

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE
PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

MICROBIOMA, PRÁTICAS DE MANEJO E FATORES DE RISCO
ASSOCIADOS À QUALIDADE DE LEITE CRU REFRIGERADO E DA ÁGUA

Ana Cláudia Dumont Oliveira

Orientadora: Prof^a. Dra. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira

Co-orientador: Dr. Fernando Nogueira de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Belo Horizonte - Minas Gerais

2018

O48m Oliveira, Ana Cláudia Dumont, 1989-
Microbioma, práticas de manejo e fatores de risco associados à qualidade de leite cru refrigerado e da água / Ana Cláudia Dumont Oliveira. – 2018.
73 p. : il.

Orientadora: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Co-orientador: Fernando Nogueira de Souza
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.
Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Leite – Qualidade – Teses. 3. Água – Análise – Teses.
4. Água – Qualidade – Teses. 5. Microbioma – Teses. 6. Microbiota – Teses. I. Cerqueira, Mônica Maria Oliveira Pinho. II. Souza, Fernando Nogueira de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal. IV. Título.


CDD – 637.1

FOLHA DE APROVAÇÃO

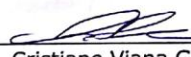
ANA CLAUDIA DUMONT OLIVEIRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

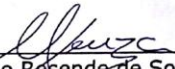
Aprovada em 28 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



Prof.ª. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Presidente - Orientador



Dr.ª. Cristiane Viana Guimarães Ladeira
Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG



Prof. Marcelo Resende de Souza
Escola de Veterinária - UFMG



AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda a minha família e amigos que durante esses dois anos souberam me apoiar, incentivar e ser paciente.

À minha orientadora Prof^a. Mônica Cerqueira que me acolheu na “Turma da Mônica” e desde o início contribuiu para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu co-orientador Dr. Fernando Nogueira que foi um exemplo de profissional a ser seguido.

Ao Prof. Lívio Molina por ter me apresentado o universo da qualidade do leite, pela primeira vez, ainda na graduação.

A todos os professores que contribuíram para o meu crescimento. Muito Obrigada.

Ao professor Márcio Costa, da Universidade de Montreal, pelo auxílio e grande paciência para me guiar durante as análises de bioinformática.

A todas as amizades feitas durante esse tempo; Ranier, Felipe, Gustavo, Cláudia, Érica, Victor, Cris, Renison, Aline, Leandro. Um agradecimento especial a Sara e Renata, pessoas muito importantes que entraram em minha vida.

Agradeço a toda à equipe da Cooperativa de Sete Lagoas pela disponibilidade e auxílio em viabilizar as fazendas para a execução desse projeto, em especial ao Marcelo Candioto, presidente da CCPR/ITAMBE.

A todos os produtores e colaboradores que abriram as portas de suas propriedades para que pudéssemos realizar esse trabalho.

Agradeço a todos os técnicos do DTIPOA; Miltinho, Maura, Cosme, Marco Antônio e César.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa e a FAPESP (processo nº 2015/10332-6) pelo auxílio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação dos tipos de análises disponíveis para estudar a microbiota presente no leite.....	22
Figura 2. Mapeamento do gene rRna 16S e de suas regiões hipervariáveis.....	24
Figura 3. Distribuição da população de cavalos em duas comunidades diferentes.....	25
Figura 4. Mapa da localização da microrregião de Sete Lagoas no estado de Minas Gerais.....	26
Figura 5. Variação da CBT do leite de tanque de propriedades agrupadas segundo a produção de leite ao longo de dois anos.....	33
Figura 6. Variação da CCS do leite de tanque de propriedades agrupadas de acordo com a produção de leite ao longo de dois anos.....	33
Figura 7. Dispersão da presença/ausência dos microrganismos isolados de leite de tanques refrigeradores em relação à CCS, CBT e ao tempo de coleta.....	38
Figura 8. Curva de rarefação das amostras de leite de tanques refrigeradores e de água de propriedades leiteiras.....	42
Figura 9. Diversidade de filos encontrados nas amostras de leite de tanques refrigeradores (A) e dá água (B) de propriedades leiteiras.....	43
Figura 10. Caracterização dos gêneros mais abundantes (acima de 1%) nas amostras de leite e água de propriedades leiteiras.....	44
Figura 11. <i>Staphylococcus</i> spp. estatisticamente associados as amostras de fazendas leiteiras.....	44
Figura 12. Dispersão das amostras de leite e água de propriedades leiteiras de acordo com a similaridade da microbiota das amostras.....	45
Figura 13. Abundância do gênero <i>Pseudomonas</i> de acordo com a matriz e propriedade analisada.....	45
Figura 14. Formação de dois <i>clusters</i> entre as amostras de leite cru refrigerado das fazendas de acordo com a microbiota nos dois momentos da coleta.....	48
Figura 15. Proporção dos gêneros de maior abundância (1%) nos dois <i>clusters</i> identificados a partir da análise de amostras de leite cru de tanque refrigerador.....	49
Figura 16. Gêneros de microrganismos estatisticamente associados a cada <i>cluster</i> das amostras de leite cru de tanques refrigeradores	50
Figura 17. Abundância relativa, em cada <i>cluster</i> , de <i>Lactococcus</i> (A) e de <i>Streptococcus</i> (B) em amostras de leite de tanques refrigeradores de propriedades leiteiras.....	50
Figura 18. Abundância relativa do gênero <i>Acinetobacter</i> entre os diferentes <i>clusters</i> observados.....	51
Figura 19. Abundância relativa dos gêneros encontrados no leite de tanques refrigeradores das propriedades F1, F10 e F11, nos dois tempos de coleta e valores de CCS.....	52
Figura 20. Abundância relativa dos gêneros e famílias de importância em saúde pública relacionados à matriz e fazenda.....	53

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Média dos valores dos parâmetros de qualidade do leite cru refrigerado de 11 propriedades da microrregião de Sete Lagoas (MG).....	31
Tabela 2. Resultados (Média \pm s) de CCS e de CBT do leite de tanque refrigeradores das propriedades analisadas em dois momentos.....	32
Tabela 3. Características de produção e práticas de manejo de 11 fazendas leiteiras associadas aos valores de CCS e de CBT.....	35
Tabela 4. Valores de CCS (cél./mL x 1000), CBT (UFC/mL x 1000), identificação e contagem dos microrganismos de leite de tanques refrigeradores em cada propriedade, em dois momentos de coleta.....	39
Tabela 5. Qualidade físico-química e microbiológica de amostras de água coletadas em propriedades leiteiras, em dois momentos.....	41
Tabela 6. Resultado estatístico dos testes AMOVA e Parsinomia para avaliação da diferença de microbiota das matrizes leite e água de propriedades leiteiras em diferentes tempos de coleta.....	46
Tabela 7. Valores do teste estatístico t de Student aplicado aos índices de Chao, Simpson, Shannon e diferença de gêneros para avaliar a alfa diversidade entre as matrizes e o tempo de coleta das amostras de água e de leite cru refrigerado.....	47
Tabela 8. Análise estatística dos valores de CCS e CBT (<i>cutoff</i> 400.000 cels/mL e 5.000 UFC/mL, respectivamente) com a abundância relativa, em relação ao <i>membership</i> e à <i>structure</i> dos gêneros encontrados em cada propriedade utilizando os testes estatísticos de Parsinomia e AMOVA.....	47

LISTA DE QUADROS E ANEXO

Quadro1. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus agalactiae</i> em três amostras consecutivas do leite do tanque e de amostras obtidas de todos os quartos mamários de quatro rebanhos.....	21
Quadro 2. Valores máximos aceitos para CCS e CBT vigentes e novos valores a entrarem em vigor.....	31
Anexo 1. Checklist aplicado nas propriedades leiteiras de Minas Gerais.....	72
Anexo 2. Tabela do histórico de qualidade do leite das propriedades.....	75

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 Qualidade do leite cru refrigerado no Brasil	14
3.2 Boas práticas agropecuárias (BPA)	15
3.3 Mastite – Aspectos gerais.....	16
3.4 Microrganismos presentes no leite cru do tanque refrigerador.....	18
3.4.1 Análises para caracterização dos microrganismos do leite cru de tanque refrigerador	20
3.5 Análise Metagenômica do gene rRNA16S.....	21
3.5.1 Sequenciamento do gene rRNA16S	22
3.5.2 Análise dos dados	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Caracterização das propriedades	25
4.2 Obtenção das amostras de leite e água	26
4.3 Análises do leite	27
4.3.1 Análise de composição, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total do leite.....	27
4.3.2 Análise microbiológica do leite cru.....	27
4.4 Análises da água	27
4.4.1 Análise microbiológica da água.....	28
4.4.2 Análise físico-química da água.....	28
4.5 Análise de Microbioma	28
4.5.1. Extração do DNA	28
4.5.2. PCR, cDNA e Sequenciamento do rRNA 16S.....	29
4.5.3 Processamento Bioinformático das sequências obtidas	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Qualidade do leite: composição, CCS, CBT e resíduos de antimicrobianos.....	30
5.1.1 Fatores de risco associados à qualidade do leite cru de tanque refrigerador	33

5.2 Isolamento de patógenos no leite cru de tanque refrigerador	36
5.3 Análises físico-química e microbiológica da água	40
5.4 Análise metagenômica do gene rRNA16S para a matriz leite e água.....	41
5.5 Análise metagenômica do gene rRNA16S para a matriz leite.....	46
6. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO 1.....	72

RESUMO

O estado de Minas Gerais é um dos principais produtores de leite do país. Por isso, a caracterização de suas bacias leiteiras quanto ao tipo de microbiota dominante é necessária para orientar a escolha das práticas implantadas em um programa de melhoria da qualidade do leite e de controle da mastite. A água utilizada na propriedade leiteira é um fator que pode interferir na qualidade microbiológica do leite, mas trabalhos relacionando a influência do microbioma da água com a do leite não têm sido descritos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivos: avaliar a qualidade e o microbioma de amostras de leite de tanques refrigeradores e de água de propriedades leiteiras; estabelecer associações entre medidas de manejo, microbiota presente e determinar os fatores de risco relacionados a presença e distribuição dos microrganismos e à perda de qualidade do leite. Realizou-se a coleta de 22 amostras de leite e 22 amostras de água de 11 propriedades da região de Sete Lagoas, Minas Gerais em duas etapas, nos meses de maio e de setembro, totalizando 44 amostras. Elas foram enviadas ao laboratório Neopropecta, Santa Catarina, onde foram realizadas as etapas de enriquecimento do meio, extração do DNA, sequenciamento das regiões hipervariáveis v3-v4 do gene rRNA 16S. Os dados obtidos foram enviados para análise de bioinformática na Universidade de Montreal, Canadá. No processamento de bioinformática foram realizados os testes para alfa diversidade (Chao, Shannon, Simpson) e beta diversidade (teste de Análises de Coordenadas Principais - PCoA). Aplicaram-se também os testes estatísticos AMOVA e Parsimony. Todos os testes demonstraram diferença estatística entre as comunidades existentes no leite e na água ($p < 0,001$). Porém, quando foram comparadas as amostras, tanto de leite quanto de água, nos dois tempos de coleta, não houve diferença estatística entre as comunidades ($p > 0,05$). Essas análises demonstram que, nesse caso, a microbiota encontrada na água não influenciou a microbiota encontrada no leite. Além disso, a microbiota tanto do leite quanto da água parece ter a mesma composição ($p > 0,05$), quando analisada em diferentes tempos de coleta. Além das coletas para análise de metagenoma do gene rRNA 16S, foram coletadas amostras de leite para as análises de composição, contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT), isolamento de patógenos de importância na etiologia da mastite e contagem de microrganismos psicrotóxicos. Também foram coletadas amostras de água para a realização de análises microbiológicas (identificação e contagem de coliformes, bactérias heterotróficas e *E. coli*) e análises físico-químicas (turbidez e dureza). Coletaram-se metadados por meio de um *checklist* de caracterização das práticas de manejo da propriedade e obtenção do histórico da qualidade do leite, dos últimos dois anos, das propriedades visitadas. Todos esses dados foram descritos e submetidos à análise estatística descritiva. Observou-se que, de acordo com os padrões microbiológicos determinados para a água, 45% das amostras, na primeira coleta, e 64%, na segunda coleta, estavam em desacordo com a legislação brasileira. Pela análise dos dados dos microrganismos isolados e dos valores de CCS e de CBT, utilizando análise multivariada, foi possível observar no gráfico gerado, uma tendência de correlação entre amostras positivas para microrganismos como *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus* com amostras com CCS elevada (>400.000 cels/mL) e CBT elevada (>5.000 UFC/mL). Esse resultado corrobora com os achados na literatura de que a presença de alguns grupos de bactérias é indicativa de que a glândula mamária está com sua sanidade comprometida.

ABSTRACT

The state of Minas Gerais is one of the main milk producers in the country. Therefore, the characterization of its milk regions in relation to the dominant microbiota type is necessary to guide the choice of practices implemented in a milk quality improvement and mastitis control program. The water used in the dairy farm is a factor that may interfere with the microbiological quality of the milk, but studies on the influence of water and milk microbiome have not been described. Thus, the present study had as objectives: to evaluate the quality and microbioma of refrigerated raw milk samples and water from dairy farms; establish associations between management measures, present microbiota and determine the risk factors related to the presence and distribution of microorganisms and the loss of milk quality. The collection of 22 milk samples and 22 water samples from 11 farms from the Sete Lagoas region of Minas Gerais state was carried out in two stages, in May and September, totaling 44 samples. They were sent to the laboratory Neoprospecta, Santa Catarina, where the media enrichment, DNA extraction and sequencing of v3-v4 hypervariable regions were performed. The data obtained were sent to bioinformatics analysis at the **University of Montreal**, Canadá. In the bioinformatics processing the tests were performed for alpha diversity (Chao, Shannon, Simpson), and for beta diversity (Principal Coordinate Analysis - PCoA). Statistical tests AMOVA and Parsimony were also applied. All tests showed a statistical difference between the milk and water communities ($p < 0.001$). However, when both leas and water samples were compared at both collection times, there was no statistical difference between the communities ($p > 0.05$). These analyzes demonstrate that, in this case, the microbiota found in water did not influence the microbiota found in milk. In addition, the microbiota of both milk and water perishes to have the same composition, statistically speaking, when analyzed at different times of collection. In addition to the samples for analysis of the metagenome of the 16S gene, samples of milk were collected for analysis of composition, somatic cell count (SCC), total bacterial count (TBC), isolation of pathogens, counting of psychrotrophs. Water samples were also collected to perform microbiological analyzes for the identification and counting of coliforms, heterotrophic bacteria, *E. coli* and physico-chemical analyzes for turbidity and hardness. Metadata was also collected using a checklist to characterize the practices of property management and obtain the historical quality of milk from the last two years of the properties visited. All these data were described and analyzed in the descriptive statistics. It was observed that according to the microbiological standards determined for water, 45% of the samples in the first collection and 64% in the second collection were in disagreement with the Brazilian legislation. By crossing the data of the isolated microorganisms, SCC and TBC values, using a multivariate analysis, it was possible to observe in the generated graph a tendency of correlation between samples positive for microorganisms like *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus* with samples with high SCC ($> 400,000$ cels/mL) and high TBC ($> 5,000$ CFU/mL). This result corroborates with findings in the literature that the presence of some groups of bacteria are signs that the mammary gland health is compromised.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade do leite é influenciada por vários fatores que incluem a contagem bacteriana total (CBT) e a contagem de células somáticas (CCS). As bactérias, usualmente presentes no leite do tanque de refrigeração, podem estar relacionadas à etiologia da mastite e causar sérios prejuízos ao produtor, indústria e consumidor. A elevada CCS, por sua vez, indica mastite subclínica e causa redução na produção de leite e alterações em sua qualidade.

A mastite está, na maioria das vezes, relacionada à ação de microrganismos (bactérias e fungos), sendo também ocasionada por agressões físicas e químicas ao úbere (Oliveira e Medeiros, 2015). Hillerton e Berry (2005) relataram mais de 130 microrganismos causadores de enfermidades na glândula mamária e Vacheyrou *et al.* (2011) confirmaram este resultado. Apesar destas publicações, a totalidade do microbioma presente em leite cru refrigerado e após o transporte não tem sido ainda, bem esclarecida (Costello *et al.*, 2003; Pantoja *et al.*, 2009; Pantoja *et al.*, 2011; Kable *et al.*, 2016).

No mundo inteiro, práticas de manejo têm sido implementadas em propriedades leiteiras com o objetivo de diminuir a contaminação do leite, a prevalência de mastite no rebanho e, por consequência, melhorar a qualidade do leite. Um bom programa de melhoria da qualidade do leite deve abordar itens direta e indiretamente relacionados com a produção de leite de qualidade. Manejo de ordenha, práticas de biossegurança, qualidade de água, ambiente em que as vacas permanecem e terapia de vaca seca são descritos como itens que mais contribuem para o sucesso dos programas de controle e prevenção de mastite.

Para obter resultados com a implantação do programa de qualidade, a propriedade deve ser caracterizada quanto aos fatores de riscos associados à ocorrência da mastite. Além disso, é necessário determinar quais patógenos estão presentes na propriedade (Costa, Rajala-Schultz & Schuenemann, 2016). O fator de risco associado à qualidade da água usada na ordenha é um ponto negligenciado na maioria das propriedades leiteiras. Sabe-se que existem importantes microrganismos presentes na água que podem causar enfermidades na glândula mamária e comprometer a qualidade do leite (Amaral *et al.*, 2006; Bianconi *et al.*, 2007; Capodifoglio *et al.*, 2016).

O estado de Minas Gerais é um dos principais produtores de leite do país. Por isso, a caracterização de suas bacias leiteiras quanto ao tipo de microbiota dominante se faz necessário para direcionar a escolha das práticas implantadas em um programa de melhoria da qualidade do leite e de controle da mastite.

A análise que mais tem sido utilizada para caracterização da microbiota do leite e da água é a análise de metagenômica do gene rRNA 16S. Essa metodologia permite amplificar uma determinada região variável desse gene e com isso, caracterizar toda a população microbiana presente na amostra (Addis *et al.*, 2016). A partir dessa análise, os índices de diversidade são calculados e as comunidades podem ser classificadas quanto a sua variedade genética.

Então, o objetivo desse trabalho foi determinar a microbiota presente no leite cru refrigerado e na água, correlacionando sua presença com a qualidade do leite e com possíveis práticas de manejos realizadas na propriedade.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a qualidade e o microbioma de amostras de leite de tanques refrigeradores e de água de propriedades leiteiras; estabelecer associações entre medidas de manejo, microbiota presente e determinar os fatores de risco relacionados à presença e distribuição dos microrganismos e à perda de qualidade do leite.

2.2 Específicos

- ✓ Identificar os fatores de manejo associados à perda de qualidade do leite do tanque refrigerador de propriedades leiteiras;
- ✓ Identificar os diferentes tipos de microbiota do leite do tanque refrigerador e da água das propriedades estudadas;
- ✓ Comparar o microbioma do leite do tanque refrigerador com a contagem de células somáticas e contagem bacteriana total do leite;
- ✓ Determinar se existe efeito de sazonalidade na variedade dos microrganismos encontrados no leite do tanque refrigerador e na água de cada propriedade;
- ✓ Correlacionar os microrganismos presentes na água e os encontrados no leite dos tanques refrigeradores;
- ✓ Isolar microrganismos envolvidos na etiologia da mastite no leite do tanque refrigerador.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Qualidade do leite cru refrigerado no Brasil

No final da década de 1990, o cenário do setor agroindustrial no Brasil passou por transformações, como as relações existentes entre a indústria e o produtor. Com o incentivo da indústria, os produtores passaram a incorporar novas tecnologias para alcançar maior produtividade, porém sem a qualidade necessária. Em 2002, foi publicada a Instrução Normativa Nº 51 (IN 51) (Brasil, 2002) que, dentre outras especificações, determinou que o leite deveria ser refrigerado e a obrigatoriedade de monitoramento de teores percentuais de gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e total e também de contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana total (CBT) e resíduos de antimicrobianos. Padrões legais para estes parâmetros foram estabelecidos com a implementação de diferentes limites de acordo com as regiões do país. Para monitorar a qualidade, foi criada a Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL) e, com isso, a qualidade do leite cru refrigerado passou a ser uma exigência por lei para todos os laticínios com fiscalização federal no País. Após a implantação da IN 51/2002 (Brasil, 2002), houve modificação da data limite para alcançar o padrão legal dos critérios que estavam em andamento. Essa modificação ocorreu com a publicação das IN 32 (Brasil, 2011a) e da IN 62, em 2011, devido à dificuldade dos produtores em cumprir o prazo pré-estabelecido. Mais recentemente, uma nova atualização das datas foi publicada com a IN 7/2016 (Brasil, 2016) e pela IN 31/2018 (Brasil, 2018) pelas dificuldades do produtor em alcançar limites de CCS e CBT para produção de leite de qualidade.

Pode-se dizer que embora a legislação vigente seja a base para a qualidade do leite no Brasil, ela apenas define limites a serem alcançados. Isso porque ainda não há penalidades legais para o produtor que não fornece leite com a qualidade mínima determinada. Como forma de incentivo à melhoria constante da qualidade do leite, alguns laticínios implantaram programas de pagamento que possuem penalizações e incentivos dentro de uma escala de valores a serem alcançados para os padrões legais (Roma Junior *et al.*, 2009). Botaro *et al.* (2013) afirmaram que, nos programas de pagamento pela qualidade, a combinação entre penalidade e incentivo financeiro gera um impacto positivo sobre a qualidade do leite. De forma geral, informações de CCS e CBT são os principais itens utilizados como quesitos para avaliar a qualidade do leite entregue à indústria (Roma Junior *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2012). Em dados publicados pela RBQL, no ano de 2012, de um total de 2,8 milhões de amostras de leite analisadas em todo país, 71% estavam com CCS abaixo do limite legal da época (600.000 cels/mL). Ainda sobre esses dados, apenas 48% estariam em conformidade com os limites de 400.000 cels/mL para o parâmetro de CCS e 29% das amostras para 100.000 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) /mL para CBT (Santos, 2013).

