 = a cada 2 ordenhas 5 = a cada ordenha
Trein_ord ordenhador)	(Treinamento	do		1 = Não 2 = Sim
Idade_equip equipamento)	(Tempo	de	uso	Valor absoluto
Bonifca (Bonificação)				1 = Não 2 = Sim
BP_ord ordenhadeira)	(estafilococos	totais		Variáveis métricas
BP_mao ordenhador)	(estafilococos	totais	mão	Variáveis métricas
BP_tanque de resfriamento)	(estafilococos	totais	tanque	Variáveis métricas
BP_leite (estafilococos totais do leite)				Variáveis métricas

Legenda: Vacas_lact, vacas lactação; Vacas_sec, vacas secas; Litros_dia, produção diária de leite; Tipo_orde, tipo de ordenha; Raça_leiteira, raças leiteiras dos animais; Limpeza_anim, limpeza do animal antes da ordenha; Primei_jatos, primeiros jatos antes da ordenha; Reali_pré_pós, realização do pré e pós dipping; Seca_tetos, utensílio de secagem dos tetos; Alimento_ord, alimenta os animais durante ordenha; Tempo_ord, tempo de ordenha; Local_pós_ord, local dos animais pós ordenha; Desinf_entre_ord, desinfetante entre as ordenhas dos animais; Trt_mast_seca, tratamento preventivo para mastite seca; Mast_casoscli, tratamento para mastite; Leite_mast, destino do leite com grumos mastíticos; Agua_quente, utilização de água quente na limpeza dos equipamentos; Desmont_conj, desmonte dos conjuntos de ordenhadeira; Deterg_alca, detergente alcalino; Deterg_acid, detergente ácido; Sanit, sanitizante; Limpeza_tan, limpeza do tanque de resfriamento; Limpeza_sala_ord, limpeza da sala de ordenha, Manut_ord, manutenção da ordenhadeira; Orden, ordenhador; Higieniz_mãos, lavagem das mãos; Tempo_tan, temperatura do leite no tanque; Col_leite, coleta do leite; Trein_ord, treinamento do ordenhador; Idade_equip, idade do equipamento; Bonifica, bonificação por quantidade e/ou qualidade; BP_ord, contagem de estafilococos totais ordenhadeira; BP_mao, contagem de estafilococos totais mão do ordenhador; BP_tanque, contagem de estafilococos totais tanque de resfriamento; BP_leite, contagem de estafilococos totais leite.

As análises estatísticas foram realizadas no software IBM SPSS Statistics 20.0; utilizando-se da análise de correspondência múltipla (ACM), análise de clusters hierárquicos (CHA) e estatística descritiva, de ambas as variáveis quantitativas e qualitativas (ANDRADE et al., 2009; MACHADO et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2007).

4.3. Resultados e Discussão

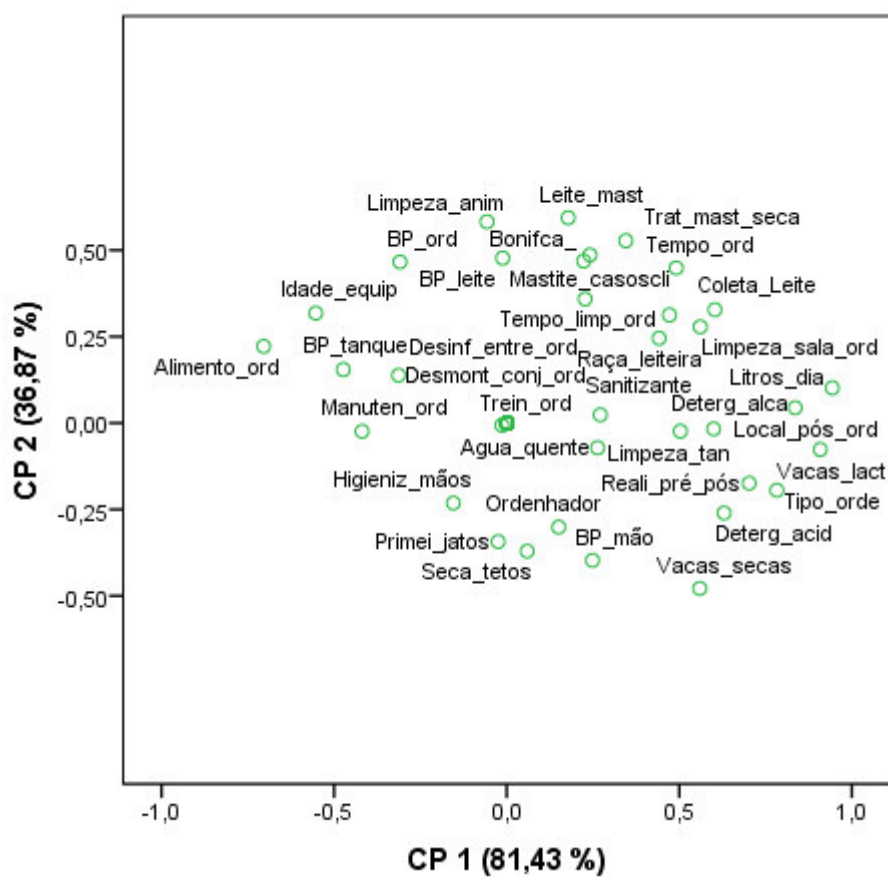
Na análise de componentes múltiplos (ACM) foram definidas dois componentes, componente principal 1 (CP1) e componente 2 (CP2), atingindo as respectivas variâncias 81,43% e 36,87%. As variáveis, suas relações dos SPL's e as duas dimensões formadas pelo conjunto de suas contribuições em termos de autovalores, explica a caracterização das

propriedades na região Oeste do Paraná em relação aos manejos higiênicos sanitários e suas contaminações e pontos cruciais para a qualidade do leite (Figura 1).

Para formação do CP1 as variáveis de maior importância e contribuição foram as seguintes: produção diária, número de vacas em lactação, local após ordenha, tipo de ordenha, realização de pré e pós *dipping*, utilização de detergente alcalino e utilização de detergente ácido na higienização dos equipamentos. Estas variáveis traduzem propriedades dependentes de volume significativo de produção e grande tecnificação, demonstrado por técnicas de manejo mais apuradas como a realização do pré e pós *dipping*, e também a utilização de ambos detergentes na limpeza dos utensílios e equipamentos de ordenha. Isso ressalta a importância de manejos adequados e corretos para o sucesso da produção leiteira e principalmente, para a possibilidade de matérias primas de qualidades superiores.