Valores de CCS e de CBT, acima dos limites estabelecidos pela legislação, influenciam diretamente o produto que é disponibilizado ao consumidor final. Em 2000, foi realizado um trabalho (Ma *et al.*, 2000) que verificou a relação existente entre os valores de CCS e o seu efeito na qualidade do leite fluido pasteurizado, em três momentos do tempo de prateleira. Estes autores observaram que a lipólise e a hidrólise da caseína ocorreram duas a três vezes mais rapidamente em leites com CCS aumentada (849.000 cels/mL). Além disso, leite com CCS baixa (45.000 cels/mL) manteve a qualidade sensorial durante todo o período de vida de prateleira analisado. Nas amostras de leite com alta CCS, no entanto, foram detectados defeitos como rancidez e gosto amargo, consistentes com os altos níveis de lipólise e proteólise.

Em relação à CBT, diversos fatores relacionados à higiene inadequada podem contribuir significativamente para o aumento da contagem bacteriana total do leite do tanque (CBT), ou seja, elevar o número de microrganismos presentes no leite e causar deterioração. Salomão (2012) citou o uso de produtos inadequados de limpeza e sanitização no tanque de refrigeração e nos equipamentos de ordenha até falhas na rotina de ordenha (*predipping*), como exemplos de condições responsáveis pelo aumento da CBT do leite cru refrigerado. Além disso, o mesmo autor afirmou que a contaminações microbianas presentes nos tetos e úberes devido a falhas no manejo de ambiente,

também contribuem para a elevação da CBT do tanque. Outra causa relacionada ao aumento da CBT no leite é a veiculação de microrganismos pela água. Durante a limpeza dos equipamentos de ordenha e do tanque de refrigeração, deve-se estar atento para a qualidade da água utilizada, já que bactérias como *Pseudomonas* spp. são constantemente isoladas de amostras de água (Cousin e Bramley, 1981). Outros microrganismos como *Bacillus* spp., coliformes, corineformes, *Enterococcus* spp. e leveduras contaminam o leite por estarem aderidos à parede do tanque de expansão mal higienizado. A contagem bacteriana é importante indicador na avaliação das condições de armazenamento do leite na propriedade e também na eficiência dos procedimentos de ordenha. Com essa análise, é possível prever prováveis interferências e efeitos adversos sob o rendimento industrial e a segurança alimentar do leite (Bueno, 2008).

A pesquisa de resíduos de antimicrobianos é uma análise que avalia se o leite está livre de qualquer contaminação acima dos níveis pré-estabelecidos (Brasil, 1999) e, hoje em dia, ela é realizada por métodos de triagem e de confirmação. A presença dos resíduos de antimicrobianos vem causando preocupação em toda a cadeia produtiva do leite devido aos riscos e prejuízos que eles podem acarretar (Magnavita, 2012). Essa contaminação pode ser resultante de falhas no controle dos animais em tratamento, por não respeitar o período de carência ou mesmo pela adulteração fraudulenta (Furtado, 1999). A presença de resíduos de antimicrobianos no leite, acima dos limites máximos permitidos (LMR), causa danos à saúde do consumidor (Folly e Machado, 2000; Nero *et al.*, 2007), prejuízos ao produtor pelo descarte do leite contaminado, e à indústria, pela perda da eficiência no processo de produção de derivados lácteos, como o iogurte e o queijo (Martin, 2011).

Costa *et al.* (2013) afirmaram que as alterações na qualidade do leite relacionadas à presença de resíduos de antimicrobianos, presença de patógenos e toxinas, podem representar riscos à saúde do consumidor. Esses riscos decorrem do consumo dos produtos lácteos crus, de erros na pasteurização, da contaminação do leite por patógenos termorresistentes emergentes, assim como de sua adulteração (Ruegg, 2003).

3.2 Boas práticas agropecuárias (BPA)

Falhas nos procedimentos de manejo comprometem a produção de leite cru com qualidade, o que por sua vez, diminui o rendimento e o tempo de prateleira dos derivados lácteos. Para que a qualidade do leite seja a melhor possível, a sua produção depende da correta execução de procedimentos como cuidados com a saúde do animal, ambiente, disponibilidade e qualidade da água, limpeza e manutenção de equipamentos (Elmoslemany *et al.*, 2009).

O parâmetro diretamente relacionado a falhas higiênicas é a CBT. O aumento da CBT ocorre, principalmente, devido à contaminação da superfície dos equipamentos de ordenha, da superfície externa dos tetos e úbere e, ainda, pela presença de microrganismos causadores de mastite (Elmoslemany *et al.*, 2010). A população microbiana presente no ar, no material das camas disponibilizadas e no ambiente, no qual as vacas permanecem, podem também contaminar o leite cru diversificando ainda mais o microbioma presente. Dessa forma, a análise periódica do leite é importante para caracterizar a qualidade do leite a ser processado industrialmente e, até mesmo, para possível identificação da origem da contaminação (Jayarao; Wolfgang, 2003).

A água utilizada na propriedade leiteira é um dos fatores que pode interferir na qualidade microbiológica do leite. A boa qualidade dessa água, que é utilizada para realizar a limpeza do equipamento de ordenha e dos tetos da vaca, é fundamental para evitar a contaminação e veiculação de microrganismos para o interior da glândula mamária e para o leite armazenado no tanque de refrigeração (Polegato; Amaral, 2005; Amaral *et al.*, 2006; Costa, 2006; Bianconi *et al.*, 2007; Jatobá, 2009). Essa boa qualidade deve ser garantida na origem ou no momento da sua utilização, por algum tratamento (Polegato e Amaral, 2005). Picinin (2003) estudou propriedades leiteiras em Minas Gerais a fim de caracterizar a qualidade da água utilizada nessas propriedades. Observou-se que água de origem em mina, cisterna ou riacho apresentavam-se como não potável em 100% das propriedades. Já

em propriedades que obtinham água de poço ou rede de distribuição, apenas 42,86% possuíam água potável. Esses dados corroboram com os encontrados por Rapini *et al.* (2003), que ao avaliarem a qualidade microbiológica da água de propriedades leiteiras na região metropolitana de Belo Horizonte - MG, observaram 79,6% das amostras contaminadas por coliformes totais e 69,4% por *E. coli*, demonstrando que a qualidade da água era insatisfatória. Dessa forma, se a água utilizada na realização das boas práticas for de baixa qualidade, além de ocasionar o aumento da CBT no leite, pode veicular microrganismos de grande importância em saúde pública (Cerqueira *et al.*, 2006).

Vários estudos avaliaram a relação entre boas práticas de produção e a perda da qualidade do leite, correlacionando-os com a presença de patógenos no leite e demonstraram que a adoção de boas práticas de produção está diretamente relacionada à qualidade do leite produzido na propriedade (Kelly *et al.*, 2009; Nero *et al.*, 2009; Bava *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011; Azevedo *et al.*, 2016; Costa, Rajala-Schultz, e Schuenemann, 2016). Kelly *et al.* (2009) avaliaram algumas práticas realizadas em rebanhos irlandeses mantidos a pasto e observaram que a utilização de água quente na sala de ordenha, o corte de pêlos da cauda, pelo menos uma vez ao ano, e a frequente limpeza da sala de ordenha apresentaram alta associação com a baixa CBT do leite. Quando foram comparados os procedimentos de ordenha e a qualidade higiênica do leite, Nero *et al.* (2009) relataram que o procedimento considerado como o mais efetivo para manter a CBT do tanque sem aumento evidente foi a refrigeração rápida do leite até 7°C. Sobre outro ponto de vista, com o foco no estudo das práticas de manejo relacionadas à ocorrência de *S. aureus*, em amostras de leite refrigerados, Costa, Rajala-Schultz e Schuenemann (2016) determinaram que práticas como *pré* e *postdipping*, o uso de papel toalha descartável por teto e propriedades nas quais o proprietário estava engajado com a produção apresentaram menor probabilidade de contaminação de *S. aureus* no leite de tanque de refrigeração. Ainda relacionado à presença de *S. aureus*, Oliveira *et al.* (2011) observaram que a não utilização de desinfetante no *post* e *predipping* são fatores de risco para que haja maior chance da contaminação do leite por esse microrganismo. Dessa forma, entende-se que as práticas de manejo estão associadas à produção de leite seguro e com qualidade.

3.3 Mastite – Aspectos gerais

A mastite afeta a produtividade leiteira da vaca de forma direta e também a qualidade do leite e de seus produtos derivados (Paiva *et al.*, 2012). Bhatt *et al.* (2011) estimaram que as perdas econômicas decorrentes dessa doença podem chegar a quase US\$ 2 bilhões de dólares por ano, nos Estados Unidos. A perda econômica ocorre dos maiores gastos em tratamentos veterinários, redução da produção, perda precoce do animal, diminuição do preço pago pela qualidade do leite (Pinzón-Sánchez and Ruegg, 2011; Holland *et al.*, 2015). Estimativas de perdas econômicas em função da mastite são escassas na realidade brasileira. Dias (2007) caracterizou uma perda de cerca de 12% a 15% da produtividade leiteira em decorrência da mastite, a cada ano, no Brasil.

A ocorrência da mastite relaciona-se à tríade: ambiente, características inerentes do animal e patógeno envolvido (Coser *et al.*, 2012; Demme and Abegaz, 2015; Rashad *et al.*, 2016). As mastites podem ser denominadas de origem ambiental, quando os microrganismos não são adaptados ao animal e agem como oportunistas na glândula mamária. Essas bactérias ambientais são ubíquas e podem ser encontradas em cama, fezes, água, fômites contaminados e no solo. Já nas mastites chamadas contagiosas, os microrganismos são adaptados ao nicho mamário. Esses microrganismos são transmitidos a partir da própria glândula mamária infectada durante a ordenha pelos equipamentos e mãos do ordenhador (Jamali *et al.*, 2014).

A mastite pode se apresentar na forma clínica ou subclínica, variando conforme a gravidade da infecção no animal. Nas duas manifestações podem ser observadas alterações nos principais constituintes do leite, como gordura, proteína e lactose (Muller, 2002). Na forma subclínica, não é possível diagnosticar a doença visivelmente, sendo, então, necessário utilizar ferramentas para tal. A contagem eletrônica de células somáticas por citometria de fluxo, a cultura microbiológica do leite e o California Mastitis Test (CMT) são métodos amplamente utilizados para confirmar a presença da

doença na forma subclínica (Smith, 1994; Tozzetti *et al.*, 2008; Coser *et al.*, 2012). Na mastite subclínica, é possível observar que a CCS tem valores acima do normal por longos períodos (Silveira *et al.*, 2005; Whelehan *et al.*, 2011). Emanuelson e Nielsen (2017) afirmaram que não suplementar vacas secas com sal mineral adequado e não utilizar desinfetante de teto no *postdipping* de vacas leiteira são práticas de manejo que aumentam o risco de elevar a CCS no leite do tanque. Na mastite clínica, os sintomas podem ser facilmente observados. Sensibilidade da glândula mamária, hiperemia, presença de pus, grumos ou sangue no leite são frequentemente associados com essa forma da doença. De acordo com Santos e Fonseca (2007), para que o rebanho tenha uma boa saúde da glândula mamária, recomenda-se que a incidência mensal de mastite clínica esteja menor que 1%. Já para mastite subclínica, estima-se que a incidência seja de 20 a 80% do número total de casos de mastite (Contreras e Rodriguez, 2011). Por isso, é necessário que a identificação de animais com mastite seja feita o mais breve possível para evitar a transmissão de patógenos durante a ordenha.

Dados da prevalência dos patógenos e da taxa de incidência da mastite clínica são importantes para que a propriedade possa desenvolver programas de prevenção e controle de mastite e, assim, traçar qual o melhor protocolo de tratamento a ser utilizado (Piessens *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2017). Isso é importante porque a intensidade e o tipo de mastite dependem do microrganismo encontrado. Dessa forma, a avaliação da estratégia de tratamento utilizada para casos de mastite clínica deve levar em conta a microbiologia envolvida e fatores econômicos (Pinzón-Sánchez, Cabrera e Ruegg, 2011). Wilson *et al.* (1997) descreveram que microrganismos como *Mycoplasma* spp., *Arcanobacterium pyogenes*, *Pasteurella* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. são mais associados a mastites que causam maiores perdas da produção leiteira. Gao *et al.* (2017) identificaram a incidência da mastite clínica e a distribuição dos patógenos envolvidos. Nesse trabalho, os patógenos mais frequentemente isolados foram *Escherichia coli* (14,4%), *Klebsiella* spp. (13,0%), *Staphylococcus* não *aureus* (11,3%), *Streptococcus dysgalactiae* (10,5%) e *Staphylococcus aureus* (10,2%). *Streptococcus agalactiae* foi isolado em 2,8% das amostras de mastite clínica enquanto que *Streptococcus uberis* foi detectado em 2,1% das amostras. Em um trabalho realizado em Araras (São Paulo), França *et al.* (2017) analisaram 1.163 amostras de leite compostas de vacas para identificar os principais patógenos associados. O patógeno mais prevalente foi *Staphylococcus* spp., isolado em 15,99% das amostras analisadas, seguido de *Streptococcus* spp. (5,33%), *S. aureus* (4,64%), *Corynebacterium* spp. (4,21%) e de bactérias do grupo coliformes (0,95%).

Staphylococcus aureus é considerado o principal agente causador da mastite bovina (Sá *et al.*, 2004), sendo constantemente encontrado em infecções clínicas e subclínicas (Brito *et al.*, 1999). Essa bactéria possui grande capacidade de resistência aos antimicrobianos, o que diminui a taxa de cura da mastite (Melo *et al.*, 2012). O uso constante de antimicrobianos no campo para controle e tratamento de vacas em rebanhos leiteiros tem aumentado ao longo dos anos e esse uso indiscriminado pode ser considerado como uma das causas da resistência a antimicrobianos observada em patógenos causadores de mastite (Schwartz *et al.*, 2003; Jamali *et al.* 2013). Medeiros (2009) analisou 291 amostras de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite provenientes de vacas com mastite na região metropolitana de Recife, Agreste e Zona da Mata do estado de Pernambuco. Dessas amostras, 170 (58,4%) foram classificadas como *Staphylococcus* coagulase negativo, 37 (12,7%) como *Staphylococcus* coagulase positivo e 84 (28,9%) como *Staphylococcus aureus*. O autor afirma que 63% das amostras de *Staphylococcus* spp. eram amostras de bactérias consideradas multirresistentes, apresentando resistência a pelo menos dois antimicrobianos diferentes.

Streptococcus é um gênero que, de forma geral, abrigava dois grupos de microrganismos: os que eram adaptados à glândula mamária, como o caso de *S. agalactiae* (McDonald, 1977) e os grupos dos que não eram adaptados, ditos *Streptococcus* ambientais, ou não-*agalactiae* (Smith e Hogan, 1993). Porém, hoje em dia, esse perfil está sendo revisto, uma vez que existem amostras tanto de *Streptococcus uberis* quanto de *Streptococcus dysgalactiae* que eram classificados apenas como ambientais e que hoje em dia podem estar ou não adaptados ao nicho mamário (Whist *et al.*, 2007). *Streptococcus agalactiae* e algumas linhagens de *S. uberis* e *S. dysgalactiae* são considerados patógenos contagiosos, que sobrevivem na glândula mamária e causam, na maioria das vezes, mastite subclínica com altos valores de CCS (Mahmmod *et al.*, 2015; Reyes *et al.*, 2017; Salina *et al.*, 2017).

De acordo com Bradley (2002), os casos de mastite clínica têm ocorrência intermitente e têm menor incidência quando comparados aos casos de mastite subclínica. Já os estreptococos ambientais são um grupo de patógenos considerados oportunistas, porque sua sobrevivência na glândula mamária é limitada, já que não são adaptados a sobreviverem dentro dela (Salina *et al.*, 2017).

Ao identificar o tipo de microbiota presente em amostras individuais das vacas (glândula mamária) ou no leite do tanque de refrigeração é possível implementar práticas de manejo para diminuir a taxa de infecção do rebanho. Pinzón-Sánchez, Cabrera e Ruegg (2011) criaram uma árvore decisória para determinar qual a estratégia, economicamente viável, para o tratamento de vacas, multíparas ou primíparas, com mastite, leve ou moderada, no início da lactação. Além do tipo de mastite, foram consideradas diferentes distribuições dos principais tipos de patógenos causadores de mastite. Assim, concluíram que a melhor estratégia econômica seria tratar os casos de mastite clínica causados por bactérias Gram-positivo por dois dias consecutivos, e evitar tratar, com antimicrobianos, casos de mastite clínicas por bactérias Gram-negativo ou quando não houver identificação do patógeno envolvido.

Dentro da tríade, que determina a ocorrência de mastite, o ambiente é um fator de grande impacto. Sua importância como influenciador do estado fisiológico da vaca, disponibilidade de forrageiras e produtividade de leite da vaca já estão bem estabelecidos. Riekerink *et al.* (2007) determinaram que fatores climáticos são um dos responsáveis em alterar os níveis fisiológicos das vacas de leite e, assim, contribuir para a ocorrência de doenças como a mastite. Além disso, Tao *et al.* (2018) descreveram que o estresse calórico, advindo da alta sensação térmica ambiental, resulta na diminuição de 25% a 40% da produção leiteira, sendo que 50% dessa diminuição é resultado do menor consumo alimentar pela vaca. Magalhães *et al.* (2006) observaram que rebanhos Holandeses, do estado de São Paulo, tiveram valores de CCS mais altos no verão (janeiro a março) e mais baixos no inverno. Essa inversão de valores pode ser explicada porque no verão há aumento do desafio devido à presença de barro, umidade e estresse térmico. Esses fatores diminuem a imunidade do animal e aumentam a quantidade de patógenos aos quais as vacas são expostas, resultando, assim, em aumento da incidência de mastite.

Observa-se que existem muitos fatores que podem determinar a ocorrência de casos de mastite em uma propriedade. Assim, é importante que os fatores de risco e os microrganismos presentes em cada propriedade sejam caracterizados.

3.4 Microrganismos presentes no leite cru do tanque refrigerador

O leite entregue às indústrias, pelos produtores rurais, possui uma qualidade que está diretamente relacionada à diversidade de microrganismos presentes nesse leite refrigerado, estocado na propriedade rural. O leite pode ser contaminado por diversos fatores como os microrganismos presentes no ambiente, falta de qualidade da água utilizada para limpeza da ordenha, falha no manejo durante ordenha e baixa sanidade do úbere (Sampaio *et al.*, 2015). Essa contaminação pode incluir tanto microrganismos patogênicos quanto deteriorantes.

Sabe-se que o leite é uma excelente matriz para o crescimento de vários tipos de microrganismos e, por isso, o isolamento do patógeno é importante para determinar qual será a conduta estabelecida pela propriedade. Zimmermann e Araújo (2017) analisaram 44 amostras de leite, de vacas com mastite, de Campo Mourão-Paraná, utilizando a técnica clássica, a fim de detectar patógenos causadores de mastite. Foram encontrados *Staphylococcus* spp. em 58,97% das amostras, *Streptococcus* spp. em 33,33%, *Enterococcus* spp. em 12,82 %, *Bacillus* spp. em 10,25%, *Corynebacterium* spp. em 10,25%, *Escherichia coli* em 5,12%, *Yersinia* spp. em 2,56% e *Klebsiella* spp. em 2,56%, demonstrando, assim, a heterogeneidade de patógenos que podem estar presentes nas amostras de leite de vacas contaminadas. Em um estudo realizado na China (Zhang *et al.*, 2016) foi observada a prevalência dos seguintes microrganismos causadores de mastite em amostras de leite cru

refrigerado: *Streptococcus agalactiae* (38,61%), *S. dysgalactiae* (28,16%), *Staphylococcus aureus* (19,10%), e *Escherichia coli* (6,90%).

Microrganismos patogênicos, quando presentes na glândula mamária, podem ocasionar mastite nos animais e acredita-se que aproximadamente 80% dos casos de mastite em vacas leiteiras estejam relacionados às bactérias. As bactérias classificadas como de origem contagiosa são as mais prevalentes na mastite bovina e os patógenos mais frequentes são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Bradley, 2002; Riekerink *et al.*, 2006). Já os microrganismos que causam mastite ambiental são caracterizados como oportunistas, pois não sobrevivem no hospedeiro. Quando presentes na glândula mamária, esses microrganismos desencadeiam resposta imune e são geralmente eliminados logo em seguida. Os representantes mais importantes são as bactérias da família Enterobacteriaceae e *Streptococcus uberis* (Mendes *et al.*, 2014).

Poucos estudos foram feitos analisando a dinâmica da microbiota do leite frente às mudanças da saúde do úbere. Kuehn *et al.* (2013) investigaram a diversidade de DNA bacteriano existente em dez amostras de leite positivo para mastite, com ausência de patógenos em cultura bacteriológica e compararam com a microbiota de leite de quartos mamários saudáveis. A diversidade microbiana dos dois grupos foi estatisticamente diferente ($P \leq 0,05$). Eles encontraram altas porcentagens dos gêneros *Pseudomonas*, *Psychrobacter* e *Ralstonia* em quartos mamários saudáveis quando comparados com quartos com mastite. Em estudo recente, Oikonomou *et al.* (2014) descreveram a diversidade microbiológica em 144 amostras de quartos mamários saudáveis comparando os dados com a contagem de células somáticas. Os autores afirmam que os gêneros *Faecalibacterium*, *Lachnospiraceae* não classificado, *Propionibacterium* e *Aeribacillus* foram encontrados em todas as amostras de leite de quartos saudáveis e por isso podem ser considerados como exemplares desse tipo de *status* fisiológico. Não foi encontrado estudo que correlaciona as práticas de manejo e a qualidade de água com a diversidade de microbioma encontrada no leite cru refrigerado em tanque.

Existem alguns microrganismos que, além da mastite no animal, podem estar envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimento (DTA) no homem ou causar defeitos e perdas na qualidade do produto final, como; *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (Rezer, 2010; O'Connell, 2016).

A fim de evitar a ocorrência de doença por ingestão de leite cru, seu consumo foi proibido no Brasil (Brasil, 2017, Brasil, 2011^a; Brasil, 2011b). Porém, mesmo com a proibição, pode-se observar que essa prática ainda ocorre em regiões distintas do país (Nero *et al.*, 2003; Cruz e Menasche, 2014). O risco da ingestão do leite cru está associado à presença de microrganismos patogênicos em produtos lácteos e seus derivados não pasteurizados. Além disso, leite com baixa qualidade microbiológica tem mais risco de estar contaminado com enterotoxinas e enzimas termorresistentes. Uma vez resistindo à pasteurização, as enzimas produzidas pelos microrganismos continuam ativas causando deterioração do produto enquanto que as enterotoxinas se estiverem em concentração suficiente podem causar danos à saúde do consumidor. O número de casos de intoxicação alimentar pelo consumo de leite e derivados no Brasil é de difícil estimativa porque apenas uma porcentagem dos casos de DTA é notificada e confirmada, tanto pela falta de consciência da população em relação a este risco quanto pela deficiência do serviço de epidemiologia (Franco *et al.*, 2003). A presença de *Staphylococcus aureus* no leite é importante para a saúde pública pelo potencial de produzir toxinas entéricas que causam DTA no homem (Le Loir *et al.*, 2003; Jorgensen *et al.*, 2005; Schmid *et al.*, 2009; Ostyn *et al.*, 2010). Essas toxinas conseguem resistir tanto aos processamentos térmicos, como a pasteurização, quanto à ação proteolítica de enzimas no estômago (Balaban e Rasooly, 2000). Então, uma vez formada no alimento, não há processamento capaz de inativá-las para evitar a ocorrência de DTA.

A utilização de tanques de refrigeração em propriedades rurais tem por objetivo minimizar a multiplicação dos microrganismos mesófilos, que possuem como um de seus representantes, algumas bactérias patogênicas. No entanto, a manutenção do leite em baixas temperaturas favorece o desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos que podem ser deteriorantes e/ou patogênicos (Cempirkova e Mikulova, 2009; Zeni *et al.*, 2013). Algumas bactérias psicrotróficas têm a capacidade de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas. Essas enzimas são resistentes a altas temperaturas e por

isso, não são inativadas durante a pasteurização ou em tratamento de ultra-alta temperatura (UHT) (Zeni *et al.*, 2013; Von Neubeck, *et al.*, 2015). Datta e Deeth (2003) afirmaram que nos produtos com vida de prateleira estendida, a ação proteolítica pode causar aumento de viscosidade enquanto a ação lipolítica pode levar à rancidez, pela hidrólise da gordura no leite. Dessa forma, a presença de enzimas proteolíticas e lipolíticas causam alterações sensoriais, diminuição do tempo de prateleira e do rendimento industrial de produtos derivados (Champagne *et al.*, 1994; Arcuri *et al.*, 2008; Teh *et al.*, 2014). De acordo com alguns autores, *Pseudomonas* spp. é o exemplo de proteolíticos que podem se tornar predominantes em leite cru refrigerado (Sorhaug e Stepaniak, 1997; Eneroth *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2006; Hantsis-Zacharov e Halpern, 2007; De Jonghe *et al.*, 2011). *Pseudomonas* spp. possuem grande capacidade metabólica, principalmente lipolítica (Izidoro *et al.*, 2013), além da produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes e podem causar importantes problemas tecnológicos como rancificação, geleificação, entre outros defeitos.

3.4.1 Análises para caracterização dos microrganismos do leite cru de tanque refrigerador

A análise mais utilizada para conhecer o perfil microbiológico do rebanho é a cultura individual do leite dos quartos mamários. Ela permite diagnosticar a infecção intramamária de cada vaca e qual microrganismo está presente, porém, a cultura individual de quartos é bastante dispendiosa para ser adotada na rotina da propriedade. Uma opção para essa situação é a cultura microbiológica do leite do tanque que identifica os principais patógenos maiores e direciona qual o melhor tratamento e estratégia a serem adotados (Riekerink *et al.*, 2006; Bi *et al.*, 2016). Assim, a execução do exame microbiológico do leite do tanque da propriedade diminui os custos quando comparados à cultura individual dos animais (Bi *et al.*, 2016).

O isolamento de microrganismos contagiosos indica que uma ou mais vacas no rebanho estão infectadas, sendo possível identificar o nível de infecção e prevalência de determinados patógenos em regiões leiteiras. Riekerink *et al.* (2010) analisaram 226 propriedades no Canadá e relataram a prevalência de 4% para *Streptococcus agalactiae* e de 74%, para *S. aureus*. As propriedades que possuíam baixa probabilidade de isolamento de *S. aureus* foram associadas com práticas de manejo de terapia de vaca seca e a nutrição para melhoria da imunidade da vaca para evitar ocorrência de mastite. Costa, Rajala-Schultz e Schuenemann (2016) avaliaram a prevalência de *S. aureus* em propriedades leiteiras de Ohio (Estados Unidos) e observaram variação entre o número de coletas de leite de tanque para cultura e percentagem de isolamento. Essa diferença, que varia de acordo com o número de coletas de leite de tanque, confirma os dados de Paiva (2009) que afirmou que há variação de prevalência de acordo com o número de coletas realizadas (Quadro 1).

Quadro 1. Isolamento de *Staphylococcus aureus* e de *Streptococcus agalactiae* em três amostras consecutivas de leite do tanque e de amostras obtidas de todos os quartos mamários de quatro rebanhos

Rebanhos (nº de animais)	Bactérias	Animais infectados N (%)	Quartos infectados N (%)	Amostras do tanque		
				1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
A (55)	<i>S. aureus</i>	01 (1,8%)	02 (0,9%)	+	+	+
	<i>S. agalactiae</i>	01 (1,8%)	01 (0,46%)	-	+	-
B (52)	<i>S. aureus</i>	10 (19,2)	12 (5,9%)	+	+	+
	<i>S. agalactiae</i>	0	0	-	-	-
C (47)	<i>S. aureus</i>	08 (17,0%)	10 (5,4%)	-	-	+
	<i>S. agalactiae</i>	05 (10,6%)	07 (3,8%)	+	-	+
D (119)	<i>S. aureus</i>	10 (8,4%)	10 (2,2%)	+	+	+
	<i>S. agalactiae</i>	10 (8,4%)	17 (3,7%)	+	+	+

Fonte: Paiva (2009)

Bradley *et al.* (2007) descreveram que 30% dos animais e quartos mamários que estavam com CCS alta (> 200.000 cels/mL), ou seja, um dos indicativos de mastite subclínica, obtiveram resultado negativo na cultura microbiológica. Oikonomou *et al.* (2014) observaram também que 25% das amostras coletadas, de quartos mamários de animais positivos para mastite, tiveram resultado negativo ou não apresentaram patógenos importantes na epidemiologia da doença. Isso demonstra a existência de microrganismos que são viáveis, mas não cultiváveis e que, por isso, não podem ser caracterizados por análise dependente de cultivo (Oliver, 2005; Rinke *et al.*, 2013). Essa técnica de isolamento demanda mais tempo de trabalho, depende de condições de incubação, o meio utilizado é específico para o microrganismo que se quer isolar (Weber *et al.*, 2014).

Apesar de essas características não tão desejáveis, a cultura microbiológica é considerada a metodologia padrão ouro para o diagnóstico de microrganismos causadores de mastite (Oikonomou *et al.*, 2012). Além disso, por causa da complexa interação entre o microrganismo e o hospedeiro, esse tipo de análise permite estudar aspectos diferentes da microbiota, como a capacidade de sobrevivência em ambientes alterados (Sannasiddappa *et al.*, 2011). Com a evolução da biologia, novas técnicas para identificação das bactérias foram desenvolvidas. As técnicas que são independentes de cultura permitem identificar uma maior diversidade de microrganismos presentes na amostra (Handelsman, 2004). A análise molecular e, recentemente, os sequenciamentos de nova geração do DNA têm demonstrado boa eficiência para caracterizar a comunidade microbiana da amostra de interesse (Molina e Tobo, 2011; Cardoso, 2015).

Kable *et al.* (2016) analisaram, durante três estações, 899 amostras de leite transportado em caminhões e de silos de duas indústrias de laticínios na Califórnia. A análise molecular por sequenciamento do gene rRNA16S do leite revelou maior diversidade microbiana durante a primavera, com identificação de 29 grupos taxonômicos. Observou-se alta proporção de *Streptococcus*, de *Staphylococcus* e de *Clostridium* spp. em amostras obtidas dos caminhões. No leite dos silos, dois tipos de comunidade foram identificados e houve dominância de *Acinetobacter* em um dos grupos.

3.5 Análise Metagenômica do gene rRNA16S

A genômica é uma parte da bioquímica que procura conhecer o genoma parcial ou completo de um determinado organismo. Ela envolve o estudo do genoma, da estrutura e função de genes, da interação dos genes e proteínas e das alterações epigenéticas no material genético (Figura 1). A metagenômica do gene rRNA16S é a análise que permite caracterizar qual a composição filogenética presente na amostra (Addis *et al.*, 2016).

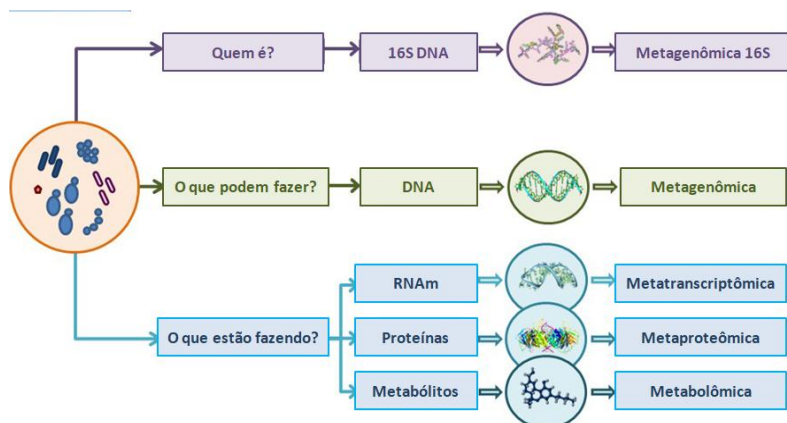


Figura 1. Relação dos tipos de análises disponíveis para estudar a microbiota presente no leite. Fonte: Addis *et al.* (2016)

A metagenômica do gene rRNA16S envolve o sequenciamento de uma região específica (Addis *et al.*, 2016). Existem diversas plataformas que são capazes de realizar essa análise e o

interesse pelo uso da plataforma Illumina tem crescido a cada ano (Bartram *et al.*, 2011; Caporaso *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011). Isso ocorre porque ao utilizar a tecnologia do sequenciamento de nova geração de alto desempenho, essa plataforma gera menor custo por sequência, quando comparada com outras, e é capaz de produzir uma diversidade microbiana de alto rendimento e com alta cobertura (Caporaso *et al.*, 2012; Ross *et al.*, 2013; Nakazato *et al.*, 2013). A análise metagenômica do gene rRNA16S basicamente é dividida nas etapas de extração e amplificação por PCR do DNA, formação de bibliotecas e de sequenciamento de uma região do gene rRNA16S para posterior análise de bioinformática (Addis *et al.*, 2016). A extração do DNA é um passo importante dessa metodologia, já que a quantidade e a pureza do material extraído irão determinar a qualidade dos passos seguintes (Ferreira, 2014; Bag *et al.*, 2016). Na etapa da amplificação, podem ocorrer formações de recombinações artificiais de fragmentos pré-existentes denominadas *quimera* (Bradley e Hilis, 1997). A diferenciação da sequência *quimera* para a sequência original é difícil, e isso pode resultar na superestimação da diversidade microbiana da amostra (Hugenholtz e Huber, 2003). Esse erro é removido em uma das etapas do processamento bioinformático. O Mothur é uma das plataformas mais utilizadas para a análise de bioinformática (Schloss *et al.*, 2009). Essa plataforma permite alinhar as sequências de acordo com o banco de dados de referência SILVA (Quast *et al.*, 2013). Após essa etapa, os dados passam por um controle de qualidade, no qual se utiliza o algoritmo *uchime* para identificar e retirar as sequências *quimeras* (Edgar *et al.*, 2010; Edgar *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013). As sequências restantes são agrupadas em unidades de táxon operacional (OTU), ou seja, ocorre o agrupamento entre sequências que possuem maior similaridade, e utiliza-se um corte para a matriz de distância de 0.03. A qualidade do OTU pode ser influenciada por erros de sequenciamento, presença de *quimeras* (Schloss *et al.*, 2011). Após essa fase, as OTU são comparadas com uma base de dados conhecida para a caracterização taxonômica. Algumas das bases de dados utilizadas para determinação taxonômica de grupos de bactérias são Greengenes (16S) (DeSantis *et al.*, 2006), Ribosomal Database Project (16S) (Cole *et al.*, 2007), NCBI (Federhen, 2012), Silva (16S + 18S) (Quast *et al.*, 2013) e Unite (ITS) (Kõljalg, Nilsson e Abarenkov, 2013). Porém, essas bases de dados não são tão utilizadas para outros grupos como os protistas ou vírus porque eles são microrganismos extremamente diversificados e com menor volume de sequências e, com isso, menor volume de informações (Oulas *et al.*, 2015).

3.5.1 Sequenciamento do gene rRNA16S

O sequenciamento do gene rRNA16S tem sido amplamente utilizado para a caracterização taxonômica das bactérias presentes em diversas matrizes diferentes (Oikonomou *et al.*, 2012; Oikonomou *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018). Esse gene é encontrado em todas as bactérias porque é responsável por transcrever o componente RNA ribossomal da subunidade menor 30S de bactérias (Wang *et al.*, 2015). Ele possui regiões altamente conservadas e altamente variáveis (Bodilis *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016; Addis *et al.*, 2016) (Figura 2). A conservação de determinadas regiões desse gene ocorreu porque nelas estão presentes codificações para proteínas que desempenham importantes funções para a bactéria (Van de Peer *et al.*, 1996; Jonasson *et al.*, 2002). As regiões variáveis foram identificadas de V1-V9 (Figura 2) e são utilizadas para caracterizar diferentes grupos taxonômicos já que são fortemente conservadas entre grupos taxonômicos, permitindo, assim, estimar a distância filogenética entre eles (Almeida, 2017). De acordo com as diretrizes propostas para a classificação bacteriana, amostras que apresentam menos de 97% de similaridade entre si são consideradas grupos taxonômicos diferentes e os que apresentam mais de 97% de similaridade devem passar por outro tipo de metodologia para classificação diferencial (Janda e Abbott, 2007). Apesar de ser uma boa análise para classificação da bactéria no nível de gênero, a metagenômica do gene rRNA16S não possui um bom poder filogenético para diferenciação de espécie (Bosshard *et al.*, 2006; Mignard e Flandrois, 2006). Por isso, a escolha dessa região e do par de *primers*, para amplificá-la está correlacionada com a melhor caracterização da comunidade microbiana. Yang *et al.* (2016) consideram que as regiões V2 e V8 são as menos confiáveis para a análise filogenética da maior parte dos filos de bactérias. Estudos realizados em diversos tipos de matrizes ainda discutem sobre qual a melhor região hipervariável a ser utilizada para

sequenciamento (Zhang *et al.*, 2017). Para a caracterização da microbiota bacteriana, trabalhos têm utilizado as regiões hipervariáveis V3-V4 (Wang *et al.*, 2009; Caporaso *et al.*, 2011; Bowman *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2014; Sinclari *et al.*, 2015; Cameron *et al.*, 2015; Hong *et al.*, 2015; Sinclair *et al.*, 2015 Kable *et al.*, 2016).

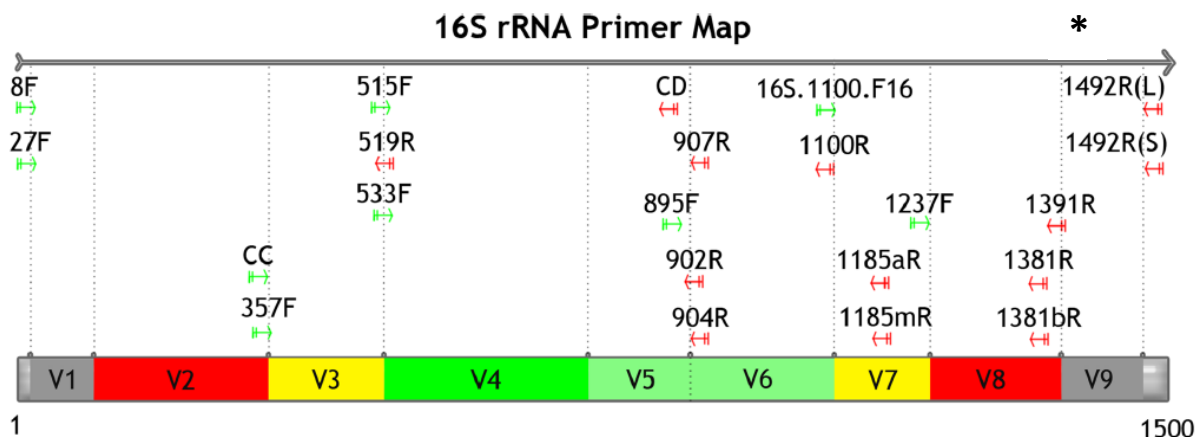


Figura 2. Mapeamento do gene rRNA16S e de suas regiões hipervariáveis.

(Regiões vermelhas (V2 e V8) – Baixa resolução filogenética ao nível de filo; Regiões verdes (V4, V5 e V6) – Associadas à menor distância geodésica, o que sugere ser a melhor escolha para análise de relação filogenética e filogenia.

*A figura está relacionada ao mapa de *primers* de Lutzonilab

Fonte: Adaptado de Yang *et al.* (2016)

3.5.2 Análise dos dados

Os principais dados analisados nesse tipo de teste estão relacionados à diversidade de microrganismos presente na matriz estudada e a diferença entre amostras. A alfa diversidade descreve as características individuais de cada amostra e relaciona-se às medidas de riqueza, diversidade e igualdade (Costa *et al.*, 2015). Já a beta diversidade diz respeito aos testes realizados que vão possibilitar a comparação entre amostras ou grupos de amostras (Costa *et al.*, 2015). As ferramentas de bioinformática e testes estatísticos permitem interpretar os dados obtidos da análise metagenômica do gene rRNA16S. A caracterização da microbiota é uma análise muito importante, pois é a primeira etapa para entender como funciona a complexa interação entre microrganismo e hospedeiro. Essa caracterização pode ser feita considerando diferentes níveis de classificação como: espécie, gênero, família e ordem (Barros, 2007). Segundo Oulas *et al.* (2015) é possível associar esta distribuição taxonômica com metadados referentes ao local no qual está sendo feito o estudo e observar fatores que podem ser determinantes para o aparecimento da dominância de algum grupo.

A alfa diversidade é um conceito utilizado para caracterizar amostras individuais, principalmente, quanto a sua diversidade (Highlander, 2012). A quantidade de gêneros de bactérias encontrada em uma análise é denominada riqueza (Peet 1974, Wilsey *et al.* 2005), e isso determina o *membership* dessa comunidade. Já a distribuição do número de microrganismos presentes em cada um dos gêneros identificados é denominada diversidade e isso caracteriza a *structure* da comunidade (Costa *et al.*, 2017). A forma mais direta de medir a diversidade de uma amostra é utilizando a riqueza (Melo, 2008). Se as amostras forem de tamanhos diferentes, pode-se realizar a rarefação dos dados a fim de padronizá-los para um tamanho de amostra padrão (Hurlbert 1971, Simberloff 1979, Gotelli & Colwell 2001). Uma forma de medir a riqueza por extrapolação é por meio do estimador Chao (Chao, 1984). Melo (2008) afirmou que além da riqueza, uma forma de medir a diversidade é utilizar os índices de diversidade, que são caracterizados como não paramétricos, pois não necessitam de um padrão de distribuição. Dois dos índices mais utilizados são o de Shannon e o de Simpson (Wolda

1983, Mendes *et al.* 2008). Outro conceito importante diz respeito à abundância de determinado gênero, ou seja, quanto maior o número de indivíduos presentes no gênero mais abundante ele é (Barros, 2007). Costa *et al.* (2017) utilizaram a pesquisa de raças de cavalos, em uma determinada área, para classificar os principais conceitos aplicados à ecologia microbiana (Figura 3). Pode-se observar que ao analisar apenas a comunidade de cavalos dentro do raio de 100 km a raça Thoroughbred é a mais abundante. No entanto, ao se analisar a comunidade presente em todo o estado, a raça Warmblood se torna a mais abundante.

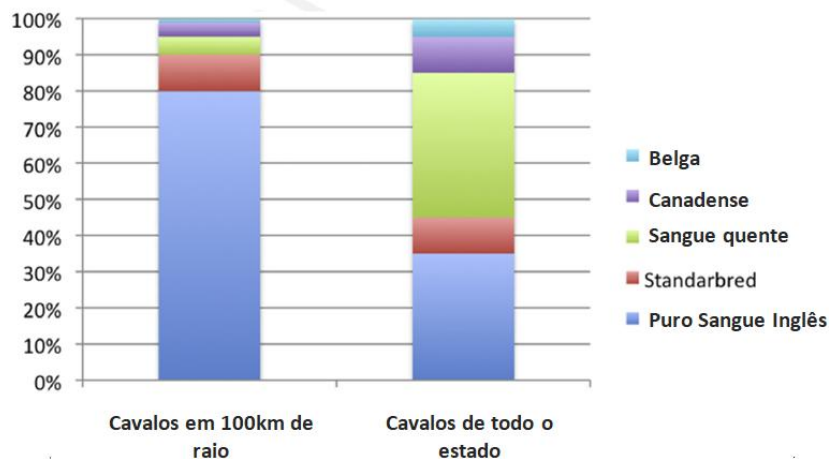


Figura 3. Distribuição da população de cavalos em duas comunidades diferentes.