De acordo com Fosenca e Santos (2001), o pré *dipping* pode reduzir até 50 % novas infecções das glândulas mamárias, ocasionadas por patógenos ambientais, e o pós *dipping* é a prática mais importante no controle de novas infecções intramamárias. A limpeza dos equipamentos no processo produtivo do leite constitui da remoção dos resíduos da superfície, pois o atraso pode acarretar uma proliferação de microrganismos, com consequente dificuldade de remoção (CERQUEIRA et al., 2006).

Na composição do CP2 as principais variáveis determinantes foram: realização do tratamento preventivo para mastite seca, contaminação no leite, leite com grumos mastítico, contaminação na ordenha, limpeza do úbere/tetos antes da ordenha. Pode-se entender que as variáveis de maior relevância para a formação desta segunda dimensão são relacionadas diretamente aos cuidados nas contaminações e práticas higiênicas, e que consequentemente prejudicam a qualidade microbiológica da matéria prima. A limpeza dos animais realizada de maneira correta, antes da ordenha, pode evitar contaminações entre os animais, dos conjuntos de ordenha, cargas microbianas elevadas no leite e prevenir mastites clínicas e subclínicas. Cavalcanti et al. (2010) ressaltam que a adequada higiene no momento da ordenha, com limpeza, imersão em solução antisséptica e secagem completa dos tetos é essencial para a manutenção da qualidade bacteriana do leite.



Legenda: Vacas_lact: Vacas Lactação, Vacas_sec: Vacas Secas, Litros_dia: Litros dia, Tipo_orde: Tipo ordenha, Raça_leiteira: Raça leiteira, Limpeza_anim: Limpeza do animal, Primei_jatos: Primeiros jatos, Realiz_pré_pós: Realização de Pré e Pós-dipping, Seca_tetos: Secagem dos tetos, Alimento_ord: Alimentação no momento da ordenha, Tempo_ord: Tempo ordenha, Local_pós_ord: Local após ordenha, Desinf_entre_ord: Desinfetante entre ordenhas, Trat_mast_seca: Tratamento de mastite seca, Mast_casoscli: Tratamento de mastite casos clínicos, Leite_mast: Leite mastite, Agua_quente: Agua quente, Desmont_conj: Desmonte de conjunto, Deterg_alca: Detergente alcalino, Deterg_acid: Detergente ácido, Sanit: Sanitizante, Limpeza_tan: Limpeza Tanque, Limpeza_sala_ord: Limpeza sala ordenha, Tempo_limp_ord: Tempo limpeza de ordenha, Manut_ord: Manutenção da ordenhadeira, Orden: Ordenhador, Higieniz_mãos: Higienização das mãos, Temp_tan: Temperatura do tanque, Col_leite: Coleta do leite, Trein_ord: Treinamento do ordenhador, Idade equip: Idade equipamento, Bonifica: Bonificação, BP_ord: estafilococos totais ordenhadeira, BP_mao: estafilococos totais mão ordenhador, BP_tanque: estafilococos totais tanque de resfriamento, BP_leite: estafilococos totais do leite.

Figura 1. Representação das variáveis e suas contribuições para formação das dimensões da ACM.

Ao longo do deslocamento do eixo X (CP1), para o seu lado negativo, visualiza-se variáveis relacionadas com a manutenção e higiene dos equipamentos: tempo de uso do equipamento (tempo de utilização), manutenção do mesmo e desmonte dos conjuntos de ordenhadeira para higienização, além de contaminação da ordenhadeira e tanque de

armazenamento do leite. De acordo com Muller (2002) o funcionamento e manutenção do equipamento de ordenha tem alta influência em um programa de controle de mastite, para isso é necessário pessoal treinado e qualificado, principalmente dos ordenadores que terão participação direta nos resultados obtidos.

As variáveis relacionadas no manejo de ordenha, como secagem dos tetos, higiene da mão do ordenhador e primeiros jatos estão relacionadas com o eixo Y (CP2) no lado negativo. Estes fatores tem interferência direta na qualidade do leite, em especial na CBT, pois são locais que apresentam altas cargas microbianas. O leite produzido sem os devidos conceitos de higiene torna-se um produto de qualidade inferior, mesmo que posteriormente se dispensem dos maiores cuidados e tratamentos (PERIN et al., 2009). As propriedades estudadas que apresentaram-se deste lado do eixo têm poucos animais em lactação, pequena produção e manejo higiênico-sanitário deficitário, não realizando as práticas recomendadas.

Problemas durante as práticas de manejo de ordenha nas propriedades estão ligados em sua grande parte, pela não realização das técnicas (desconhecimento) ou de seus benefícios na qualidade do produto final. Segundo Valeeva (2005), nas propriedades de pequeno porte é possível visualizar, de forma geral, maior frequência de deficiências na produção. Nesta pesquisa os SPL's abaixo de 100 L/dia foram os que realizavam menos práticas (primeiros jatos, pré e pós *dipping*, imersão dos conjuntos em solução de sanitizantes, detergentes alcalinos e ácidos) nos seus manejos higiênico-sanitários, devido ao enquadramento em sistemas de pequeno porte.

Conforme a caracterização dos SPL's e suas tipologias geradas a partir da ACM, os mesmos foram classificados em cinco grupos pelas análises de Cluster (Figura 2). O grupo 1 (G1) formado por 12 SPL's, foi o que apresentou o maior número de propriedades dentre todos, seguido pelo grupo 2 (G2) ajustado com 11 SPL's; grupo 3 (G3) com 8 SPL's; grupo 4 (G4) possuía 3 SPL's e grupo 5 (G5) apenas 1 SPL's. O G1 é caracterizado pelas propriedades que apresentam os melhores manejos higiênico-sanitários, as menores contaminações e na grande maioria delas alta produtividade leiteira (310 litros/SPL's-dia e 14,8 litros/vaca-dia). No gráfico, tais propriedades situaram-se do centro para direita. Este grupo representa os melhores SPL's estudados nesta pesquisa, a maior eficiência em qualidade de matéria prima e cuidados na produção, além de 75% dos SPL's receberem bonificação por quantidade e qualidade, o que faz com que cada proprietário tenha incentivo e busque melhores índices nestes dois fatores devido ao melhor preço pago pelo leite.