* A riqueza entre as comunidades é a mesma (Número de raças encontradas). A diversidade das raças é diferente (Porcentagem de distribuição de cada raça dentro da comunidade avaliada).

Fonte: Adaptado de Costa *et al.* (2017)

A diversidade beta é determinada pelas diferenças (e similaridades) encontradas entre as comunidades analisadas (Costa *et al.*, 2017). A análise de Coordenada Principal (PCoA) é utilizada para caracterizar essa beta diversidade existente entre as comunidades. De forma geral, essa análise processa os autovalores que são extraídos de uma matriz de similaridade ou de distâncias (Manly, 1994; Jongman *et al.*, 1995). Essa análise pode ser utilizada mesmo quando as relações entre as variáveis não são lineares. Além disso, não é necessário usar as medidas originais e sim a matriz de similaridade que pode, até mesmo, utilizar uma escala qualitativa, desde que ela seja ordenada (Prado *et al.*, 2002).

Outra importante análise dos dados refere-se aos testes estatísticos AMOVA e Parsimônia. O teste Parsimônia é um método estatístico não paramétrico usado para estimar filogenias (Sober, 1983; Hall, 2014), ou seja, ele determina se existe diferença evolutiva entre as amostras analisadas, caracterizando assim, comunidades diferentes. O teste estatístico AMOVA consegue determinar se existe algum grau de diferenciação genética entre e dentro das amostras das populações.

Ao correlacionar os resultados dessas análises com os metadados coletados no local da amostragem, pode-se inferir possíveis interações, fatores de risco, condições ambientais, práticas, que podem interferir com a dinâmica da comunidade encontrada na matriz analisada (Oulas *et al.*, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização das propriedades

As propriedades estudadas estão situadas na microrregião de Sete Lagoas, localizadas entre as coordenadas geográficas; latitude: -19.248810; longitude: -44.003093 e latitude: -19.568201; longitude: -44.373608 (Figura 4). As fazendas localizam-se nos municípios de Sete Lagoas, Funilândia, Baldim, Jequitibá, Fortuna de Minas, Inhaúma, Santa de Pirapama e Cachoeira da Prata. Foram utilizadas 11 propriedades, identificadas como F1 a F11. Foi obtido junto a indústria de laticínios que capta leite destas propriedades, o registro dos últimos dois anos dos resultados de qualidade de leite das propriedades escolhidas (Anexo 2). Utilizou-se a estação de Sete lagoas como o ponto central para a caracterização do índice pluviométrico, e de acordo com os dados registrados no portal do INMET, foi possível verificar que não houve registro de precipitação na região durante os dois momentos de coleta.

Por meio da aplicação de um *checklist*, foi possível fazer a caracterização do manejo e do sistema de produção adotados nas propriedades (Anexo 1). Todas as propriedades realizavam ordenha mecânica, e apenas duas (F4 e F11) possuíam ordenha tipo canzil. A produção, do dia da coleta, no mês de maio, variou de 210 litros (F2) a 3.130 mil litros (F10). Enquanto que na segunda coleta, no mês de setembro, houve variação de 280 litros (F2) a 2.100 mil litros (F1). A propriedade F2 possuía o rebanho da raça Jersey, a propriedade F10 possuía animais ½ sangue holandês, e todas as outras propriedades eram compostas por rebanho mestiço. Nos períodos de coleta, tanto as vacas em lactação quanto as vacas secas, eram mantidas a pasto.

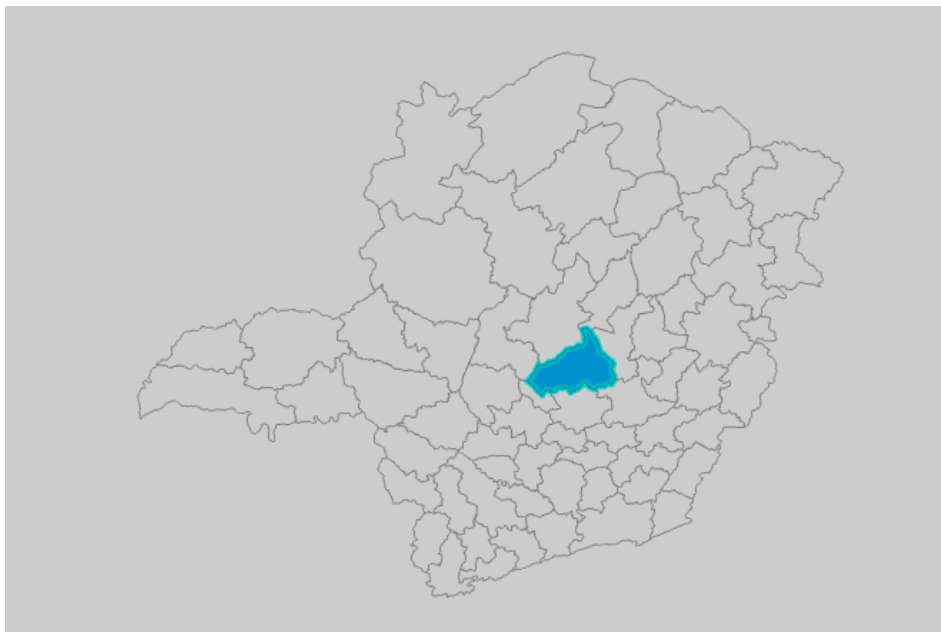


Figura 4. Mapa da localização da microrregião de Sete Lagoas no estado de Minas Gerais.

Fonte: Adaptado de IBGE (2011).

Em relação à realização do CMT, observou-se que este teste era realizado nas propriedades F2, F3 e F4 em amostras de leite individuais de vacas, sem uma frequência pré-estabelecida. Foi observado que metade das propriedades realizava análise individual de CCS de vacas pelo menos uma vez ao mês. Apenas a propriedade F11 faz uso de análise por WMT.

Os procedimentos de teste da caneca, *predipping* e *postdipping* eram realizados por todas as propriedades. Todas as propriedades, exceto a F8, utilizavam em média duas folhas de papel toalha por vaca. Foi observado que na propriedade F8 utilizava-se jornal picado como substituto para papel toalha. O uso de luvas, durante a ordenha, foi observado nas propriedades F4, F5, F6 e F10. Todas as propriedades realizavam os seguintes procedimentos operacionais padrão para limpeza da ordenha e do tanque de refrigeração: lavagem inicial apenas com água a temperatura ambiente, lavagem com água em temperatura de 70 a 80 °C com detergente alcalino clorado, enxágue, lavagem com detergente ácido com água em temperatura ambiente (frequência estabelecida de acordo com cada propriedade), lavagem dos conjuntos com detergente neutro. Para a lavagem do tanque, os detergentes eram utilizados com a ajuda de uma escova própria para tanque.

No caso de animais identificados com mastite, foi observado, em todas as propriedades, que eles eram ordenhados por último, e a propriedade F2 possuía um conjunto extra para ordenhar esses animais ou ordenhavam na mão. Apenas a propriedade F2 não realizava o tratamento imediato dos casos de mastite. Todas as propriedades, exceto a F4, seguiam as recomendações dos fabricantes e cumpriam o período de carência. Foi observado que a propriedade F4 não respeitava o período de carência dos produtos utilizados para tratamento de mastite. Mais de 50% das propriedades forneciam o leite de descarte com antimicrobiano para as bezerras, mas não foi observada a venda desse leite para laticínio ou queijaria. Nenhuma propriedade realizava testes para resíduos de antimicrobianos no leite antes de enviar para o laticínio. No ano de 2017, a propriedade F1 teve duas ocorrências de presença de antimicrobiano no leite, enquanto as propriedades F3, F4 e F9 tiveram uma ocorrência.

Observou-se que todas as propriedades respeitavam o tempo médio de 60 dias para o período seco e realizavam terapia de vaca seca. Na propriedade F8 fazia-se uma segunda aplicação no meio do período seco de algumas vacas, de acordo com o medicamento utilizado.

4.2 Obtenção das amostras de leite e água

Foram coletadas amostras de leite e de água de cada propriedade visitada (11 propriedades). As coletas foram realizadas em dois momentos, nos meses de maio e de setembro de 2017. A amostra colhida de leite cru era proveniente do tanque de expansão e a de água era obtida de torneira presente na sala do tanque. Elas foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e encaminhadas para cada laboratório de acordo com o tipo de análise determinada.

Antes da coleta das amostras de água, as torneiras eram higienizadas com álcool 70% e flambadas. Após esse procedimento, a água permaneceu corrente por um tempo antes da coleta. Foram coletados 110 mL para cada amostra de cada propriedade para a análise microbiológica. Após a coleta, acondicionaram-se as amostras em caixas isotérmicas com gelo reciclável, para a manutenção da temperatura de refrigeração. Além disso, coletou-se 1 litro de água da torneira da sala do tanque de cada propriedade visitada para a análise físico-química. As amostras foram identificadas e mantidas sob refrigeração em caixa isotérmica com gelo reciclável até serem entregues no laboratório responsável.

As amostras de leite cru refrigerado foram coletadas utilizando concha desinfetada com álcool 70% e flambada. O tanque permaneceu sob agitação por dez minutos antes da coleta. No momento da coleta, o leite cru no tanque estava em temperatura menor que 4 °C. As amostras foram coletadas em frascos estéreis com ou sem conservante, de acordo com o tipo de análise a ser realizada. Após a coleta, as amostras foram identificadas e acondicionadas em caixa isotérmica com gelo reciclável para a manutenção da temperatura de refrigeração até o envio ao laboratório responsável. As amostras armazenadas em potes estéreis sem conservantes, foram mantidas em temperatura de refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos/FUNED para realizar análise de psicotróficos (APHA, 2001), realizada no mesmo dia da coleta.

Foram coletadas uma amostra de água e uma de leite destinadas à análise de microbioma de cada propriedade ($2 \times 11 = 22$), em dois momentos distintos ($22 \times 2 = 44$), totalizando 44 amostras analisadas. Os frascos para coleta foram disponibilizados pelo laboratório Neopropecta. Após a coleta

das amostras, em frascos identificados e sem conservante, elas foram mantidas em temperatura de refrigeração utilizando, para isso, gelo reciclável, acondicionadas em caixas isotérmicas. Devido à logística de envio, essas amostras foram congeladas em gelo seco e enviadas via sedex 10 ao laboratório Neoprospecta/Santa Catarina, no mesmo dia da coleta. O processamento das amostras foi realizado no primeiro dia após o recebimento pelo laboratório.

As análises microbiológicas e físico-químicas da água foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos/FUNED e no Laboratório de Análises físico-químicas de Água/FUNED e da UFMG, de acordo com os padrões estabelecidos pela Portaria nº 2.914 de dezembro de 2011. O processamento analítico das amostras de água se deu no mesmo dia da coleta.

As amostras de leite cru foram encaminhadas aos laboratórios responsáveis pela realização dos exames microbiológicos. O Laboratório de Microbiologia de Alimentos/FUNED recebeu amostras de leite cru refrigeradas para a realização da análise de psicrotóxicos (APHA, 2001). O Laboratório Veterinário Vida Vet/ Botucatu – SP recebeu as amostras de leite cru de tanque de refrigeração para a identificação de bactérias causadoras de mastite.

As 44 amostras de leite cru e de água destinadas a análise de microbioma (22 amostras por período de coleta) foram identificadas, congeladas em gelo seco e enviadas no mesmo dia da coleta, via Sedex 10, ao Laboratório Neoprospecta/Santa Catarina.

4.3 Análises do leite

4.3.1 Análise de composição, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total do leite

As análises de composição, CCS E CBT do leite foram realizadas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG (LabUFMG). Para a análise de CCS e composição química, as amostras foram acondicionadas em frascos contendo bronopol e analisadas em equipamento eletrônico CombiScope FTIR (Delta Instruments, Drachten, Holanda, 2008) pelo princípio da citometria de fluxo (IDF, 2000) e Espectrometria de Absorção no Infravermelho Médio (EIVM) com Transformada de Fourier (IDF, 1995), respectivamente. As análises de contagem bacteriana total foram realizadas pelo princípio de citometria de fluxo (ISO, 2004) em equipamento automatizado BactoScan FC (FOSS, Hillerod, Dinamarca, 2001).

4.3.2 Análise microbiológica do leite cru

Devido a logística de entrega ao Laboratório Veterinário Vida Vet/ Botucatu – SP, as amostras de leite destinadas a ele foram congeladas com gelo seco e enviadas via sedex. O processamento das amostras foi feito dois dias após o envio. Realizaram-se pesquisa e isolamento de *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, coliformes, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* não *aureus*, *Streptococcus* não *agalactiae*, *Bacillus cereus* (Bauer *et al.*, 1966; IDF, 1981; Holt, 1994; Euzéby, 1997; NCCLS, 2000; APHA, 2001; Garrity e Holt, 2001; Hogan *et al.*, 2005; CLSI, 2008).

4.4 Análises da água

As análises físico-químicas e microbiológicas da água foram realizadas de acordo com os padrões de potabilidade estabelecidos pela Portaria nº 2.914/2011. Dentre as referências de metodologia indicadas nessa Portaria, escolheu-se o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edição (APHA, 2012).

4.4.1 Análise microbiológica da água

A análise se deu no mesmo dia da coleta para os seguintes parâmetros: bactérias heterotróficas mesófilas aeróbias, coliformes totais e *Escherichia coli* (APHA, 2012).

Na análise para bactérias heterotróficas, utilizou-se a metodologia Pour-Plate (APHA, 2012). Foi realizada diluição em série e as amostras foram incubadas a 35 °C por 48 h. Foram selecionadas placas que possuíam o número de colônias entre 30 a 300. Após a contagem, o resultado foi expresso em UFC/mL (APHA, 2012). Para a determinação de coliformes totais e de *E. coli*, utilizou-se a metodologia do substrato cromogênico/enzimático (APHA, 2012). Este teste detecta enzimas do grupo coliforme por meio de substratos cromogênicos hidrolisáveis. Coliformes totais produzem uma enzima capaz de mudar a coloração do substrato no qual se encontra. Enquanto isso, *E. coli* produz um substrato fluorescente que é visível na luz ultravioleta. Utilizando luz ultravioleta, a quantidade de poços com fluorescência foi identificada e contabilizada. Por meio de uma tabela, foi feita a conversão em Número Mais Provável (NMP/100 mL).

4.4.2 Análise físico-química da água

A análise físico-química da água incluiu os seguintes parâmetros físico-químicos; sólidos totais, pH, turbidez e dureza. Para a determinação dos sólidos totais utilizou-se a metodologia da estimativa pela condutividade (APHA, 2012). O pH foi determinado pelo método eletrométrico, utilizando um peagâmetro. O eletrodo do peagâmetro era mergulhado na amostra e a leitura do pH era realizada (APHA, 2012).

A turbidez, definida pelo método nefelométrico, foi realizada por meio de um turbidímetro. Nesse método, o nefelômetro possui uma fonte de luz que ilumina a amostra, e um detector fotoeletétrico com um dispositivo que indica a intensidade da luz espalhada em ângulo reto ao caminho da luz incidente. Quanto maior o espalhamento, maior é a leitura da turbidez da amostra (APHA, 2012).

A análise de dureza total foi realizada utilizando o método titulométrico EDTA (APHA, 2012.). Esse método baseia-se na reação do ácido etilendiaminatetracético (EDTA) ou sais de sódio, que formam complexos solúveis. Essa reação necessita de um indicador de cor para sinalizar sua finalização. A dureza total é determinada pela presença de cálcio e magnésio em conjunto (APHA, 2012).

4.5 Análise de Microbioma

4.5.1. Extração do DNA

Para a análise de leite, antes da extração do DNA foi realizado um pré-enriquecimento do meio. Utilizou-se um saco estéril para homogeneizar uma alíquota de 25 mL da amostra com 225 mL do diluente e, posteriormente, foi feita a adição ao meio enriquecido. Para a extração do DNA das amostras de leite enriquecido e de água, utilizou-se a técnica de *beads* magnéticos, com um protocolo da Neopropecta Microbiome Technologies (Arquivo interno).

4.5.2. PCR, cDNA e Sequenciamento do rRNA 16S

O gene da subunidade menor do rRNA bacteriano (rDNA 16S) foi utilizado para a determinação do microbioma nas amostras coletadas utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3-V4. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neoprosecta Microbiome Technologies – Arquivo interno), no qual resumidamente a amplificação do DNA por PCR foi realizada em duas etapas. Utilizaram-se os *primers* 314F (CCTACGGGRSGCAGCAG) (Wang *et al.*, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (Caporaso *et al.*, 2012) da região V3-V4 do gene 16S.

As reações de PCR foram realizadas em triplicata usando a enzima Platinum® Taq DNA (Invitrogen USA). A primeira PCR foi realizada nas condições de 95°C por cinco minutos, 25 ciclos em 95°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos e uma extensão final de 72°C por dois minutos. Na segunda reação de PCR, as condições foram de 95°C por cinco minutos, 10 ciclos de 95°C por 45 segundos, 66°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos e uma extensão final de 72°C por dois minutos.

O produto da reação final de PCR foi purificado utilizando o AMPureXP *beads* (Beckman Coulter, Brea, CA). As amostras foram colocadas em *pools* nas bibliotecas de sequenciamento para quantificação. A estimativa de *amplicons* foi determinada utilizando o corante ultrasensível Picogreen® dsDNA (Invitrogen, USA). Após, a biblioteca foi sequenciada no equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) usando o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento *single-end*. para a plataforma Illumina. A biblioteca foi sequenciada no sistema MiSeq usando os *primers* Illumina padrões do kit (Neoprosecta Microbiome Technologies – Arquivo interno).

4.5.3 Processamento Bioinformático das sequências obtidas

O “*raw file*” obtido do sequenciamento da biblioteca foi analisado no programa Mothur (version 1.31.2) (Schloss *et al.*, 2009), utilizando a plataforma MiSeq (Kozich *et al.*, 2013). As sequências foram alinhadas de acordo com o banco de dados SILVA (Quast *et al.*, 2013). As quimeras foram identificadas e removidas utilizando *Uchime* (Edgar *et al.*, 2011) e as sequências restantes foram padronizadas em UTO (Unidades Taxonômica Operacional) utilizando um *cutoff* de 4526 leituras por amostras, o que gerou um *bootstrap* de mais de 98% em todas as amostras selecionadas. A classificação taxonômica foi obtida do *Ribosomal Database Project* (Cole *et al.*, 2014).

Para análise da beta diversidade, realizou-se a Análise de Coordenadas Principais (PCoA) para comparar amostras e com isso determinar a diferença ou a similaridade relativa entre os grupos pertencentes a elas. A diferença encontrada entre os grupos foi avaliada de acordo com a Análise de Variância Molecular (AMOVA). Utilizou-se o teste LEfse para determinar quais bactérias eram estatisticamente diferentes entre os grupos analisados. A abundância relativa de filo e gênero (amostras com abundância acima de 1%) foi representada por gráficos de barra. Realizou-se o teste de Parsinomia para identificar se existe diferença evolutiva entre as amostras analisadas, caracterizando assim, comunidades diferentes. Os dados utilizados nesse teste são usados para fazer dendogramas que vão demonstrar a distância evolutiva entre as amostras. Para a alfa diversidade foram realizados os testes Chao, Shannon e Simpson e aplicado o teste estatístico t de student para comparação das médias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Qualidade do leite: composição, CCS, CBT e resíduos de antimicrobianos

Os resultados dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, sólidos desengordurados e a pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite cru refrigerado estão dentro do exigido pela legislação (Brasil, 2011 e Brasil, 2017), conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Médias dos valores dos parâmetros de qualidade do leite cru refrigerado de 11 propriedades da microrregião de Sete Lagoas (MG)

Propriedades	Gordura (g/100g)	Proteína (g/100g)	Lactose (g/100g)	Sólidos Totais (g/100g)	Sólidos Desengordurados (g/100g)	Resíduos de antimicrobianos
F1	3,4	3,3	4,6	12,3	8,9	Negativo
F2	4,4	3,5	4,6	13,5	9,2	Negativo
F3	3,8	3,3	4,7	12,7	8,9	Negativo
F4	4,1	3,4	4,4	12,8	8,8	Negativo
F5	4,4	3,6	4,5	13,5	9,1	Negativo
F6	3,2	3,2	4,4	11,8	8,6	Negativo
F7	4,1	3,5	4,4	13,0	8,9	Negativo
F8	4,1	3,2	4,6	12,8	8,8	Negativo
F9	3,7	3,2	4,5	12,4	8,7	Negativo
F10	3,9	3,2	4,6	12,6	8,8	Negativo
F11	3,7	3,1	4,5	12,2	8,5	Negativo

Para os padrões de CCS e de CBT, a Instrução Normativa nº 7 de 2016 (Brasil, 2016) determina que em 01/07/2018 novos valores de limites máximos para esses padrões serão estabelecidos para as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste (Quadro 2). De acordo com esse novo padrão a ser instalado, 63% das propriedades não estariam abaixo do valor máximo determinado para CCS (Tabela 2).

Quadro 2. Valores máximos aceitos para CCS e CBT vigentes e novos valores a entrarem em vigor

Índice medido (por propriedade rural ou por tanque comunitário)	A partir de 01/07/2014 até 30/06/2018 Regiões: S/SE/CO	A partir de 01/07/2018 Regiões: S/SE/CO
Contagem Padrão em Placas (CPP), expressa em UFC/ml (mínimo de 1 análise mensal, com média geométrica sobre período de 3 meses)	Máximo de $3,0 \times 10^5$	Máximo de $1,0 \times 10^5$
Contagem de Células Somáticas (CCS), expressa em CS/ml (mínimo de 1 análise mensal, com média geométrica sobre período de 3 meses)	Máximo de $5,0 \times 10^5$	Máximo de $4,0 \times 10^5$

Fonte: Brasil (2016)

Tabela 2. Resultados (Média \pm s) de CCS e de CBT do leite de tanque refrigeradores das propriedades analisadas em dois momentos

Propriedade	Média \pm s CCS (cels/mL x 1000)	Média \pm s CBT (UFC/mL x 1000)
F1	562 \pm 1,6	79 \pm 1
F2	126 \pm 1,0	1,5 \pm 0,5
F3	316 \pm 1,4	5 \pm 3,67
F4	631 \pm 1,9	16 \pm 1
F5	1995 \pm 9,8	13 \pm 1,38
F6	398 \pm 2,7	5 \pm 1,91
F7	1259 \pm 1,4	6 \pm 2,25
F8	447 \pm 1,6	14 \pm 1,17
F9	562 \pm 1,6	4 \pm 1,62
F10	631 \pm 1,9	16 \pm 2,65
F11	398 \pm 1,4	7 \pm 1,62

*CCS: Contagem de células somáticas; CBT: Contagem bacteriana total

O laticínio responsável pela coleta e análise da qualidade do leite das 11 propriedades avaliadas forneceu o histórico da qualidade dos dois últimos anos (Anexo 2). As propriedades foram divididas, por produção, em três grupos, para melhor visualização da dinâmica dos valores de CBT e de CCS ao longo de dois anos. O grupo 1 era composto por propriedades de produção de até 15.000 litros/mês (F2, F4 e F11); o grupo 2, por propriedades com até 40.000 litros de leite/mês (F1, F3, F6 e F9); e o grupo 3 com propriedades de produção leiteira acima de 50.000 litros de leite/mês (F5, F7, F8, F10). Os dados analisados de CCS e de CBT são referentes aos últimos dois anos e foi calculada a média de cada grupo por mês (Figura 5 e 6).

Observa-se que os valores de CBT já estão bem abaixo dos limites que entrarão em vigor em 2018. Isso demonstra que as práticas de limpeza e higiene são bem conhecidas nas propriedades. Porém ao analisarmos a variação da CBT ao longo do tempo de dois anos, é possível perceber que os valores de CBT têm picos, demonstrando que as práticas de higiene não estão padronizadas e/ou bem estabelecidas (Figura 5). As propriedades agrupadas por produção no grupo 1 são as que demonstram, em média, ter maior quantidade de picos de variação dos valores de CBT. Já no gráfico de CCS (Figura 6), pode-se observar que seus valores, em todos os grupos, se mantêm dentro de uma faixa que não se altera ao longo do tempo. Como observada na análise de metagenômica, a microbiota presente foi semelhante nos dois tempos de coleta ($p > 0,05$), e, não houve influência de algum grupo de bactérias sobre os valores de CCS. Apesar de haver trabalhos que correlacionam a presença de alguns microrganismos com a elevada CCS, essa comparação se dá entre animais e não entre propriedades, como foi realizado nesse trabalho.

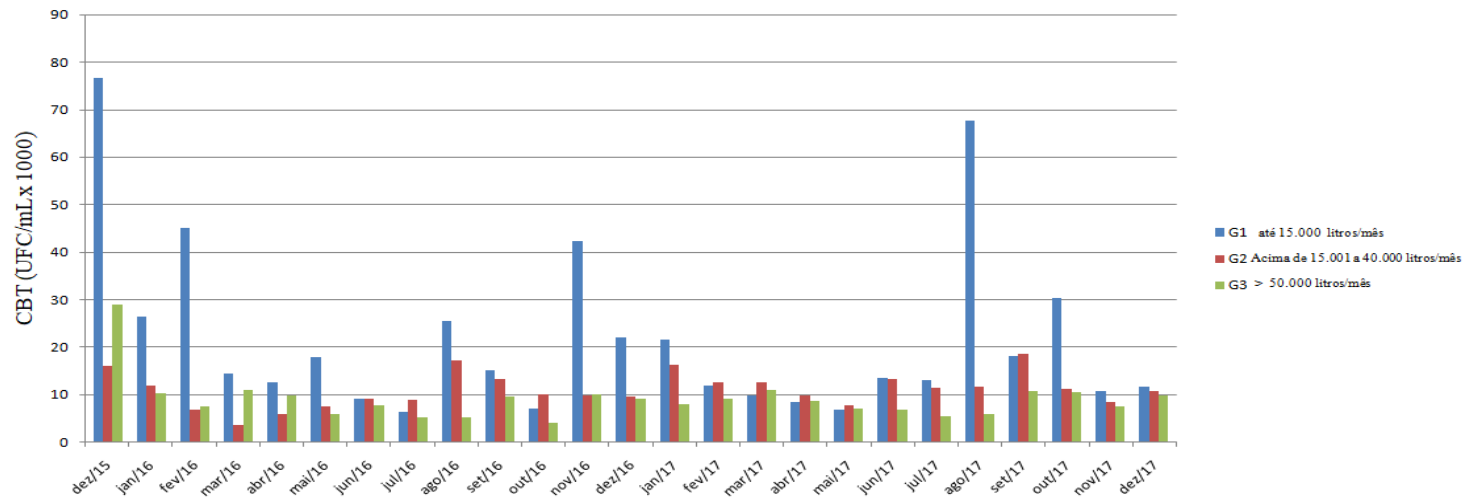


Figura 5. Variação da CBT do leite de tanques refrigeradores de propriedades agrupadas segundo a produção de leite cru refrigerado ao longo de dois anos.

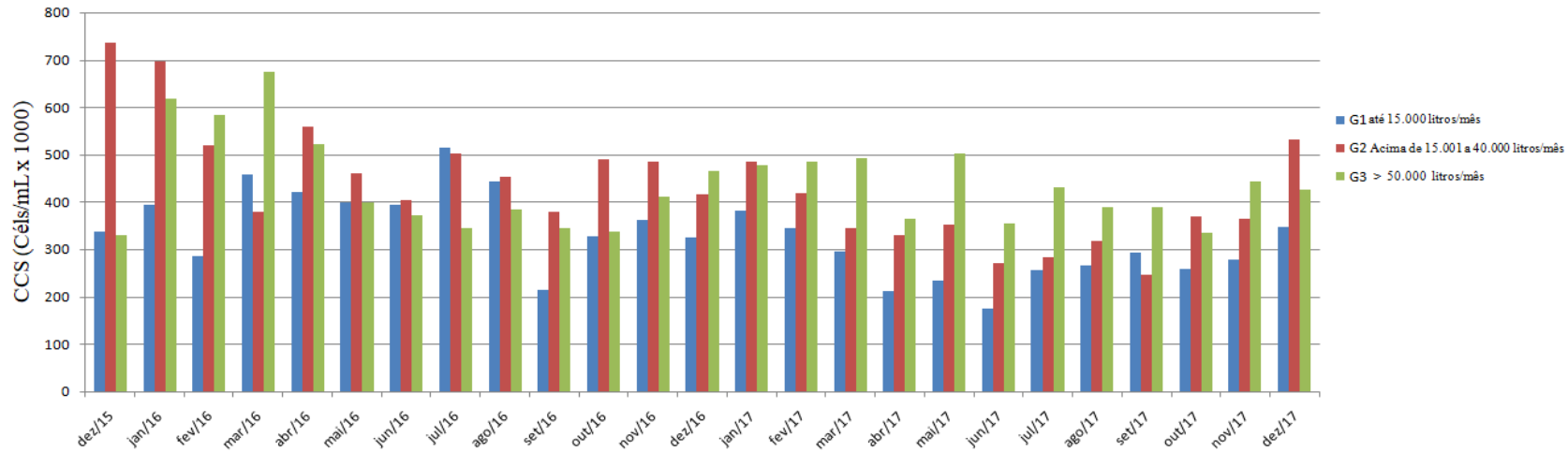


Figura 6. Variação da CCS do leite de tanques refrigeradores de propriedades agrupadas de acordo com a produção de leite ao longo de dois anos.

5.1.1 Fatores de risco associados à qualidade do leite cru de tanque refrigerador

As práticas de manejo adotadas nas propriedades podem influenciar a qualidade do leite (Bava *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2011; Azevedo *et al.*, 2016; Costa, Rajala-Schultz, e Schuenemann, 2016). Souza *et al.* (2005) avaliaram a qualidade do leite do tanque de 175 rebanhos e utilizaram um *cutoff* de 500.000 cels/mL. Observou-se que o tipo ou local da ordenha, a realização da retirada dos primeiros jatos do leite antes da ordenha e a idade média dos rebanhos avaliados não estavam associados à alta CCS no leite do tanque. Porém, a não adoção da linha de ordenha, o fornecimento de alimento durante a ordenha e a não realização de *postdipping* foram associados a altas contagem de células somáticas no leite de tanques refrigeradores. Dufour *et al.* (2011) observaram, dentre outras práticas, que a utilização de luvas durante a ordenha, ordenhas com extratores automáticos, realização de linha de ordenha, inspeção do sistema de ordenha antes de começar e a manutenção das vacas em pé após a ordenha estavam associadas com úberes saudáveis, ou seja, com baixas CCS. Cunha *et al.* (2015), ao avaliarem os fatores de risco associados à qualidade do leite de propriedades na região de Viçosa/MG, encontraram que o fornecimento de leite de descarte para bezerras, falhas nos procedimentos de ordenha, falha no tratamento de vaca seca, má conservação do ambiente das vacas e má qualidade da água apresentaram associação significativa ($p \leq 0,05$) com a prevalência de mastite subclínica. Emanuelson e Nielsen (2017) descreveram que o não fornecimento de mineral apropriado para vacas secas e a não realização de *postdipping* são práticas significativamente associadas com o risco do aumento da CCS do leite do tanque. Cicconi-Hogan *et al.* (2013) avaliaram a diferença entre dois tipos de rebanhos (orgânico de pastoreiro e convencional) e encontraram diferença nos valores de CCS transformados em Log_{10} (LCCS). Sem considerar o tipo de rebanho estudado, os autores encontraram que rebanhos alimentados mais vezes ao dia com grãos estavam negativamente associados com o valor de LCCS. Por outro lado, a presença de *Staphylococcus aureus* e o tempo a frente da propriedade leiteira foram positivamente associados aos valores de LCC. Considerando apenas o rebanho orgânico de pastoreiro, foi possível observar uma tendência de variação do valor de LCCS de acordo com a estação do ano, aumento no verão e diminuindo no inverno. Kelly *et al.* (2009) avaliaram práticas de manejo realizadas em rebanhos na Irlanda e as associaram aos valores de CBT encontrados no leite de tanque. Observaram que a água quente utilizada durante os procedimentos de limpeza da ordenha, o corte de pelos da cauda (pelo menos uma vez ao ano) e a limpeza frequente da sala de ordenha foram as práticas de manejo que apresentaram alta associação com baixos valores de CBT no leite de tanques refrigeradores.

Observa-se, segundo a Tabela 3 e apenas por análise estatística descritiva, que fazendas com menor número de vacas em lactação, rebanhos fechados à compra de animais, utilização de conjunto extra/ordenha manual de vacas com mastite durante a ordenha parecem estar associadas a menores valores de CCS e de CBT quando comparadas a fazendas que não realizam essas práticas. Propriedades que destinam o leite de descarte para o consumo de bezerras tendem a ter valores de CCS e de CBT maiores do que propriedades que não realizam essa prática. Fazendas que não utilizam papel toalha durante a rotina de ordenha, que possuem ordenha mecânica tipo canzil, tendem a ter maior CBT quando comparada a fazendas que utilizam papel toalha.

Dessa forma, percebe-se que algumas práticas de manejo identificadas pela aplicação do checklist (Anexo 1), estão associadas à produção de leite com melhor qualidade.

Tabela 3. Características de produção e práticas de manejo de 11 fazendas leiteiras associadas aos valores de CCS e de CBT

Características de produção e manejo	Resultados da adoção ou não das práticas								
			CCS (log cels/mL x 1000)		CBT (log UFC/mL x 1000)				
	Sim (%)	Não (%)	Sim	Não	Sim	Não			
Número de vacas em lactação									
Baixo (1 - 35)			5,5		3,23				
Médio (36 - 90)			5,78		4,01				
Alto (> 90)			5,85		4,03				
Raça predominante									
Mestiça	72,8	27,2	5,71	5,73	3,98	3,31			
½ Sangue	81,8	18,2	6,05	5,65	4,15	3,72			
Jersey	9,09	90,91	5,1	5,72	1,65	3,80			
Produção média (mensal)									
Até 15.000 litros	27,2	72,8	5,5	5,80	3,23	4,01			
De 15 - 49.000 litros	27,3	72,8	5,61	5,76	3,68	3,86			
Acima de 50.000 litros	45,5	54,5	5,92	5,56	4,22	3,46			
Tipo de rebanho									
Aberto	42,8	57,2	5,88	5,5	4,28	3,35			
Fechado	57,2	42,8	5,5	5,88	3,35	4,28			
Tipo de ordenha mecânica									
Espinha de peixe	81,8	18,2	5,75	5,6	3,81	5,75			
Canzil	18,2	81,8	5,6	5,71	5,75	3,81			
Realização de teste CMT									
	30	70	5,46	5,82	3,18	4,09			
Realização de análise de CCS individual									
	60	40	5,86	5,5	4,13	3,35			
Rotina de ordenha									
Teste da caneca	100	0	5,72	-	3,80	-			
<i>Predipping</i>	100	0	5,72	-	3,80	-			
<i>Postdipping</i>	100	0	5,72	-	3,80	-			
Papel Toalha	90,9	9,1	5,73	5,65	3,77	4,15			
Utiliza pano	0	100	-	5,72	-	3,80			
Uso de Luvas	40	60	5,88	5,61	4,05	3,66			
Fornece alimento durante a ordenha									
	70	30	5,75	5,63	4,10	3,15			
Faz linha de ordenha para animais positivos para mastite									
				100	0	5,72	-	3,82	-

Tabela 3. Características de produção e práticas de manejo de 11 fazendas leiteiras associadas aos valores de CCS e de CBT (cont...)

Características de produção e manejo	Resultados da adoção ou não das práticas					
			CCS (log cels/mL x 1000)		CBT (log UFC/mL x 1000)	
	Sim (%)	Não (%)	Sim	Não	Sim	Não
Possui conjunto extra/ordenha manual de animais positivos para mastite	10	90	5,1	5,78	1,65	4,06
Identificação do animal com mastite	90	10	5,74	5,5	3,83	3,7
Realiza tratamento imediato da mastite	90	10	5,74	5,5	3,83	3,7
Realiza anotação dos casos novos de mastite	40	60	5,83	5,65	4,25	3,53
Anotação sobre mastite						
Duração do caso de mastite	20	80	5,95	5,66	3,97	3,78
Qual medicamento utilizou no tratamento de mastite	30	70	5,85	5,66	4,03	3,72
Duração do tratamento	20	80	5,95	5,66	3,98	3,78
Realiza cultura microbiológica	0	100	-	5,72	-	3,82
Possui protocolo para tratamento de mastite	90	10	5,72	5,75	3,7	4,9
Segue indicação do fabricante para uso do medicamento para mastite	100	0	5,72	-	3,82	-
Respeita o período de carência indicado no produto	90	10	5,71	5,8	3,78	4,2
Descarte do leite com antimicrobiano						
Bezerras	80	20	5,79	5,45	4,04	2,92
Outros animais	88,8	11,2	5,74	5,5	3,83	3,7
Vende leite com antimicrobiano						
Para laticínios	0	100	-	5,72	-	3,82
Para outros	0	100	-	5,72	-	3,82
Período seco ± 60 dias	100	0	5,72	-	3,82	-

5.2 Isolamento de patógenos no leite cru de tanque refrigerador

Altos valores de CCS podem ser associados às características intrínsecas da vaca, como idade, período de lactação, às condições do meio ambiente e, principalmente, devido à presença de inflamação na glândula mamária causada por microrganismos causadores de mastite (Magalhães *et al.*, 2006; Demme e Abegaz, 2015; Rashad *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). O valor alto de CCS, observado no leite das propriedades, em conjunto com a presença de microrganismos causadores de mastite, é indicativo de que existe uma relação entre eles (Harmon, 1994; Cassoli e Machado, 2007). Os patógenos causadores de mastite são divididos, principalmente, em dois grandes grupos, os patógenos maiores ou principais (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* e outros *Streptococcus* spp.) e os patógenos menores ou secundários (*Staphylococcus* não *aureus*, *Corynebacterium bovis*, grupo Coliformes) (Myllys *et al.*, 1994; Brito e Brito, 1998; Lamarche *et al.*, 2000).

Neste trabalho foram isolados *Staphylococcus aureus*, bactérias do grupo coliformes, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. *Staphylococcus* não *aureus*, *Streptococcus* não *agalactiae*, *Bacillus* spp., psicrotróficos (Tabela 4). A partir dos dados gerados, foi realizada a análise de correlação multivariada (Figura 7). Apesar de não haver diferença estatística ($p > 0,05$), pode-se observar uma tendência de aglomeração dos pontos positivos para os microrganismos *Klebsiella* spp., do grupo coliformes, *S. aureus*, *Streptococcus* não *agalactiae* com os pontos de valores altos para CCS e para CBT, no primeiro tempo de coleta. Isso corrobora com os achados em outros estudos que descrevem uma correlação entre valor alto de CCS e presença de microrganismos causadores de mastite (Arcuri *et al.*, 2006; Liro *et al.*, 2011). O conhecimento a respeito da prevalência e da distribuição dos microrganismos causadores de mastite é importante para que medidas de ação relativas ao controle e monitoramento de mastite sejam tomadas (Piessens *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016; Ruegg, 2017).

Já para os pontos da segunda coleta e pontos de valores mais baixos de CCS e CBT, além de não haver diferença estatística ($P > 0,05$), não foi possível observar tendência de aglomeração entre os valores de CCS e CBT, e a ausência dos microrganismos isolados.

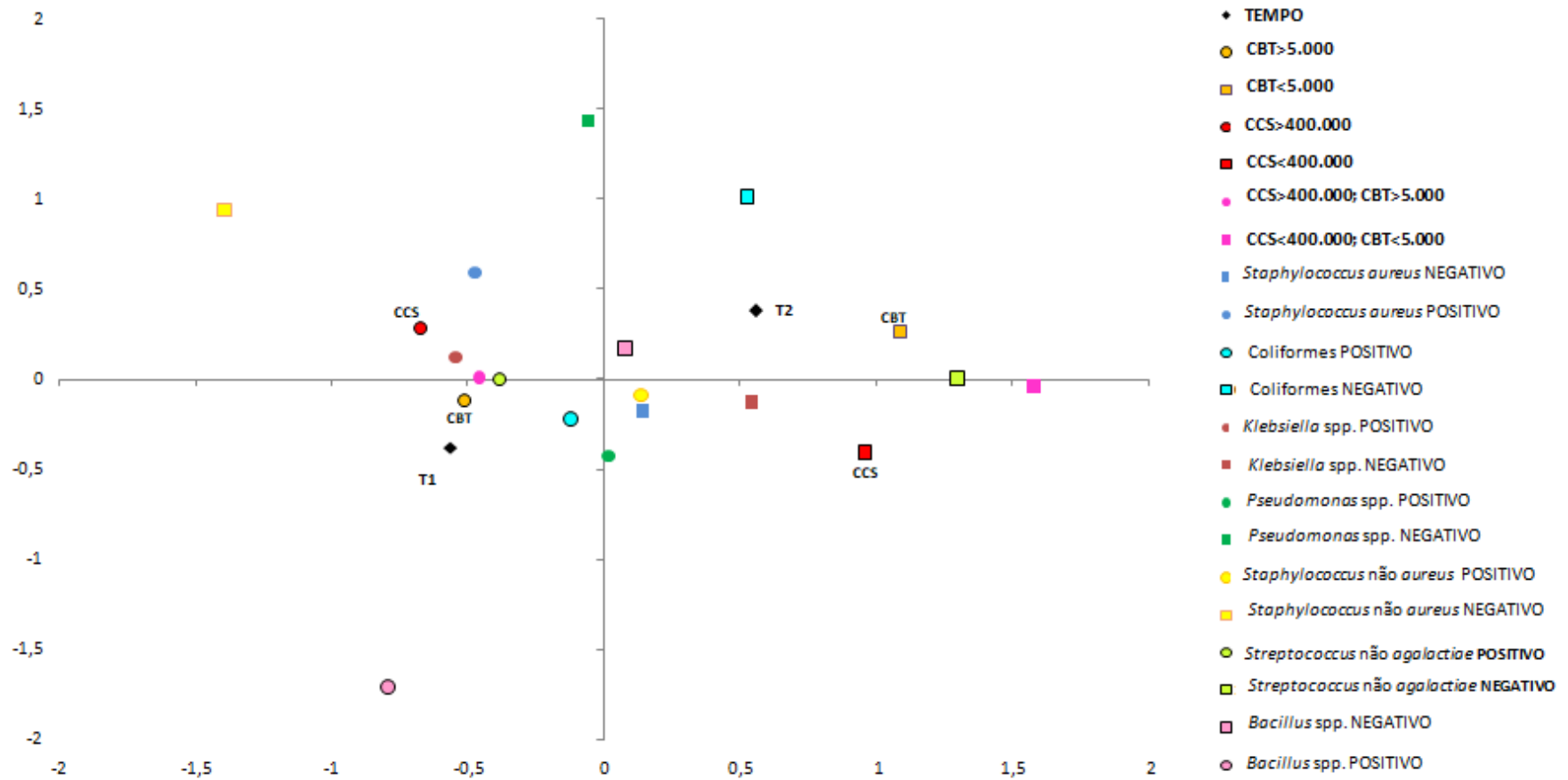


Figura 7. Dispersão da presença/ausência dos microrganismos isolados de leite de tanques refrigeradores em relação à CCS, CBT e ao tempo de coleta.