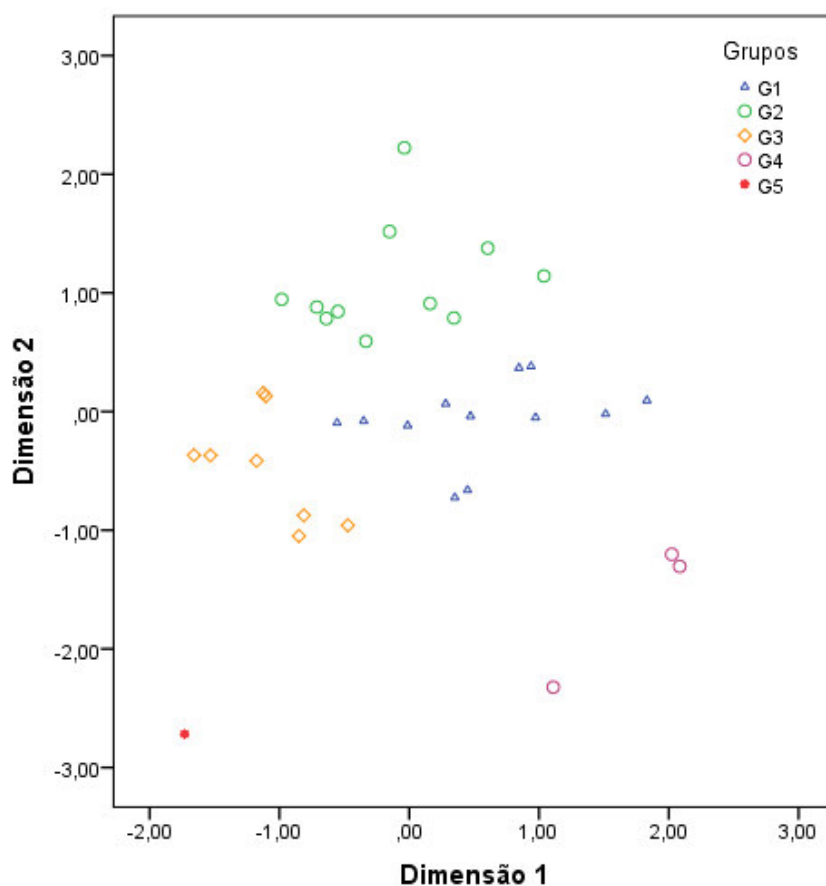


Figura 2. Representação das tipologias dos SPL's sobre o plano fatorial para a ACM.

Os G2 e G3 são muito similares entre si, a principal diferença era o volume de leite produzido. O G3 foi definido por SPL's que tinham no máximo 85 L/dia enquadrando-se em propriedades de pequeno porte. Já o G2 obtinham produções de 50 até 400 L/dia. Suas tipologias quanto as variáveis higiênico-sanitárias foram muito próximas e idênticas, apenas tendo como diferença básica a produção diária para separá-los.

No G4 são sistemas com altas produções (660 litros/SPL's-dia) e média de 45 animais lactantes. Apresentam manejos de maneira incorreta ou com realizações ineficientes e que prejudicam a qualidade na matéria-prima; É representado por SPL's altamente tecnificados mas que encontram-se com dificuldades no desenvolvimento do manejo higiênico-sanitário, devido a mão-de-obra desqualificada e interferência de fatores culturais.

Apenas um SPL's formou o G5. Os manejos higiênicos não eram realizados ou de maneira inferior e com baixíssima produção diária (18 litros/dia). Entre as práticas não executadas, tem-se: desmonte dos conjuntos, detergentes alcalino e ácido, sanitizante, realização de pré e pós *dipping* e o leite com grumos mastítico (colocado no resfriador conjuntamente com o leite de animais sadios). Os resultados evidenciados neste estudo corroboraram com Junior et al. (2012) e Bodenmüller Filho et al. (2010), ao avaliar as práticas adotadas pelos produtores e as características do leite, respectivamente, ao apresentarem grupos homogêneos com características produtivas, manejos adequados e sistemas de baixa tecnificação com problemas no manejo em propriedades com baixa produção.

Os grupos diferenciaram-se entre si principalmente pela sua produção e em relação aos manejos higiênico-sanitários adotados. É possível visualizar que a maior porcentagem dos SPL's que apresentaram boas características produtivas e higiênico-sanitárias foram também aqueles com maiores produções. Estes representaram, com apenas 42,85% do total de SPL's estudados.

Conforme a legislação pertinente nas contagens de CCS e CBT, avaliou-se a primeira e segunda coleta de amostras para auxiliar na discussão sobre a caracterização destes sistemas (Tabela 9). No G1 obteve-se uma melhora momentânea de 41,6% de SPL's que estavam de acordo com os padrões, porém a média do grupo praticamente não foi alterada e passou de 1.181 céls/mL para 1.123 céls/mL. A CBT aumentou 25%, no número de sistemas, possivelmente por manejos ou contaminações ocorridas no momento da segunda coleta, com reflexo no aumento da porcentagem de SPL's acima dos padrões. Estes SPL's pertencentes ao G1 apresentam as melhores práticas de manejo higiênico-sanitária, os resultados das contagens evidenciam possíveis animais com mastites subclínicas e descuidos durante a higienização dos equipamentos acarretando estas elevações.

O G2 apresentou redução de 27,3 e 18,1% na CCS e CBT, respectivamente. Isto evidencia a melhora nos manejos higiênico-sanitários adotados pelos SPL's, mas ainda ineficiente em determinados momentos, pois suas médias foram maiores do que ao recomendado. Apesar de apresentar sistemas com altas produções diárias, ainda apresenta falhas ou práticas higiênicas dos utensílios/equipamentos e glândulas mamárias com estado sanitário ruim, muito similar em alguns sistemas do G1.

No G3, o qual possui similaridade nos manejos ao G2, suas contaminações CCS e CBT apresentaram-se semelhantes em ambas as coletas. A alta contagem bacteriana deve-se ao

manejo higiênico deficitário, e compromete a contaminação do leite com inúmeros agentes deteriorantes do leite e causadores de infecções na saúde pública. Os animais pertencentes aos sistemas deste grupo apresentam excelentes estados sanitários, traduzidos pela contagem de células. A enumeração das células presentes no leite é uma boa forma de acompanhar o estado sanitário do úbere, além de indicar possíveis reduções na produção de leite e alterações na sua composição físico-química (ANDRADE et al., 2001).

Tabela 9. Médias de CCS e CBT, e porcentagem de propriedades acima dos limites, dados referentes as duas amostragens nas coletas de leite dos sistemas de produção leiteiros.

Grupos	Número de Propriedades	CCS 1° mil céls/mL	CCS 2° mil céls/mL	CBT 1° mil UFC/mL	CBT 2° mil UFC/mL
1	12	1181 (91,6 %)	1123 (50,0 %)	343 (16,6 %)	1535 (41,6 %)
2	11	1165 (81,8 %)	912 (54,5 %)	2500 (72,7 %)	1068 (54,5 %)
3	8	691 (50,0 %)	480 (25,0 %)	2414 (75,0 %)	2858 (62,5 %)
4	3	738 (100,0 %)	816 (33,3 %)	1088 (66,6 %)	2984 (33,3 %)
5	1	982 (100,0 %)	925 (100,0 %)	1314 (100,0 %)	356 (0,0 %)
Média	35	951 (80,0 %)	851 (45,7 %)	1532 (54,2 %)	1760 (48,5 %)

Cunha et al. (2008) ressaltam que a redução de produção causada pela mastite ocorre devido a alterações nas células epiteliais secretoras e na permeabilidade vascular no alvéolo durante a infecção, onde a extensão da perda é influenciada pela gravidade da infecção, tipo de microrganismo causador, duração, idade do animal, época do ano, estado nutricional e potencial genético.

O G4 apresentou reduções no número de SPL's abaixo dos limites (CCS – 66,6% e CBT – 33,3%), mas elevação na contagem bacteriana total durante a segunda coleta. Números evidentes de grandes dificuldades nas práticas higiênica-sanitárias em apenas um SPL's, com grandes prejuízos na qualidade do leite produzido. No SPL's do G5 ocorreu diminuição do CBT, entre as coletas, apesar desde resultado isto não revela melhora no manejo higiênico-sanitário pois esta propriedade tem grandes dificuldades em realizar as práticas higiênicas.

Bodenmüller Filho et al. (2010) ao avaliarem a tipologia dos sistemas nas características do leite, encontraram contagens para CCS e CBT, entre 250-1.321 céls/mL e 762-7.600 UFC/mL respectivamente, em 17 grupos distintos, resultados que corroboram com os encontrados nesta pesquisa. As diminuições expressivas nas quantidades de porcentagens entre a primeira e a segunda coleta, evidenciam melhoras nos manejos higiênicos adotados e a eficiência dos mesmos tanto na CCS quanto no CBT, com reduções de 34,3% e 6,7% respectivamente. As contagens das médias totais ilustram outro problema nos SPL's que estão acima dos limites e possuem contaminações ainda maiores entre as coletas, sinal da piora no manejo ou das técnicas relacionadas a limpeza, com possível deficiência ou falha.

Os pontos de contaminações selecionados (ordenha, mão do ordenhador e tanque de resfriamento) são cruciais e apresentam grande importância nas contaminações do leite, principalmente em CBT e CCS. As contaminações encontradas dos respectivos grupos nos pontos de contaminação e leite estão destacados na tabela 10.

Tabela 10. Médias de contaminações por estafilococos (UFC/cm²; UFC/mão ou UFC/ml) no pontos de coleta das amostras; conjunto de ordenhadeira (teteira), mão-do-ordenhador, tanque de armazenamento e leite, nas referidas propriedades dos seus respectivos grupos (cluster).

Grupos	Propriedades	Teteiras ¹	Mão ²	Tanque ³	Leite
1	12	9,34	8,7x10 ³	24	3,8x10 ³
2	11	2,12x10 ²	1,2x10 ⁴	40	6,8x10 ³
3	8	1,69x10 ²	1,5x10 ⁴	72	4,3x10 ³
4	3	6,79	7,4x10 ⁴	0,2	2,9x10 ³
5	1	0	1,2x10 ³	1,06	1,2x10 ³
Média	35	9,9x10 ¹	2,2x10 ⁴	28	3,8x10 ³

1 Área do conjunto de ordenhadeira – 117,75 cm² (OLIVEIRA et al., 2007).

2 Contaminação por mão-do-ordenhador (SILVA et al., 2011).

3 Área do tanque de armazenamento – 500 cm² (SILVA et al., 2011).

A menor contaminação no conjunto de ordenhadeira encontrada foi no G4, seguido do G1, G3 e G2; o G5 não obteve crescimento nas placas incubadas. Os SPL's do quarto grupo são de grande potencial produtivo, o que deduz a menor contaminação da ordenha por estafilococos, devido a grande utilização e os cuidados do equipamento, onde 100% utilizavam-se de detergentes alcalinos e ácidos, além de uma manutenção sazonal a cada 6 meses para o bom funcionamento do equipamento e utensílios ligados ao mesmo.

Nos outros SPL's dos grupos 1, 3 e 2; não realizavam detergentes ou sanitizantes, o que ocasionava este aumento nas contaminações de seus respectivos grupos. No G1 91,66% dos SPL's efetuavam detergentes, alcalino e ácido, na limpeza e higienização dos equipamentos de ordenha. Já no grupo 3 e 2, grande parte dos SPL's não se utilizavam de ambos os detergentes, onde não aplicavam este produto. Consequentemente, não possuíam uma limpeza adequada, o que acarretou na maior contaminação encontrada nos equipamentos de ordenhadeira, a frequência encontrada foi de 45 e 50% para o alcalino e 72 e 50% no ácido, para os grupos 2 e 3 respectivamente.

Os grupos 1, 2 e 3 apresentaram contaminações muito próximas $8,7 \times 10^3$, $1,2 \times 10^4$ e $1,5 \times 10^4$ UFC/mão respectivamente; apesar dos manejos higiênico sanitários diferentes principalmente entre o grupo 1 ao grupo 2 e 3. Essas contaminações foram similares numericamente nas mãos dos ordenhadores de ambos os grupos. De acordo com Miguel et al. (2012), o *S. aureus* tem sua transmissão principalmente pelas mãos dos ordenhadores e equipamentos de ordenha, pontos chave no controle deste contaminante e também no controle de mastites clínica e subclínica nos animais. Fontana et al. (2012) encontraram apenas 33% de propriedades com contaminação nas mãos de ordenhadores por *S. aureus*, resultado bem abaixo do encontrado nesta pesquisa onde em 97,25% dos SPL's foram contabilizadas contaminações pelo mesmo agente neste ponto de contaminação. A contaminação elevada de *Staphilococcus sp.* deve-se ao grande número de SPL's que não realizavam a prática de higienização das mãos adequadamente, com 40% (não realizava a limpeza das mãos antes d ordenha) e apenas 5,71% (lavava as mãos antes da ordenha de cada animal com água e sabão) do total.

No grupo 4, as mãos dos ordenhadores apresentaram a maior contaminação $7,4 \times 10^4$ UFC/mãos. Somente 33% dos SPL's higienizavam as mãos com água, antes de lidar com cada animal. Além de ser um veiculador muito importante para as mastites o procedimento era realizado incorretamente ou não realizado (66%), consequentemente acarretava as altas contaminações encontradas. Silva et al. (2011) e Matsubara et al. (2011) encontraram contaminações de estafilococos coagulase positiva nas mão de ordenhadores antes e depois da ordenha, $8,7 \times 10^2$ e $5,6 \times 10^3$; $3,3 \times 10^1$ e 3,3 UFC/mão respectivamente. As contaminações apresentaram-se elevadas, principalmente nos grupos 2, 3 e 4, nas quais a técnica de higienização das mãos foram realizadas incorretamente.