Valores de corte para CCS e CBT (*)

(*) CCS > 400.000, CBT > 5.000; CCS < 400.000, CBT < 5.000 (cels/ml e UFC/mL, respectivamente)

Tabela 4. Valores de CCS (cél/mL x 1000), CBT (UFC/mL x 1000), identificação e contagem dos microrganismos de leite de tanques refrigeradores em cada propriedade, em dois momentos de coleta

Tempo de coleta	Propriedade	CBT (UFC/mL x 1000)	CCS (cels/ml x 1000)	Psicrotróficos (UFC/mL)	Patógenos isolados (UFC/mL x 1000)							
					<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Coliformes	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Staphylococcus não aureus</i>	<i>Streptococcus não agalactiae</i>	<i>Bacillus</i> spp.
1	F1	75	799	6.000	0	0	1380	150	450	300	300	0
	F2	2	122	< 10	0	0	60	0	30	360	0	0
	F3	14	385	< 10	0	0	30	0	90	330	30	0
	F4	16	963	5.700	0	0	300	1500	2400	450	600	0
	F5	15	1048	230	0	0	90	0	180	3000	1500	0
	F6	8	752	1.450	0	0	120	0	0	6000	60	0
	F7	9	1624	< 10	0	1000	0	0	120	200	750	0
	F8	17	563	< 10	0	400	300	450	300	200	450	600
	F9	6	810	3.700	0	240	180	180	0	0	180	0
	F10	34	1051	13.400	0	0	750	750	450	30	450	0
	F11	9	353	25.000	0	0	180	0	90	150	360	450
2	F1	84	414	409.000	0	0	300	50	1250	150	900	0
	F2	0	133	< 10	0	350	50	0	100	100	50	0
	F3	2	241	100	0	0	0	0	0	100	0	0
	F4	16	445	277.000	0	0	1200	150	1350	450	200	0
	F5	10	436	< 10	0	0	0	0	0	150	250	0
	F6	3	193	< 10	0	0	50	0	50	1500	300	0
	F7	3	930	< 10	0	150	50	100	0	300	600	0
	F8	13	325	56.000	0	0	0	150	1500	250	0	0
	F9	3	372	< 10	0	0	50	0	50	300	0	0
	F10	8	372	7.700	0	0	600	300	90	300	0	0
	F11	5	469	23.000	0	0	400	350	1050	350	1250	0

Staphylococcus aureus foi isolado, na primeira coleta, no leite das propriedades F7, F8 e F9 e na segunda coleta nas propriedades F2 e F7. A contagem de unidades formadoras para cada propriedade está apresentada na tabela 6. A prevalência encontrada na primeira coleta foi de 27,2% e na segunda 18,2%, o que é abaixo do relatado por Olde Riekerink *et al.* (2010) que coletaram quatro amostras de leite de tanque de 226 rebanhos, no Canadá, durante dois anos e encontraram 40% (363) das 904 amostras positivas para *S. aureus*. Dos 226 rebanhos analisados, pelo menos 162 (72%) obtiveram um resultado positivo para *S. aureus*. Dois trabalhos realizados em 2016, em diferentes locais, encontraram valores próximos aos relatados por Olde Riekerink *et al.* (2010). Na pesquisa de Costa, Rajala-Schultz e Schuenemann (2016), a prevalência de *S. aureus*, em propriedades leiteiras de Ohio (Estados Unidos), foi de 48% na primeira coleta e nas outras duas coletas subsequentes a prevalência foi de 64% e 69%, respectivamente. Já no estudo conduzido na China, Bi *et al.* (2016) coletaram uma amostra de leite de tanque por propriedade rural totalizando 894 amostras e detectaram a presença de *S. aureus* em 50,1% delas. A baixa prevalência encontrada nesse trabalho, quando comparada a outros trabalhos, pode ser explicada pela frequência de coletas realizadas. Paiva (2009) afirma que as coletas de amostras de leite de tanque, para isolamento de patógenos, devem ser realizadas por pelo menos três vezes consecutivas para aumentar a sensibilidade do teste de cultura microbiológica. Outra justificativa para a baixa prevalência de isolamento de *S. aureus* é porque esse microrganismo apresentar um padrão cíclico de eliminação no leite o que determina altos e baixos valores de CCS ao longo do tempo de infecção (Sears *et al.*, 1990). Paiva (2009) afirma que a sensibilidade para a detecção desse microrganismo em uma única coleta é de 74,5%. Dessa forma, as propriedades com resultados negativos não podem ser caracterizadas como livres de *S. aureus*, sendo, então necessário realizar pelo menos três coletas, intervaladas de dias ou alguns meses, para que se realize a correta caracterização da propriedade.

A presença de patógenos ambientais, em resultados de cultura microbiológica de tanque, deve ser analisada com muito cuidado, já que esses microrganismos estão presentes na pele externa dos tetos das vacas, no ambiente e seu isolamento, nesses casos, não necessariamente significa a ocorrência de mastites (Paiva, 2009). *Klebsiella* spp. foi identificado em amostras de leite tanto na primeira coleta (F1, F4, F8, F9 e F10) quanto na segunda coleta (F1, F4, F7, F8, 10 e F11). Outros microrganismos do grupo dos coliformes (não diferenciados), também foram isolados em amostras da primeira (F1, F2, F3, F4, F5, F6 F8, F9, F10 e F11) e segunda coleta (F1, F2, F4, F6, F7, F9, F10 e F11). Apesar de sua distribuição ubiqüitária, casos de bactérias ambientais causando mastite em vacas são comuns (Peres Neto e Zappa, 2011; Coser *et al.*, 2012). Bi *et al.*, (2016) isolaram patógenos ambientais; *E. coli*, *S. uberis*, *Enterococcus* spp. e *Klebsiella* spp. de 894 amostras de leite de tanque e encontraram prevalência de 20% para *Klebsiella* spp. Podder *et al.*, (2014) isolaram *Klebsiella* spp. em 61 amostras de leite de vacas com mastite, em 11 propriedades leiteiras. *Pseudomonas* spp., também considerado um patógeno de origem ambiental, além de causar mastite pode também produzir enzimas termoestáveis que aceleram a lipólise e proteólise do leite, diminuindo, assim, sua qualidade e vida de prateleira. Da Cunha *et al.* (2016) pesquisaram, entre outras coisas, a prevalência de vários agentes etiológicos de mastite em quartos mamários de vacas com mastite clínica de 44 rebanhos leiteiros no município de Viçosa (MG). Em 5,41% das amostras foi encontrada a presença de *Pseudomonas* spp. Em pesquisa realizada nos Emirados Árabes (Al-Juboori *et al.*, 2013), com leite de camelo fêmea, encontrou-se uma prevalência de 3,23% de *Pseudomonas aeruginosa* em casos positivos para mastite subclínica.

Bactérias psicotróficas foram detectadas em 100% das amostras nas duas coletas. O gênero *Pseudomonas* foi encontrado em amostras de algumas propriedades, tanto na primeira coleta (F1, F2, F3, F4, F5, F7, F8, F9, F10 e F11) quanto na segunda (F1, F2, F4, F6, F8, F9, F10 e F11). Durante a refrigeração do leite do tanque, a baixa temperatura não permite o crescimento dos mesófilos, porém, favorece o crescimento de bactérias psicotróficas, que são bem adaptadas às baixas temperaturas (Rasolofu *et al.*, 2010; Fricker *et al.*, 2011). Os principais representantes de psicotróficos incluem *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e *Lactococcus* spp., e a maior parte dos psicotróficos tem sido identificada como membros do gênero *Pseudomonas* (Martins *et al.*, 2006; Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007; Neubeck *et al.*, 2015). Neubeck *et al.* (2015) isolaram *Pseudomonas* spp. em 19 das 20 amostras analisadas, e identificaram uma diversidade de 33 espécies, sendo *Pseudomonas proteolytica*

a de maior prevalência, encontrada em 15 das 20 amostras. De todas as espécies isoladas, 85% foram positivas para a produção de enzimas lipolíticas, proteolíticas ou ambas. Diversos autores relatam que a presença dessas enzimas causa diminuição do rendimento da produção industrial de derivados lácteos e do tempo de vida de prateleira dos produtos (Arcuri *et al.*, 2008; Teh *et al.*, 2014).

5.3 Análises físico-química e microbiológica da água

Os resultados físico-químicos das amostras de água coletadas nos dois períodos foram considerados dentro dos padrões para todos os ensaios realizados. Apenas amostras das propriedades F11 (primeira coleta) e F4 (segunda coleta) obtiveram valores para o ensaio de turbidez acima do valor máximo permitido (> 5 uT). Pode-se observar, de forma geral, que as características físico-químicas das águas coletadas estão de acordo com os valores de referência apresentados na legislação (Tabela 5).

Tabela 5. Qualidade físico-química e microbiológica de amostras de água coletadas em propriedades leiteiras, em dois momentos

Propriedade	Coleta	Bactérias Mesófilas (UFC/mL)	Coliformes totais (NMP/100 mL)	<i>E. coli</i> (NMP/ 100 mL)	Turbidez (Ut)	Dureza (mg/L)
F1	1	295	461,1	< 1	0,75	42,6
F2	1	88	6,3	< 1	0,4	18,8
F3	1	1.480	> 2.419,60	< 1	0,8	79,2
F4	1	2.630	> 2.419,60	48,1	0,9	40,6
F5	1	149	344,8	<1	0,25	61,4
F6	1	2.390	> 2.419,60	12,1	0,8	41,6
F7	1	247	2.419,60	7,5	1,6	8,9
F8	1	8 (estimado)	2	<1	0,4	59,4
F9	1	2.940	> 2.419,60	435,2	0,6	40,6
F10	1	< 1,0 (estimado)	< 1	<1	1,2	80,2
F11	1	33	24,1	18,3	11	129
F1	2	88	980,4	< 1	0,72	NR
F2	2	< 1	22,6	< 1	0,06	NR
F3	2	1.090	> 2.419,6	< 1	0,04	NR
F4	2	420	1.413,60	547,5	19	NR
F5	2	118	686,7	290,9	0,19	NR
F6	2	1.190	365,4	1	0,04	NR
F7	2	2.565	> 2.419,6	488,4	3,11	NR
F8	2	4	74,9	1	0,33	NR
F9	2	150	139,6	1	0,04	NR
F10	2	< 1	< 1	< 1	0,82	NR
F11	2	52	12,2	5,2	3,82	NR

* NR: Não Realizado

Os resultados microbiológicos da água de algumas propriedades estavam fora dos limites máximos permitidos pela legislação brasileira. Na primeira coleta, as propriedades F3, F4, F6 e F9 e na segunda coleta as propriedades F3, F6 e F7 obtiveram resultados insatisfatórios para a análise de bactérias heterotróficas porque os valores encontrados estavam acima do permitido para o ensaio. Em relação à *E. coli*, amostras de água das propriedades F4, F6, F7, F9 e F11 (primeira coleta) e das propriedades F4, F5, F6, F7, F8, F9 e F11 (segunda coleta) apresentaram-se fora dos padrões legais vigentes, com resultados acima dos permitidos. Para a água de consumo, a legislação determina que o parâmetro *E. coli* esteja ausente em 100 mL (Brasil, 2011c). Dessa forma, pode-se observar que 45%

das amostras na primeira coleta e 64%, na segunda coleta estavam fora dos padrões de potabilidade exigidos pela Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde. A má qualidade da água encontrada nas propriedades vai de encontro ao observado por Piana *et al.* (2014) que analisaram 32 amostras de água de propriedades leiteiras, nos municípios de Campo Bonito, Cascavel e Guaraniáçu, no estado do Paraná, e encontraram 32% das amostras fora dos padrões legais. Em trabalho realizado por Lacerda *et al.* (2009), foi avaliada a qualidade microbiológica da água utilizada em propriedades leiteiras para limpeza dos tetos de vacas e de equipamentos, em três municípios do estado do Maranhão, nas estações do inverno e verão. Das 20 amostras analisadas no inverno e 20 no verão, 70% das amostras do inverno e 75% das amostras do verão, estavam em desacordo com o preconizado pela Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde.

A presença de resultados insatisfatórios é preocupante já que a fonte de água dessas propriedades tanto para o abastecimento das casas quanto para realizar as obrigações de trabalho é a mesma. Uma água classificada como insatisfatória, além de veicular microrganismo que pode comprometer a saúde de quem a utiliza, pode veicular patógenos importantes, ser fonte de infecção para a glândula mamária e comprometer a qualidade do leite (Cerqueira *et al.*, 2006).

5.4 Análise metagenômica do gene rRNA16S para a matriz leite e água

A partir da análise metagenômica do gene rRNA16S foi possível caracterizar os gêneros encontrados tanto na matriz água quanto na matriz leite. As análises realizadas levaram em consideração as comunidades que estão representadas em pelo menos 1% de abundância. Observou-se variação de número de gêneros entre as amostras analisadas e, por isso, optou-se por realizar uma curva de rarefação para uma comparação inicial da diversidade das amostras (Figura 8). A partir de um *cutoff* de 1038 *reads*, foi possível obter uma cobertura de leitura acima de 94%. Com isso, observou-se que a curva de rarefação da água encontra-se acima da curva do leite, demonstrando que a diversidade de microrganismos encontrada na água é maior que a do leite.

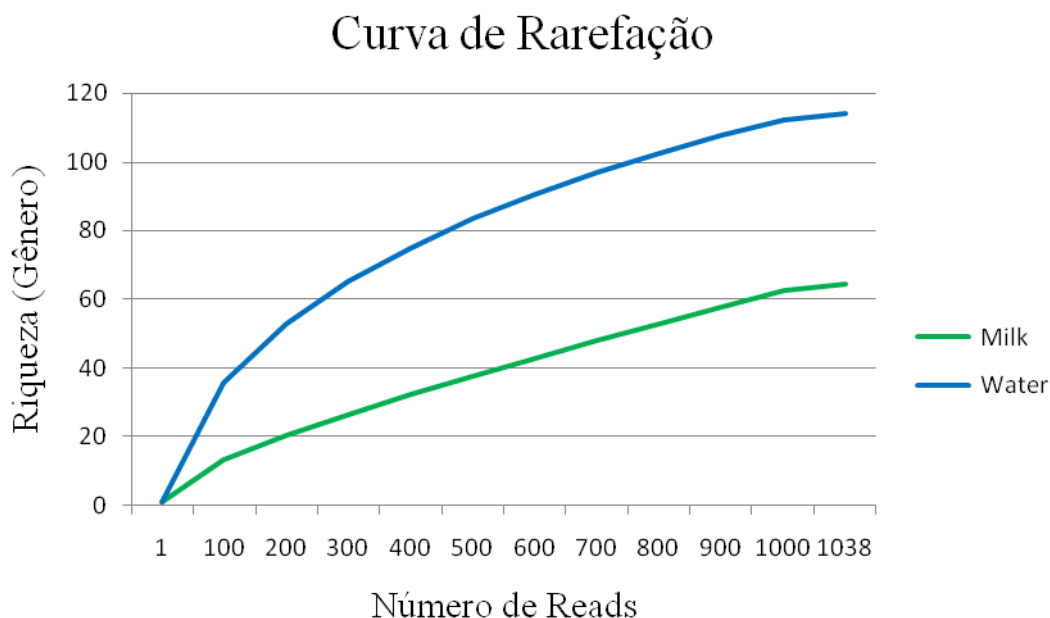


Figura 8. Curva de rarefação das amostras de leite de tanques refrigeradores e de água de propriedades leiteiras.

Diversos trabalhos têm utilizado a técnica da metagenômica do gene rRNA16S para identificar a microbiota presente na água (Gomez-Alvarez *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2012; Douterelo *et al.*,

2013; Bal Krishna *et al.*, 2013; Holinger *et al.*, 2014) e no leite (Oikonomou *et al.*, 2012; Oikonomou *et al.*, 2014; Bi *et al.*, 2015; Ganda *et al.*, 2016; Kable *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2017). No presente trabalho, ao se comparar a microbiota da água com a do leite, observou-se maior diversidade da microbiota presente na água (Figura 9).

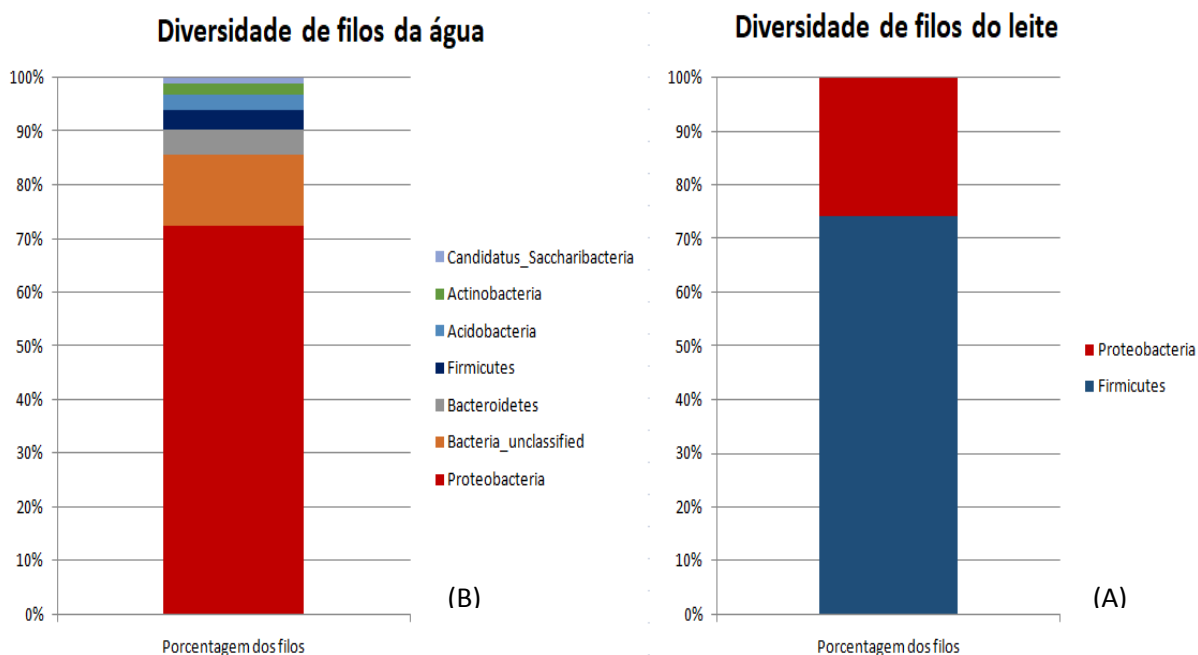


Figura 9. Diversidade de filios encontrados nas amostras de leite de tanques refrigeradores (A) e da água (B) de propriedades leiteiras.

Observa-se na imagem B (Figura 9), maior prevalência de dois filios nas amostras de leite analisadas. Bhatt *et al.* (2012) descreveram que os filios mais prevalentes encontrados em três diferentes tipos de rebanhos foram *Proteobacteria* e *Firmicutes*. O filo *Firmicutes* abriga as classes *Bacilli*, *Mollicutes* e *Clostridia* e, dentro de cada classe, existem gêneros que são importantes para a caracterização da qualidade microbiológica do leite. Representantes em nível de gênero para este filo são *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Streptococcus*. Leites com alta prevalência dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* tendem a apresentar maiores contagens de células somáticas já que alguns representantes desses gêneros estão associados à infecção intramamária nos rebanhos leiteiros (Bradley, 2002; Riekerink *et al.*, 2006). *Lactobacillus* spp. estão presentes no ambiente, na microbiota da pele, nos tratos gastrointestinal e urogenital dos seres humanos e animais (Silva, 2016). Esse gênero é encontrado em diversos produtos lácteos fermentados, pois são utilizados como cultura *starters* para a fermentação do leite (Lahtinen *et al.*, 2012).

Avaliou-se a possibilidade de influência da composição da microbiota da água sobre a microbiota do leite. Foi realizada a análise de gêneros compartilhados e não houve amostra (com abundância relativa acima de 1%) que estivesse presente tanto nas amostras de leite quanto de água (Figura 10), demonstrando que, para o grupo de propriedades amostradas, não existe interferência expressiva da água na qualidade microbiológica do leite. Observou-se que a abundância de *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. (Figura 10) foi diferentes no leite ($p \leq 0,05$).

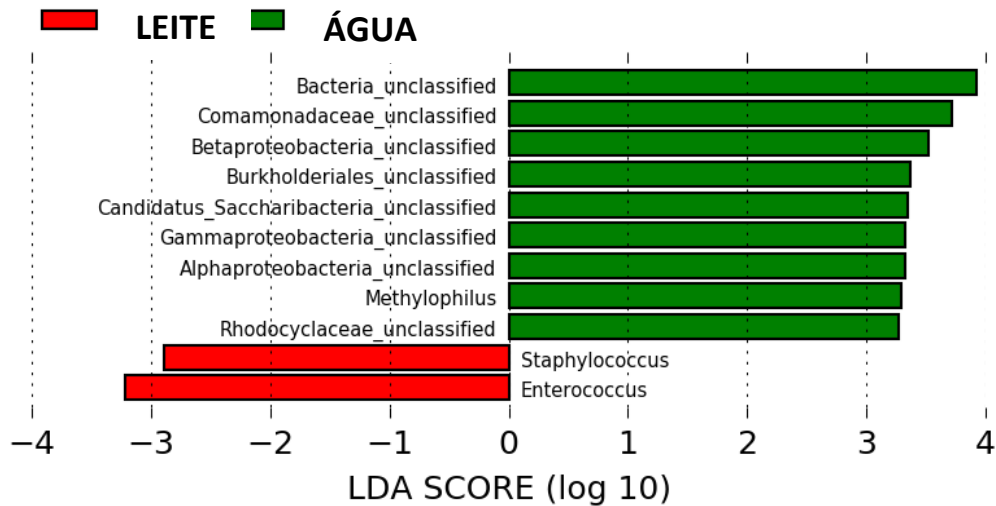


Figura 10. Caracterização dos gêneros mais abundantes (acima de 1%) nas amostras de leite e água de propriedades leiteiras.

O gênero *Enterococcus* faz parte das bactérias ácido láticas e está amplamente distribuído na natureza, sendo que o trato gastrointestinal de animais e do homem são considerados os principais reservatórios (Porto *et al.*, 2016). A contaminação do leite e de seus derivados por material fecal, equipamentos de ordenha contaminados, são as principais formas de introduzir *Enterococcus* spp. nessa matéria prima. De acordo com Gomes e colaboradores (2008), o queijo, fabricado no Brasil, é o produto que possui a maior proporção de *Enterococcus* spp. dentre os microrganismos encontrados. A literatura descreve o gênero *Enterococcus* como um grupo de bactérias de características ambíguas (Foulquie-Moreno *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014). Isso ocorre porque, na produção de derivados do leite como o queijo, a presença desse microrganismo contribui para o aparecimento de características sensoriais específicas (Foulquie-Moreno *et al.*, 2006). Porém, esse grupo pode carrear diversos genes que codificam fatores de virulência (Moraes *et al.*, 2012).