As contaminações encontradas dos tanques de resfriamento foram distintas em dois grandes grupos: o primeiro contendo os grupos 1, 2 e 3 (24, 40 e 72 UFC/cm²), e o 4 e 5 (0,2

e 1,06 UFC/cm²), onde os resultados foram muito próximos dentro destes dois grandes. Os resultados destacam os manejos higiênico-sanitários adotados em cada SPL's; no grupo 5 o tanque era higienizado a cada saída do leite, com sanitizante e a coleta de leite era realizada após cinco ordenhas. Consequentemente estas práticas auxiliaram para que neste ponto de contaminação o resultado fosse satisfatório.

O grupo 4 obteve a menor contaminação no tanque de resfriamento, 0,2 UFC/cm² de estafilococos, impulsionado pelas práticas de coleta de leite e limpeza do tanque, as quais eram realizadas a cada saída do leite com sanitizante (33%) e sem sanitizante (66%), na coleta de leite a cada quatro (66%) e duas (33%) ordenhas. Estas grandes porcentagens nas práticas de higienização realizadas de maneira mais correta possível fizeram com que este grupo apresentasse esta baixa contaminação neste ponto de grande importância no crescimento e multiplicação dos possíveis agentes contaminantes do leite. Tebaldi et al (2006) encontraram em estudo de tanques de refrigeração por expansão comunitários contaminações de estafilococos coagulase positiva de $2,7 \times 10^4$ até $1,73 \times 10^7$ UFC/mL, além de ressaltar que embora procedimentos de higiene sejam utilizados para baixa da contaminação fecal, estes microrganismos podem representar problemas na sanidade do rebanho.

Um dos principais problemas das altas contagens de estafilococos são as contaminações por suas enterotoxinas produzidas. De acordo com a FDA (1992), a concentração de enterotoxina é capaz de causar sintomas de intoxicação ao exceder o número de 10^5 UFC/mL de *S. aureus* e resistência ao processo de pasteurização. Neste trabalho, em nenhum dos grupos os limites foram superados, exceto 2 SPL's nos tanques de resfriamento e em 1 SPL's na mão do ordenhador. Resultados satisfatórios frente aos manejos higiênico-sanitário adotados na grande maioria dos SPL's, ilustram a importância destas práticas no controle de contaminações e microrganismos.

Os grupos 1, 2 e 3 obtiveram contaminações muito similares independente dos manejos adotados. Dentre as suas particularidades a limpeza do tanque era realizada: em 50% sem sanitizante a cada saída do leite e 33% com sanitizante a cada saída no grupo 1; 45% sem sanitizante a cada saída do leite e 18% com sanitizante a cada saída do leite no grupo 2; e 37,5% sem sanitizante a cada saída do leite e 12,5% com sanitizante a cada saída no grupo 3. Estas frequências das práticas evidenciam que as contaminações menores, do grupo 1, apresentaram as melhores práticas e em maiores porcentagens na realização deste ponto específico e importante na contaminação do tanque, ao colaborar com fatores de grande importância como

o tempo e a limpeza deste utensílio. Vallin et al. (2009) ressaltam a importância da temperatura e tempo de armazenamento do leite, conjuntamente com a higienização inadequada, fatores esses que influenciam na qualidade do leite refrigerado.

Os tempos de coleta do leite foram muito parecidos em ambos os grupos, o grupo 3 apresentou os tempos mais elevados com 50% a cada 48 horas e 50% acima de 60 horas, já o grupo 1 e 2 apresentaram 33% e 36% coleta a cada 24 horas e 66% e 64% a cada 48 horas respectivamente. Quanto maior o tempo de armazenamento maior será a multiplicação dos contaminantes. Devido a este fator o grupo 3 obteve resultados maiores de contaminação no tanque de resfriamento, além das piores porcentagens nas práticas de lavagem do tanque de resfriamento.

Apesar das diferentes práticas nos grupos, os tanques de resfriamento apresentaram contaminações satisfatórias, com exceção há algumas práticas inadequadas realizadas em determinados grupos ou SPL's, mas na grande maioria realizadas com boa eficiência, principalmente na higienização do equipamento e o tempo de coleta. Outras variáveis (tratamento dos casos de mastite clínica, sanitizante e leite com mastite) influenciam e contribui diretamente na contaminação final do leite, o qual fica estocado no seu respectivo tanque. O tanque de resfriamento é o local do destino final da matéria-prima produzida; a sua higiene e limpeza devem ocorrer de maneira adequada e eficiente para que as contaminações e o crescimento microbiano que possam ocorrer sejam minimizados.

O leite apresentou contaminações semelhantes em todos os grupos, dentre eles os grupo 5 foi de menor, com $1,2 \times 10^3$ UFC/mL, e o grupo 2 ($6,8 \times 10^3$ UFC/mL) o de maior contaminação por estafilococos. A contaminação final do leite é dependente dos manejos higiênico-sanitários e suas práticas gerais adotadas, que influenciam direta e indiretamente nos agentes e a quantidade dos mesmos, diminuindo assim a qualidade final do produto e acarretando prejuízo a industrialização e seus derivados lácteos.

Arcuri et al. (2006) encontraram em 91,27% do total de amostras de leite cru refrigerado isolados de *S. aureus* nos rebanhos leiteiros me Minas Gerais, e ressaltam os problemas de possíveis contaminações na glândula mamária, deficiências no controle de mastite e possíveis falhas nos procedimentos higiênicos: durante a ordenha, mãos dos ordenhadores e equipamentos de ordenha.

Os resultados aqui encontrados corroboram com Lamaita et al. (2005), onde conseguiram encontrar em 100% de estafilococos nas propriedades com contaminações que

variaram entre $1,0 \times 10^5$ até $>1,1 \times 10^7$ UFC/mL, no leite cru refrigerado. Contaminações que sugeriram elevado número de animais com mastite, portadores assintomáticos, e ineficiente refrigeração do leite imediatamente após a ordenha.

Os resultados aqui estudados no leite apresentam contaminações relativamente brandas referentes aos *Staphylococcus sp.*, que se apresentam em grande número em leite cru de baixa qualidade ou manipulações durante todo o processo de produção até a industrialização final. As contagens encontradas ficaram entre $1,2 \times 10^3$ até $6,8 \times 10^3$ UFC/mL, contaminações as quais interferem diretamente na qualidade do leite mas que não acarretam graves problemas na saúde pública pela produção baixa de enterotoxinas.

4.4. Conclusão

Ambas as contaminações por estafilococos da ordenhadeira, mão do ordenhador, tanque de resfriamento e leite encontradas corroboram com os cinco grupos homogêneos encontrados dos SPL's estudados, e realçam a importância de medidas preventivas na qualidade do leite, que diminuem as contaminações microbianas, conjuntamente com os manejos higiênico-sanitários, práticas e características adotados pelos sistemas.

Todas as contaminações apresentaram resultados razoáveis a satisfatórios, dependentemente dos manejos empregados, a ação de práticas higiênica-sanitárias que sejam realizadas de maneira eficiente, refletem diretamente nas contaminações e na produção com qualidade. Os pontos críticos de controle são cruciais para que ocorra o monitoramento e prevenção de agentes específicos, como *Staphylococcus sp.*, e contaminações que possam acarretar graves perdas durante todo o processo produtivo.

4.5. Referências

- ANDRADE, U. V. C.; HARTMANN, W.; MASSON, M. L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, São Paulo, v.25, n.3, 129-135, 2009.
- ANDRADE, P. V. D.; SOUZA, M. R.; BORGES, I.; PENNA, C. F. A. M. Contagem de células somáticas em leite de cabra. **Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.3, jun. 2001.

- ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado. In: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, 29 dez. 2011. Seção 1, p.13-14, 2011.
- BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. **Qualidade Higiênica do Leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL-ADT, 1998. 17p.
- CAVALCANTI, E. R. C.; CAVALCANTI, M. R.; SOUZA, W J.; ARAÚJO, D. G. Avaliação microbiológica em ordenhadeira mecânica antes e após adoção de procedimento orientado de higienização. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.17, n.1, p.3-6, jan./abr. 2010.
- CERQUEIRA, M. M. O. P.; PICININ, L. C. A.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; LEITE, M. O.; PENNA, C. F. A. M. Qualidade da água e seu impacto na qualidade microbiológica do leite. In: MESQUITA, A. J.; DURR, J. W.; COELHO, K. O. Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil. Goiânia: Talento, 2006, v.1, p.273-290.
- CUNHA, R. P. L.; MOLINA, L. R.; CARVALHO, A. U.; FILHO, E. J.; FERREIRA, P. M.; GENTILINI, M. B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.19-24, 2008.
- CUNHA, J. E. & MORESCO, M. D. Características pedomorfológicas da topossequência de solos frentino de Marechal Cândido Rondon – PR: suas relações e implicações nos processos erosivos. **X Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada**, UERJ, Rio de Janeiro, p.230, 2003.
- DAMASCENO, J.C.; BOUNDERMÜLLER FILHO, A.; RAMOS, C.E.C.O. et al. O Papel do homem na gestão e controle de qualidade da produção de leite. In: SANTOS, G.T., UHLIG, L., BRANCO, A.F. et al. (Ed.) **Inovação tecnológica na cadeia produtiva do leite e a sustentabilidade da pecuária leiteira**. Maringá: Eduem, 2008. 120 p.
- DÜRR, J.W. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite: uma oportunidade única. In: DÜRR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. (Eds.) **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: Editora Universidade de Passo Fundo, 2004. p.38-55.
- ECKSTEIN, I. I. Tipificação dos fatores ligados ao manejo de ordenha e avaliação do seu impacto sobre a qualidade sanitária do leite. Marechal Cândido Rondon-PR. Unioeste, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, 91p. 2012. (Dissertação de Mestrado).

- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos, 2000. 175p.
- FONTANA, V. L. D. S.; GIANNINI, M. J. S. M.; FONTANA, C. A. P.; STELLA, A. E. Caracterização molecular de estafilococos isolados de vacas com mastite subclínica e ordenhadores. **Arquivos Institucionais de Biologia**, São Paulo, v.79, n.4, p.469-476, out./dez., 2012.
- GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZANER, A. S. M. Qualidade microbiológicas de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.1, p.216-222, jan./fev., 2005.
- INSTITUTO AGRONÔMICO DO ESTADO DO PARANÁ. **Cartas climáticas do Estado do Paraná 1994**. Londrina, IAPAR, 1994, 49p.
- JUNIOR, J. F. L.; RAMOS, C. C. O.; SANTOS, G. T.; GRANDE, P. A.; DAMASCENO, J. C.; MASSUDA, E. M. Análise das práticas de produtores em sistemas de produção leiteiros e seus resultados na produção e qualidade do leite. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.3, p. 1199-1208, maio/jun. 2012.
- KUBRUSLY, L.S. **Um procedimento para calcular índices a partir de uma base de dados multivariados**. Pesquisa Operacional, v.21, n.1, p.107-117, 2001.
- LANGE, M. J. Caracterização dos sistemas de produção leiteiros e fatores de risco para mastites subclínicas do Município de Marechal Cândido Rondon – PR. Marechal Cândido Rondon – PR. Unioeste, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, 82p. 2013. (Dissertação de Mestrado).
- LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. E detecção de enterotoxinas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivos brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.
- MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRÍES, G. A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29(6):1883-1886, 2000.
- MATSUBARA, M. T.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; SILVA, L. C. C.; MONTEIRO, A. A.; BATTAGLINI, A. P. P.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n.1, p.277-286, jan./mar. 2011.
- MIGUEL, P. R. R.; POZZA, M. S. S.; CARON, L. F.; ZAMBOM, M. A.; POZZA, P. C. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes

- antimicrobianos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.1, p. 403-416, jan./mar. 2012.
- MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. **Anais do II Sul – Leite: Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região Sul do Brasil**. Maringá: UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002.
- NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por característica de produção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 29(2): 386-390, abr.-jun. 2009.
- OLIVEIRA, A. S.; CUNHA, D. N. F. V.; CAMPOS, J. M. S.; VALE, S. M. R.; ASSIS, A. J. Identificação e quantificação de indicadores-referência de sistemas de produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V.36, n.2, p.507-516, 2007.
- OLIVEIRA, M. M. de; BRUGNERA, D. F.; PICOLLI, R. H. Avaliação da qualidade microbiológica do leite cru e eficiência de ordenha mecânica de pequenas propriedades leiteiras do município de Campo Belo – MG. Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.62, n. 357, p. 124-130, 2007.
- PERIN, O. R.; FERREIRA, G. M. V.; TALAMINI, E. Percepção de qualidade no processo produtivo do leite: um estudo de caso no Rio Grande do Sul. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v.11, n.3, 2009.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n.82, p.13-19, 2001.
- SILVA, E. M. N.; SOUZA, B. B.; SILVA, G. A.; AZEVEDO, S. S.; MARQUE, B. A. A.; GOMES, T. L. S. Diagnóstico dos sistemas de produção de leite de cabra no município de Sumé cariri da Paraíba. **Revista Agropecuário Científico do Semiárido**. V.9, n.2, p.61-65, abr/jun, 2013.
- SILVA, L. C. C.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; OVIDIO, L.; MATTOS, M. R.; ARRUDA, A. M. C. T.; PIRES, E. M. F. Rastreamento de fontes de contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 267-276, jan./mar. 2011.
- TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(3):753-760, jul.-set., 2006.
- VALEEVA, N. I. et al. Improving food safety at the dairy farm level: farmers' and experts' perceptions. **Review of Agricultural Economics**, v. 27, n. 4, p. 574-592, 2005.