Staphylococcus spp. não foi isolado em nenhuma amostra de água e foi estatisticamente associado em todas as amostras de leite das propriedades analisadas (Figura 11).

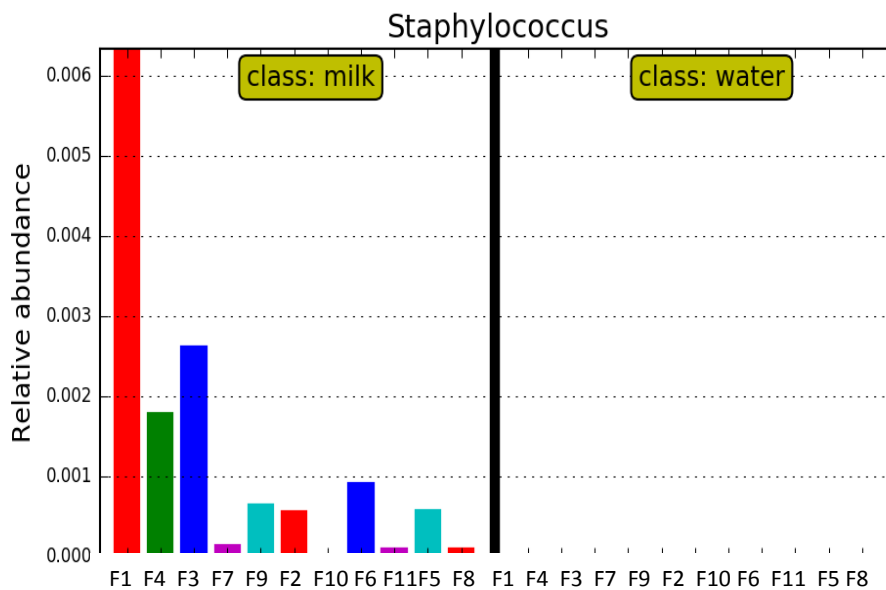


Figura 11. *Staphylococcus* spp. estatisticamente associados às amostras de fazendas leiteiras.

Foi aplicado o teste de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e um gráfico foi gerado para visualizar a existência de alguma diferença entre as microbiotas do leite e da água (Figura 12). Realizou-se o teste AMOVA para averiguar se existia diferença estatística entre os dois grupos e foi encontrado $p < 0,001$, confirmando que a microbiota existente nos dois tipos de matriz difere entre si.

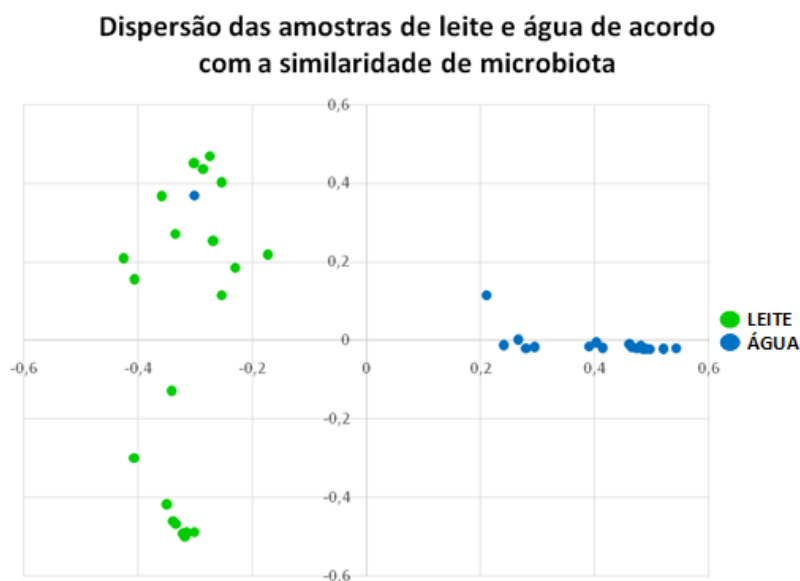


Figura 12. Dispersão das amostras de leite e água de propriedades leiteiras de acordo com a similaridade da microbiota das amostras.

Dessa forma, é possível inferir que a microbiota presente na água das propriedades analisadas, na época das duas coletas, não influenciou a microbiota presente no leite.

Esperava-se que alguns microrganismos, como *Pseudomonas* spp. fossem encontrados em abundância suficiente ($> 1\%$) para demonstrar influência nas duas matrizes analisadas. Porém é possível observar a presença de *Pseudomonas* spp. em todas as amostras de leite e de água (Figura 13).

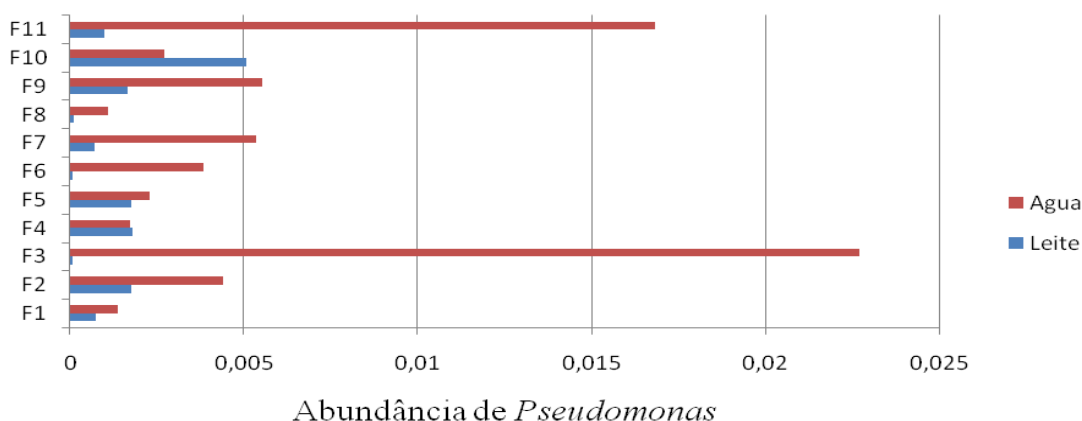


Figura 13. Abundância do gênero *Pseudomonas* de acordo com a matriz e propriedade analisada.

Em trabalho realizado na Alemanha, Von Neubeck *et al.* (2015) coletaram 20 amostras sendo dez de leite de tanque de refrigeração em propriedade e dez de leite estocado em silos de laticínios. Dessas amostras, o gênero mais frequentemente encontrado foi *Pseudomonas*, estando presente em 19 das 20 amostras analisadas. Capodifoglio *et al.* (2016) analisaram dez amostras de leite de tanque refrigerador de propriedades rurais do estado de São Paulo - Brasil, durante o período de seca e novamente no período das chuvas. As análises foram direcionadas à pesquisa de *Pseudomonas* spp.

em leite de tanques refrigeradores, de água utilizada na propriedade, e em outros pontos relacionados à ordenha. *Pseudomonas* spp. foi isolado em todas as amostras, tanto no período da seca quanto na chuva demonstrando a importância da implementação de medidas que evitem a contaminação do tanque e do leite por esse microrganismo.

Vithanage *et al.* (2016) analisaram amostras de leite de tanque de três propriedades rurais na Austrália no período de junho de 2013 a junho de 2014 e *Pseudomonas* spp. foi identificado em 19,9% das amostras. Iramain *et al.* (2005) pesquisaram a prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* na água utilizada durante a rotina de ordenha e tanque de resfriamento de leite em uma província de Buenos Aires. Foram analisadas amostras de 122 tanques de refrigeração e em apenas quatro foi encontrada a presença de *P. aeruginosa*. Os autores descreveram que, em três das propriedades positivas para esse microrganismo havia práticas de manejo que permitiam que o leite entrasse em contato com a água também contaminada com *P. aeruginosa*. Ao realizar mudanças dessas práticas nas três propriedades, não houve mais detecção de *P. aeruginosa* no leite do tanque.

Rysanek *et al.* (2007) coletaram 298 amostras de leite de tanque refrigeradores de propriedades leiteiras na República Checa a fim de determinar a prevalência de microrganismos causadores de mastite e sua influência na contagem de células somáticas. Observou-se uma prevalência de 7,38% para *Pseudomonas aeruginosa*. Zang *et al.* (2016) analisaram 3.134 amostras de leite individual de vacas de 125 propriedades e pesquisaram a presença de microrganismos causadores de mastite. Foi constatado que a prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* variava conforme a estação do ano. A maior prevalência desse microrganismo se deu no verão (2,11%) e a mais baixa na primavera (0,95%). Ao relacionar o número de partos do animal com a ocorrência de *P. aeruginosa* observou-se que, animais de primeira ordem de parto apresentavam prevalência de 3,85%. A prevalência diminuía ao longo de outros partos, mas ao atingir a quarta ordem de parto, prevalência aumentava para 4,26%. Os autores também observaram que 4,36% dos casos de mastite eram ocasionados por *P. aeruginosa* e o sinal clínico observado foi o edema de úbere. *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativo que não sobrevive ao processo de tratamento do leite por calor, mas suas enzimas são termorresistentes e, por isso, continuam ativas no leite disponibilizado para o consumo. Essas enzimas termorresistentes são capazes de causar lipólise e proteólise durante todo o tempo de vida útil do produto lácteo.

Apesar da importância da análise metagenômica, os resultados obtidos indicam a necessidade de pesquisas adicionais sobre isolamento e tipificação das amostras de *Pseudomonas* spp. para melhor compreensão de possíveis influências da água na contaminação do leite.

A fim de verificar a existência de diferença de microbiota entre os períodos coletados (outono e inverno), foram realizados os testes estatísticos AMOVA e Parsinômia para as amostras de leite e para as amostras de água, em separado. Observou-se que não houve diferença estatística entre eles ($p > 0,05$), demonstrando que a microbiota presente no leite e na água se manteve a mesma nos diferentes tempos de coleta (Tabela 6).

Tabela 6. Resultado estatístico dos testes AMOVA e Parsinômia para avaliação da diferença de microbiota das matrizes leite e água de propriedades leiteiras em diferentes tempos de coleta

Amostragem por tempo (T1 x T2)		
LEITE	Parsinômia	AMOVA
<i>Membership</i>	0,62	0,09
<i>Structure</i>	0,98	0,57
ÁGUA	Parsinômia	AMOVA
<i>Membership</i>	0,98	0,16
<i>Structure</i>	1	0,43

A análise da alfa diversidade foi realizada pelo teste estatístico *t* de Student comparando os valores dos índices de Chao, Simpson, Shanmon e o número absoluto de gêneros encontrados. Foi feita a comparação entre os dados referentes ao leite com os da água e encontrou-se diferença estatística ($p < 0,001$) o que corrobora com os resultados das análises de beta diversidade. Também foram comparados os dados entre os dois tempos de coleta e, conforme encontrado na beta diversidade, não houve diferença estatística entre eles, exceto para avaliação pelo índice Chao (Tabela 7).

Tabela 7. Valores do teste estatístico *t* de Student aplicado aos índices de Chao, Simpson, Shanmon e diferença de gêneros para avaliar a alfa diversidade entre as matrizes e o tempo de coleta das amostras de água e de leite cru refrigerado

Alfa diversidade – teste T de Student		
	Leite x Água	Tempo de coleta 1 x Tempo de coleta 2
Diferença entre gêneros	$p < 0,001^*$	0,17
Chao	$p < 0,001^*$	0,04
Simpson	$p < 0,001^*$	0,13
Shanmon	$p < 0,001^*$	0,15

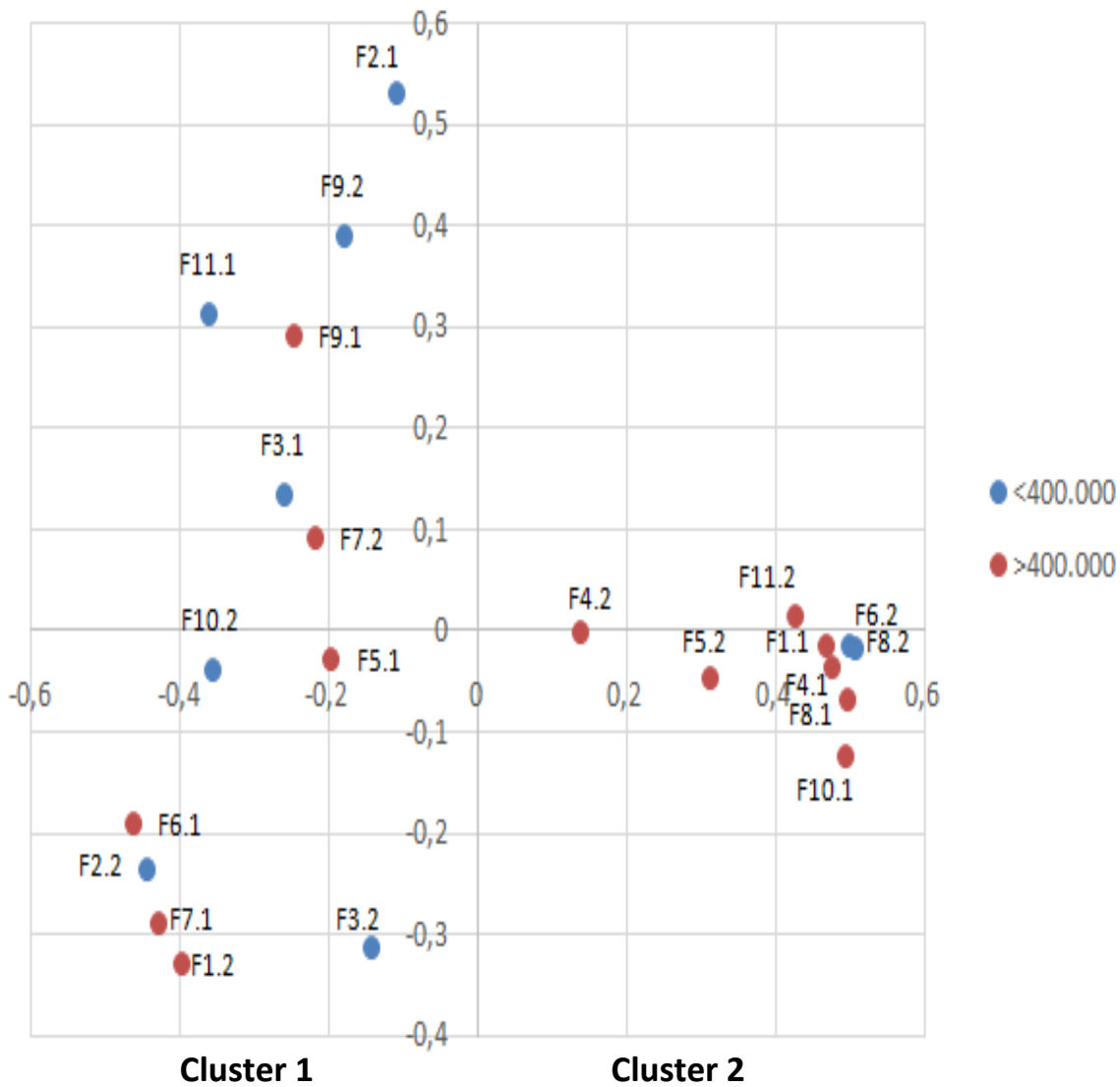
5.5 Análise metagenômica do gene rRNA16S para a matriz leite

A Instrução Normativa nº 7 de 2016 (Brasil, 2016) estabelece que a partir do dia 01/07/2018 novos valores entrarão em vigor para CCS e para CBT (400.000 cels/mL e 100.000 UFC/mL, respectivamente), para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Pelo fato de a CBT do leite de todas as propriedades estarem abaixo do valor que entrará em vigor, optou-se por um novo ponto de corte mais baixo. Realizou-se um *cutoff* de CCS de 400.000 cels/mL e de 5.000 UFC/mL para CBT. Os testes estatísticos de Parsinômia e AMOVA foram então utilizados para avaliar se a microbiota encontrada nas amostras poderia estar, de alguma forma, influenciando os valores de CCS e CBT. Não foi encontrada diferença estatística para os dados analisados ($p > 0,05$), sugerindo que, para essas amostras analisadas, a microbiota encontrada no leite não era responsável por influenciar os valores encontrados para CCS e CBT (Tabela 8). Isso demonstra que, ao compararmos a qualidade do leite de propriedades diferentes, existem outros fatores que podem influenciar os valores de CCS e de CBT além da microbiota presente no leite das vacas ordenhadas.

Tabela 8. Análise estatística dos valores de CCS e CBT (*cutoff* 400.000 cél/mL x 1000 e 5.000 UFC/mL x 1000, respectivamente) e abundância relativa, em relação ao *membership* e à *structure* dos gêneros encontrados em cada propriedade utilizando os testes estatísticos de Parsinômia e AMOVA

Parâmetros	Parsinômia		AMOVA	
	<i>Membership</i>	<i>Structure</i>	<i>Membership</i>	<i>Structure</i>
CCS (400.000 cels/mL x 1000)	0,75	0,74	0,81	0,28
CBT (5.000 UFC/mL x 1000)	1	1	0,62	0,87
CCS (400.000 cels/mL x 1000) e CBT (5.000 UFC/mL x 1000)	1	1	0,50	0,77

Ao realizar uma análise multivariada foi gerado um gráfico PCoA e, apesar de não haver diferença estatística entre os valores do ponto de corte de CCS, foi possível observar a formação de dois *clusters* em relação ao eixo y (Figura 14). A formação desses *clusters* relaciona-se à composição da microbiota presente no leite das propriedades e pelos testes de Parsinômia e AMOVA, notou-se diferença estatística entre a microbiota presente em cada *cluster*.



* [F (identificação da propriedade 1 a 11).(tempo de coleta 1 a 2)]

Figura 14. Formação de dois *clusters* entre as amostras de leite cru refrigerado das fazendas de acordo com a microbiota nos dois momentos da coleta.

O gráfico de abundância relativa diz respeito à microbiota presente em cada um dos *clusters* e caracteriza os gêneros mais abundantes (acima de 1%) e qual a proporção de cada um deles (Figura 15).

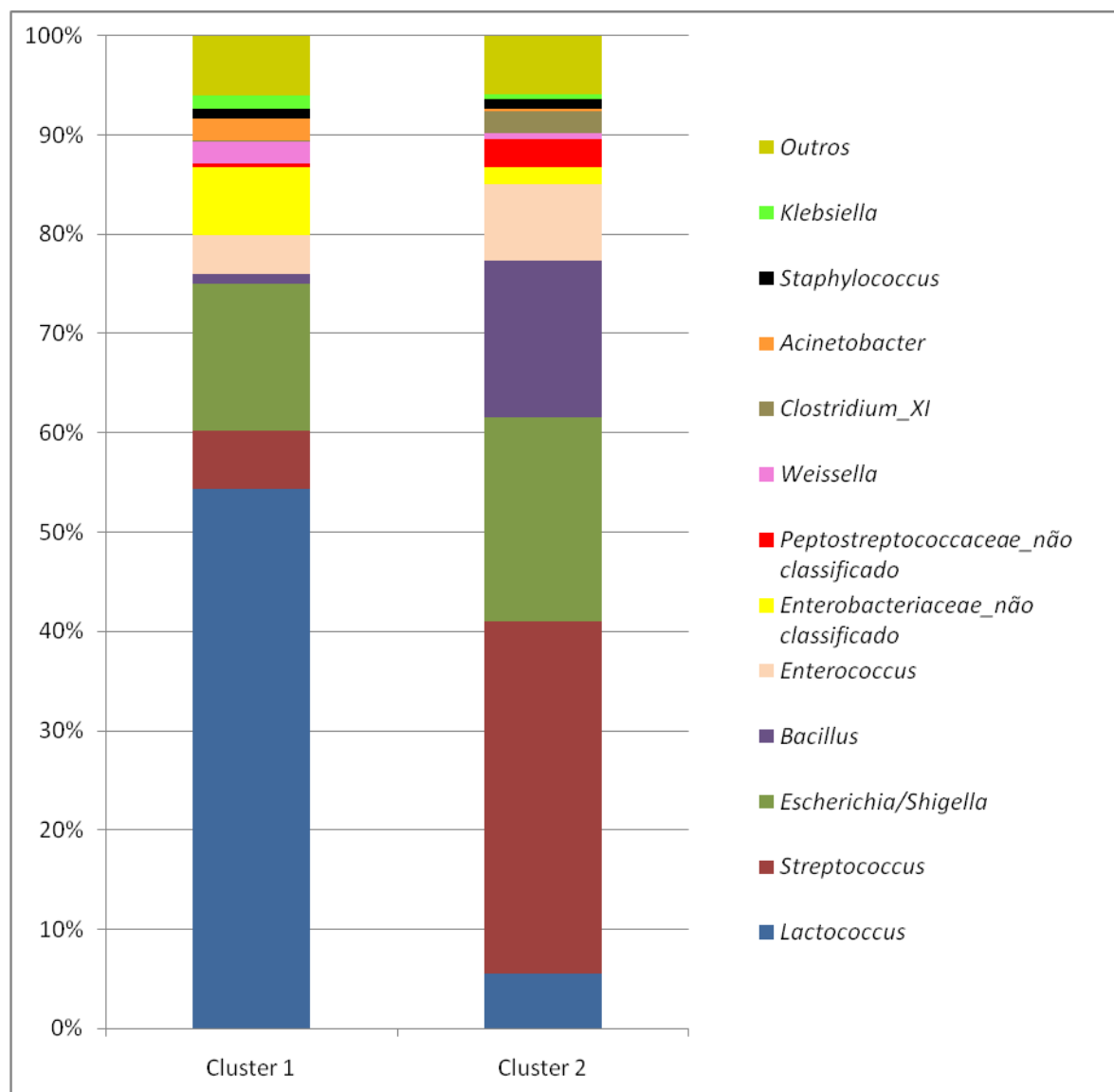


Figura 15. Proporção dos gêneros de maior abundância (1%) nos dois *clusters* identificados a partir da análise de amostras de leite cru de tanque refrigerador.