- VALLIN, V. M.; BELOTI, V.; BATTGLINI, A. M. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H. L.; SILVA, L. C. C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.1, p.181-188, jan./mar.2009.
- VIDAL MARTINS, A. M.; SALOTTI, B. M.; ROSSI JUNIOR, O. D.; PENNA, A. L. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 25(4): 698-704, out.-dez. 2005.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O comprometimento com a atividade leiteira, alinhado as técnicas e manejos apropriados conciliam produtividade e qualidade, tanto físico-química quanto microbiológica, independentemente do SPL's.

A realização de orientações e acompanhamento técnico se faz necessário para implementação de boas práticas principalmente no manejo higiênico-sanitário para prevenção de contaminações e crescimento microbiano no leite. Estudos mais aprofundados das origens das contaminações e seus agentes devem ser realizados para que as orientações e os manejos sejam mais eficientes objetivando melhores resultados.

ANEXOS

ANEXO I – SISTEMAS DE PRODUÇÃO LEITEIROS E CONTAGENS DE CCS E CBT DURANTE A PRIMEIRA COLETA

Código do SPL's	CCS (mil céls/mL)	CBT (mil UFC/mL)
2	690	67
5	1576	650
10	5195	2095
13	3671	1642
15	722	707
16	347	5036
17	482	3984
18	859	52
19	764	21
22	787	3227
27	985	20
28	746	932
29	1174	18
31	819	294
33	1122	132
34	705	23
35	1355	1110
36	982	1314
37	383	734
39	806	113
40	828	121
41	870	28
43	789	132
45	310	9999
47	1117	14
52	1656	3102
53	636	398
54	1023	6922
58	677	14
62	430	4187
63	989	69
64	244	6897
65	988	6
68	173	1005
70	775	445

ANEXO II – QUESTIONÁRIO GUIA SEMIESTRUTURADO

PRODUTOR (NOTA): _____
CÓDIGO: _____

ENTREVISTADOR: _____
DATA: _____

1. Quanto tempo o senhor(a) trabalha na atividade leiteira? _____
2. Qual sua idade? _____
3. Quantas vacas em lactação? _____
4. Quantas vacas secas? _____
5. Quantos litros produzem por dia? _____
6. Qual o tipo de ordenha o Sr. utiliza?
 - a) Ordenha manual
 - b) Ordenha mecanizada (balde ao pé);
 - c) Ordenha mecanizada (canalizada);
7. Quais as raças leiteiras que o Sr. possui no rebanho?
 - a) Holandesa
 - b) Pardo suíço
 - c) Jersey
 - d) Girolando
 - e) Gir
 - f) Cruzado (2 raças)
 - g) SRD (+ de 2 raças)
8. Como é feita a Limpeza do animal antes do pré-dipping?
() Lavagem do úbere por completo
() Lavagem apenas do teto
() Não realizo a lavagem
9. O senhor examina os primeiros jatos de leite antes de iniciar a ordenha?
() Sim () Não
10. Realiza pré e pós-dipping?
 - a) Sim, *pré-dipping*. Qual produto?

 - b) Sim, *pós-dipping*. Qual produto?

 - c) Não realizo.

11. O senhor(a) seca os tetos antes de iniciar a ordenha?
☐ Sim, com papel toalha
☐ Sim, com pano. Individual ou Coletivo? _____
☐ Não
12. O senhor alimenta os animais durante a ordenha?
☐ Sim ☐ Não
13. Qual é o tempo médio de ordenha? _____
14. Logo após a ordenha as vacas vão para onde?
☐ Sala de alimentação ☐ Pique de descanso ☐ Pastagem
15. O senhor faz a imersão do conjunto de teteiras em solução desinfetante entre uma ordenha e outra?
☐ Sim. Sempre.
☐ Sim. Apenas em caso de mastite.
☐ Não
16. O senhor faz tratamento para prevenir mastite no momento da secagem?
☐ Sim. Qual?

☐ Não
17. O senhor faz tratamento nos casos clínicos de mastite?
☐ Sim ☐ Não
18. O Senhor faz o que com o leite das vacas que apresentam mastite?
☐ Vende com o leite bom
☐ Faz outros derivados
☐ Fornece as bezerras
☐ Descarta
19. O senhor lava com água quente a ordenhadeira?
☐ Sim ☐ Não
20. Ocorre o desmonte dos conjuntos de ordenha para limpeza?
☐ Sim
☐ Não
21. O senhor utiliza detergente alcalino?
☐ Sim. Com que frequência? ☐ A cada ordenha
☐ 1 vez por dia
☐ A cada 2 dias
☐ Semanalmente
☐ Não

22. O senhor utiliza detergente ácido?
() Sim. Com que frequência? () A cada ordenha
() 1 vez por dia
() A cada 2 dias
() Semanalmente
() Não
23. O senhor utiliza algum sanitizante durante ou após a ordenha?
() Sim () Não
24. É realizada a limpeza do tanque de armazenamento do leite?
() Sim, com sanitizante a cada saída do leite
() Sim, sem sanitizante a cada saída do leite
() Sim, com sanitizante uma vez por semana
() Sim, sem sanitizante uma vez por semana
() Não, realiza
25. É realizada a limpeza da sala de ordenha?
() Sim, a cada ordenha
() Sim, uma vez por dia
() Sim, duas vezes por semana
() Sim, uma vez por semana
() Sim, apenas quando está muito suja
() Não realiza
26. Utiliza uniforme durante a realização da ordenha?
() Sim
() Não
27. Qual o tempo utilizado para limpeza da ordenha?
() 10 minutos
() 15 minutos
() 20 minutos
() 25 minutos
() 30 minutos
() mais que 30 minutos
28. Com que frequência ocorre a manutenção da ordenhadeira? _____ meses
29. O ordenhador é sempre a mesma pessoa?
() Sim () Não
30. Quando é realizada a Higienização (lavagem) das mãos do ordenhador?
() Antes da ordenha de cada animal com sabão e água
() Antes da ordenha de cada animal com água
() Antes da ordenha de todos os animais com sabão e água

- ☐)Antes da ordenha de todos os animais com água
- ☐)Não realiza a higiene

31. Temperatura do tanque de Armazenamento? _____

32. A cada quanto tempo é realizado a coleta do leite?

- ☐)A cada ordenha
- ☐)A cada duas ordenhas
- ☐)A cada três ordenhas
- ☐)A cada quatro ordenhas
- ☐)Mais que cinco ordenhas

33. O ordenhador recebeu algum tipo de treinamento para ordenhar?

- ☐)Sim
- ☐)Não

34. Qual a idade do equipamento de ordenha? _____anos.

35. Senhor recebe algum tipo de bonificação no preço do leite?

- a) Quantidade;
- b) Qualidade. Quais componentes?
 - ☐)CCS
 - ☐)CBT
 - ☐)Gordura
 - ☐)Proteína

36. Para quem o senhor entrega o leite? _____

37. O Sr. Recebe alguma assistência técnica?

- a) Sim. De quem? _____
- b) Não

ANEXO III – VARIÁVEIS QUALITATIVAS E SUAS FREQUÊNCIAS NOS RESPECTIVOS GRUPOS

Variáveis		Grupos			
		1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)
Tipo ordenha	Manual	0	0	0	0
	Balde	70	90	71	27,5
	Mecanizada	30	10	28	62,5
Limpeza animal	Não realiza	0	10	0	12,5
	Úbere inteiro	10	10	28	0
	Tetos	90	80	71	87,5
Primeiros jatos	Não	20	60	57	37,5
	Sim	80	40	42	62,5
Pré e Pós <i>dipping</i>	Não	60	90	57	37,5
	Apenas Pós	20	0	42	25,0
	Apenas Pré	0	0	0	25,0
	Pré e Pós <i>dipping</i>	20	10	0	12,5
Seca tetos	Não realiza	10	30	28	37,5
	Tecido	70	70	57	37,5
	Papel toalha	20	0	14	25,0
Local pós ordenha	Piquete descanso	10	10	0	25,0
	Pastagem	40	80	42	12,5
	Sala de alimentação	50	10	57	62,5
Imersão conjuntos	Não	70	90	85	75
	Apenas com mastite	0	0	0	0
	Sempre	30	10	14	25
Tratamento mastite seca	Não	50	70	28	25,0
	Sim	50	30	71	75,0
Tratamento mastite clinica	Não	30	20	28	0
	Sim	70	80	71	100
Leite mastite	Leite bom	10	0	0	0
	Derivados	0	0	0	0
	Bezerras	50	40	71	50
	Descarta	40	60	28	50
Água quente	Não	0	70	14	0
	Sim	100	30	85	100
Desmonte dos Conjuntos	Não	50	40	85	75,00
	Sim	50	60	14	25,00
Detergente alcalino	Não	10	60	28	12,5
	Semanal	0	10	0	0
	A cada 2 dias	0	0	14	12,5
	1 vez por dia	40	10	0	12,5
	A cada ordenha	50	20	57	62,5

Detergente ácido	Não	30	60	57	12,5
	Semanal	20	20	28	25,0
	A cada 2 dias	0	0	14	12,5
	1 vez ao dia	30	10	0	12,5
	A cada ordenha	20	10	0	37,5
Sanitizante	Não	90	90	85	87,5
	Sim	10	10	14	12,5
Limpeza tanque	Não	10	30	0	0
	1x sem. s/sanitiza.	10	10	0	0
	1x sem. c/sanitiza.	10	0	0	0
	A cada saída s/ sanit.	30	40	100	62,5
	A cada saída c/sanit.	40	20	0	37,5
Limpeza sala ordenha	Não	0	10	0	0
	Quando sujo	10	30	0	0
	1x por semana	0	0	14	12,50
	2x por semana	0	10	0	0
	1x por dia	50	20	0	0
	A cada ordenha	40	30	85	87,5
Tempo limpeza	10 min	20	20	57	0
	15 min	30	20	28	12,5
	20 min	10	40	0	37,5
	25 min	0	0	0	0
	> 30min	40	20	14	50
Lavagem mãos	Não	50	60	14	37,5
	Antes da ordenha c/H ₂ O	40	30	42	25,0
	Antes da ordenha c/H ₂ O e sabão	0	0	14	12,5
	Antes de cada animal c/H ₂ O	0	10	28	12,5
	Antes de cada animal c/H ₂ O e sabão	10	0	0	12,5
Coleta leite	> 5 ordenha	20	30	0	0
	A cada 4 ordenha	40	60	57	75,0
	A cada 3 ordenha	0	0	0	0
	A cada 2 ordenha	40	10	42	25,0
Bonificação	Não	0	20	14	0
	Quantidade	30	0	14	12,5
	Quantidade e Qualidade	70	80	71	87,5

ANEXO IV – GRUPOS, PROPRIEDADES E SEUS GÊNERO/ESPÉCIE ISOLADOS E IDENTIFICADOS

Grupo	Propriedade (código)	Gênero / Espécie
Grupo 1	19	<i>Serratia liquefaciens</i>
	27	Não identificado
	31	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	36	Não identificado
	47	<i>Escherichia fergusonii</i>
	52	<i>Citrobacter freundii</i>
	53	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
	58	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	65	<i>Hafnia alvei</i>
	68	<i>Serratia odorífera</i>
Grupo 2	15	<i>Proteus mirabilis</i>
	16	<i>Yersinia enterocolitica</i>
	28	Não identificado
	35	Não identificado
	37	<i>Serratia odorífera</i>
	54	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	62	<i>Hafnia alvei</i>
	63	<i>Providencia rustigiani</i>
	64	<i>Escherichia coli</i>
	70	<i>Escherichia fergusonii</i>
Grupo 3	5	<i>Escherichia coli</i>
	10	<i>Shigella flexneri</i> sorogrupo B
	13	<i>Providencia Stuart II</i>
	17	<i>Yersinia enterocolitica</i>
	22	<i>Escherichia fergusonii</i>
	43	<i>Serratia rubidaea</i>
	45	<i>Yersinia enterocolitica</i>
Grupo 4	2	<i>Escherichia coli</i>
	18	<i>Serratia liquefaciens</i>
	29	Não identificado
	33	<i>Salmonella</i>
	34	Não identificado
	39	Não identificado
	40	Não identificado
	41	<i>Klebsiella oxytoca</i>