Apesar de não haver diferença estatística entre os valores de CCS do leite de amostras dos dois *clusters*, observa-se que no *cluster* 1 há predomínio de fazendas com contagem de células somáticas acima de 400.000 cels/mL (Figura 14) e maior abundância do gênero *Lactococcus* (Figura 15).

Observa-se que os gêneros mais abundantes e que desempenham um papel, até então, importante para a qualidade do leite são principalmente *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Escherichia/Shigella*. Foi realizado o teste LefSe para determinar quais eram os gêneros estatisticamente diferentes entre os *clusters* e o resultado está representado na Figura 16.

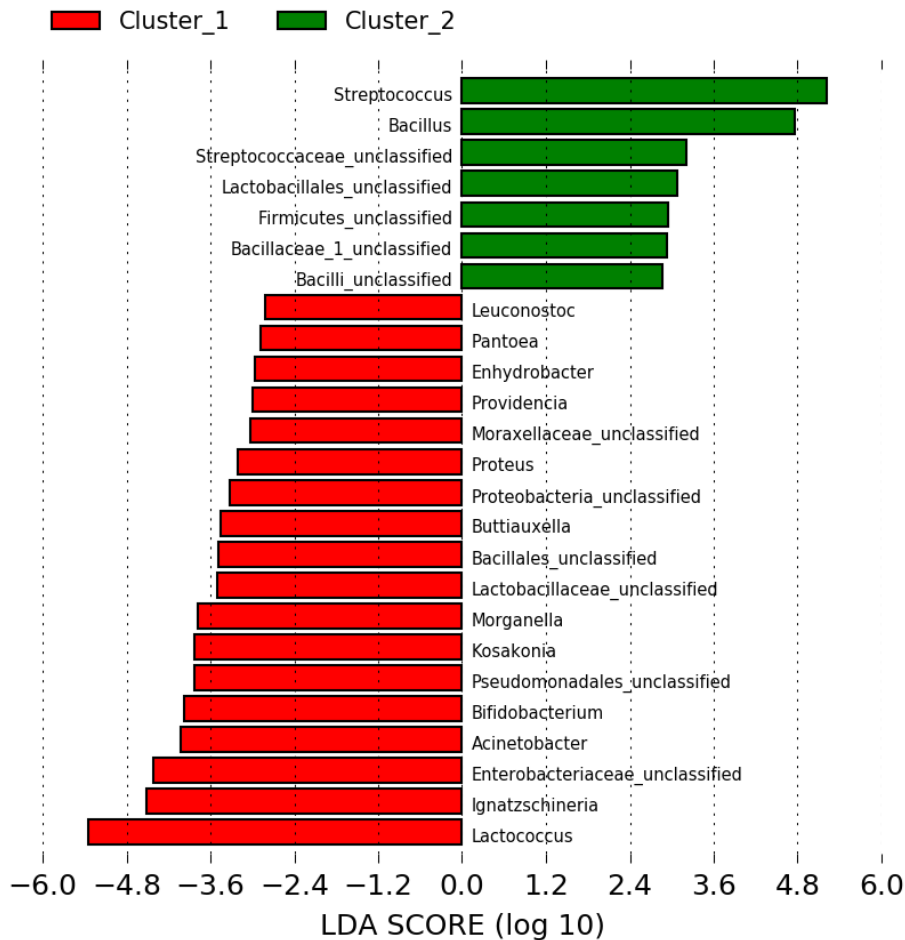


Figura 16. Gêneros de microrganismos estatisticamente associados a cada *cluster* das amostras de leite cru de tanques refrigeradores.

O gênero mais prevalente no *Cluster* esquerdo foi *Streptococcus* e no *Cluster* direito, *Lactococcus* (Figura 17), sendo que este último pertence ao grupo das bactérias ácido-láticas e é esperado de ser encontrado em amostras de leite cru.

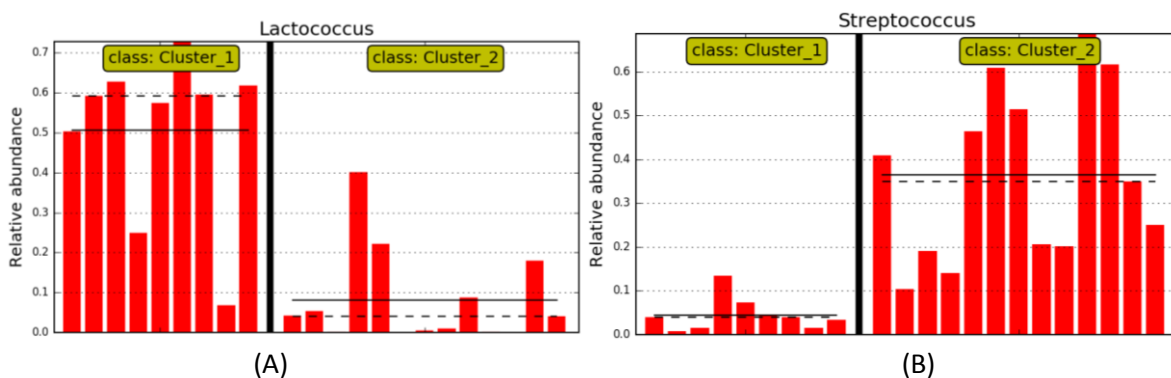


Figura 17. Abundância relativa, em cada *cluster*, de *Lactococcus* (A) e de *Streptococcus* (B) em amostras de leite de tanques refrigeradores de propriedades leiteiras.

As bactérias ácido-láticas são utilizadas como culturas *starters* na produção de derivados lácteos, como queijos e iogurtes (Leroy *et al.*, 2004) e têm sido consideradas como potencial grupo para inibir a mastite bovina (Bouchard *et al.*, 2015). Existem trabalhos que descrevem *Streptococcus* spp. como microrganismo ambiental que contribui para a incidência de mastite clínica (Grohn *et al.*,

2004). Das espécies de *Streptococcus*, *S. agalactiae* e *S. uberis* são associadas à infecção intramamária (Jones e Swisher, 2009; Wyder *et al.*, 2011).

A presença de *Lactococcus* no leite vem sendo discutida se de fato pode ser sempre associada a leite de boa qualidade. Existem trabalhos que descrevem a relação da presença de algumas espécies de *Lactococcus* (*L. lactis* e *L. garvieae*) com a ocorrência de infecção intramamária e, conseqüentemente, diminuição da qualidade do leite (Wyder *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2011, Plumed-Ferrer *et al.*, 2013, Werner *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2016). Rodrigues *et al.* (2016) analisaram o leite de vacas com mastite e encontraram *Lactococcus* como o gênero mais dominante nessa situação enquanto que no leite de vacas saudáveis, ele era encontrado em menor proporção. A mesma relação foi encontrada no presente trabalho. Observou-se que algumas propriedades exibiam uma tendência de diminuição do valor da CCS do leite do tanque à medida que a presença de *Lactococcus* spp. diminuía (Figura 19). Uma vez que a CCS do leite do tanque está associada com a prevalência de infecções intramamárias (Schukken *et al.*, 2003), a redução da prevalência da mastite é importante para a redução da CCS do leite do tanque (Schukken *et al.*, 2003). Dessa forma, é necessário investigar se a mesma relação, para esse microrganismo, pode ser encontrada em nível de vaca dentro do rebanho das propriedades analisadas nesse trabalho.

Além dos dois gêneros mais prevalentes, existem outros que também são importantes, como por exemplo, *Acinetobacter* (Figura 18). No presente trabalho, *Acinetobacter* foi identificado em todas as amostras de leite e de água analisadas, em pelo menos uma coleta. Esse gênero é composto por bactérias Gram-negativo e possui *Acinetobacter baumannii* como importante espécie para a saúde pública devido a casos associados a infecções hospitalares em pacientes debilitados (Manical *et al.*, 2000; Chastre *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 2005; Fournier *et al.* 2006; Choi *et al.*, 2010). *Acinetobacter* spp. pode estar presente na água, no solo, na microbiota da pele de pessoas, principalmente na região inguinal, axilar e pontas dos dedos (Choi *et al.*, 2010).

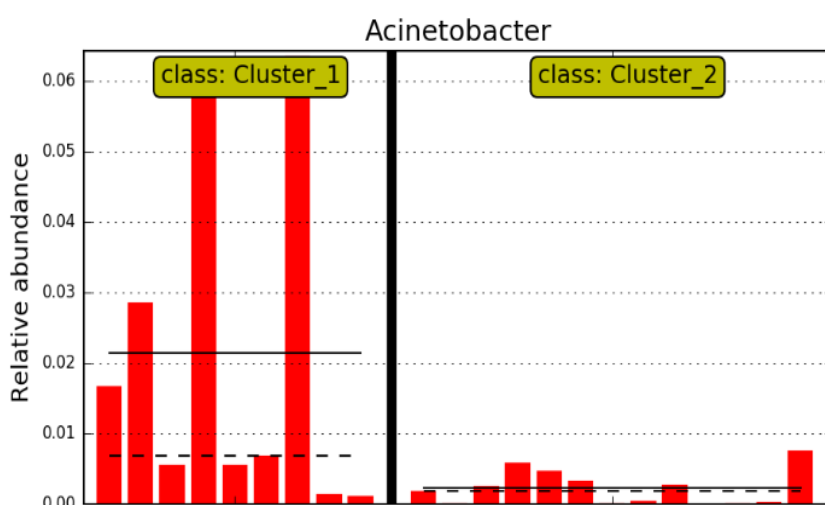


Figura 18. Abundância relativa do gênero *Acinetobacter* entre os diferentes *clusters* observados.

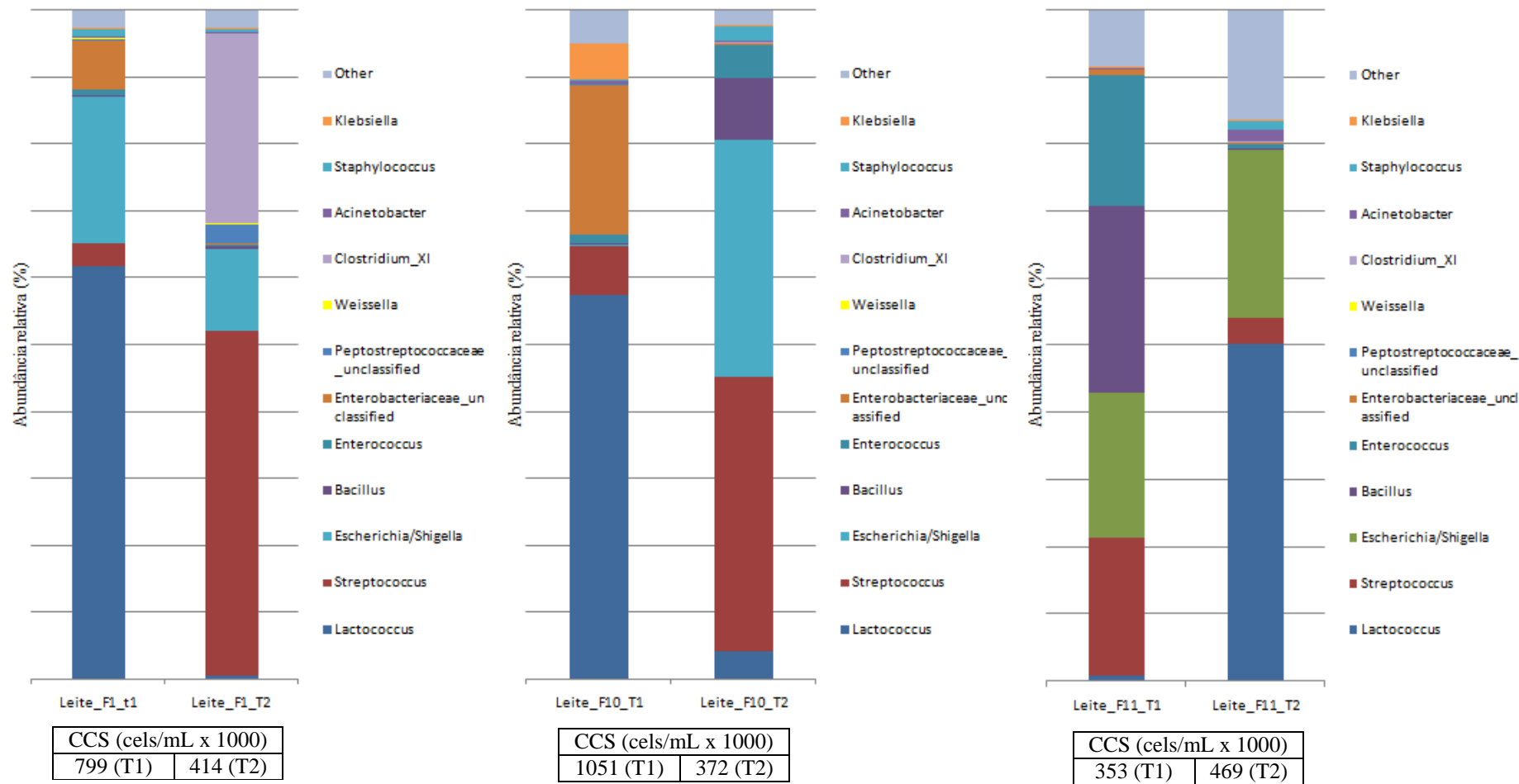


Figura 19. Abundância relativa dos gêneros encontrados no leite de tanques refrigeradores das propriedades F1, F10 e F11 nos dois tempos de coleta e valores de CCS.

Também foi possível observar outros microrganismos que não estão estatisticamente associados a nenhum *cluster* e que estão com menos de 1% de abundância, mas que também são potencialmente importantes para a produção leiteira e para a saúde pública. Como exemplo, destaca-se a presença da família *Brucellaceae* (Figura 20) que inclui bactérias Gram-negativo e tem como um de seus representantes, o gênero *Brucella*. Devido à importância desse gênero na sanidade animal e saúde pública, é necessário realizar isolamento, por meio de cultura microbiológica, para determinar se ocorrerá o crescimento de bactérias do gênero *Brucella*. *Campylobacter*, importante em casos de doenças transmitidas por alimento (Longenberger *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2013; Robinson *et al.*, 2014), foi outro gênero encontrado em amostras de água e de leite (Figura 20).

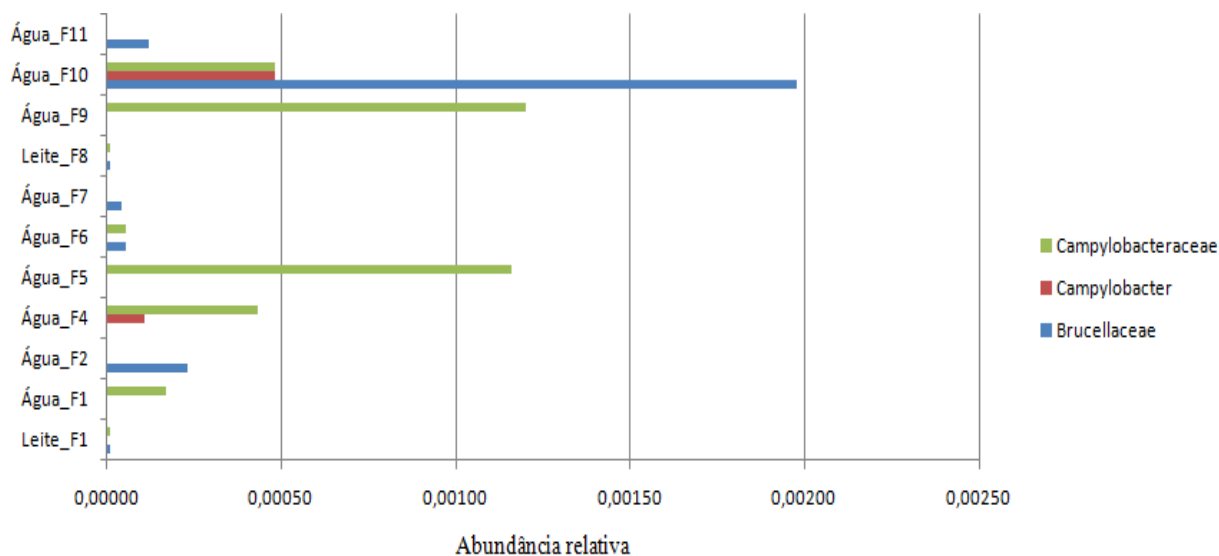


Figura 20. Abundância relativa dos gêneros e famílias de importância em saúde pública relacionados à matriz e fazenda.

Esses dados (Figura 20) apontam para a possível existência de animais portadores de microrganismos importantes para a saúde pública e animal, devendo, portanto, ser melhor investigado por análises complementares.

Diante dos resultados observados no presente trabalho, sugere-se a realização de pesquisas adicionais em amostras de leite individual de vacas e também de leite de tanque para melhor entendimento do microbioma presente, bem como sua relação com a saúde da glândula mamária e possíveis riscos para a saúde pública.

6. CONCLUSÕES

A qualidade e o microbioma do leite dos tanques refrigeradores das propriedades foram semelhantes e a água apresentou maior diversidade e abundância de microrganismos.

O manejo adotado nas propriedades foi variável e os fatores descarte de leite de tratamento para bezerras, não utilização de papel toalha e ordenha mecânica tipo canzil foram mais relacionados a produção de leite de pior qualidade.

Dos patógenos maiores ou primários causadores de mastite, isolados do leite de tanques refrigeradores, *Streptococcus agalactiae* não foi identificado e *Staphylococcus aureus* estava presente em algumas propriedades.

O microbioma do leite de tanques refrigeradores das propriedades foi similar, não variando entre fazendas e momento de coleta.

O microbioma do leite de tanques refrigeradores foi similar em leite com alta e baixa CBT e CCS, mas diferentes clusters foram identificados independentemente dos valores de CCS.

A diversidade microbiana do leite de tanques refrigeradores diferiu da encontrada na água entre fazendas. Em relação ao momento de coleta, esta diversidade apenas diferiu pelo índice de Chao.

Alguns microrganismos foram identificados apenas em amostras de água e outros, somente no leite.

Microrganismos da família Brucellaceae e de gêneros importantes em saúde pública (*Campylobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*) foram identificados em amostras de leite de tanques refrigeradores e na água de propriedades leiteiras e indicam a provável presença de animais portadores nas fazendas e riscos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDIS, M. F., TANCA, A., UZZUA, S., OIKONOMOU G., BICALHO R. C. B, MORONI, P. The bovine milk microbiota: insights and perspectives from -omics studies. *Molecular BioSystems*, v.12, n. 8, p. 2359-2372, 2016.

Al-Juboori, A. A., Kamat, N. K., e Sindhu, J. I. Prevalence of some mastitis causes in dromedary camels in Abu Dhabi, United Arab Emirates. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, v. 27, n. 1, p. 9-14, 2013.

ALMEIDA, Wallynson Eduardo Silva. *Caracterização parcial do gene 16S rRNA de isolados do solo e seus potenciais na solubilização de fostato e influência no crescimento de soja (Glycine max) e milho (Zea mays)*. 63f. Dissertação de Mestrado. Microbiologia Agropecuária - FCAV, Jaboticabal. 2017.

AMARAL, L. A., JÚNIOR, O. D. R., FILHO, A. N., BARROS, L. S. S., SILVARES, P. M. Água utilizada em propriedades rurais para consumo humano e na produção de leite como veículo de bactérias do gênero *Aeromonas*. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 101, n. 557-558, 2006.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Committee on Microbiological Methods for Foods. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4.ed. Washington, 2001.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 22nd ed.*, Washington, D.C. 2012.

ARCURI, E.F., DA SILVA, P. D. L., BRITO, M. A. V. P., BRITO, J. R. F., LANGE, C. C., E MAGALHÃES, M. M. D. A. Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural*, v.38, n.8, p.2250-2255, 2008.

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; PINTO, S.M. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, v.58, p.440-446, 2006.

AZEVEDO, C., PACHECO, D., SOARES, L., ROMÃO, R., MOITOSO, M., MALDONADO, J., SIMÕES, J. et al. Prevalence of contagious and environmental mastitis-causing bacteria in bulk tank milk and its relationships with milking practices of dairy cattle herds in São Miguel Island (Azores). *Tropical Animal Health and Production*, v. 48, n. 2, p. 451-459, 2016.

BAG, S., SAHA, B., MEHTA, O., ANBUMANI, D., KUMAR, N., DAYAL, M., HANSEN, T. et al.. An improved method for high quality metagenomics DNA extraction from human and environmental samples. *Scientific Reports*, v. 6, p. 26775, 2016.

BAL KRISHNA KC, SATHASIVAN A, GINIGE MP. Microbiol community changes with decaying chloramine residuals in a lab-scale system. *Water Research*, v. 47, n. 13, p. 4666-4679, 2013.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal Food Microbiology*, v. 61, n. 1, p. 1-10, 2000.

BARROS, R. S. M. *Medidas de Diversidade Biológica*. Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, 2007.

- BARTRAM AK, LYNCH MDJ, STEARNS JC, MORENO-HAGELSIEB G, NEUFELD JD. Generation of multimillionsequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end Illumina reads. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 11, p. 3846-3852, 2011.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; TRUCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.
- BAVA, L.; ZUCALI, M.; SANDRUCCI, A.; BRASCA, M.; VANONI, L.; ZANINI, L.; TAMBURINI, A. Effect of cleaning procedure and hygienic condition of milking equipment on bacterial count of bulk tank milk. *Journal of Dairy Research*, v. 78, n. 2, p. 211-219, 2011.
- BHATT, V. D., AHIR, V. B., KORINGA, P. G., JAKHESARA, S. J., RANK, D. N., NAURIYAL, D. S., JOSHI, C. G. et al. Milk microbiome signatures of subclinical mastitis- affected cattle analysed by shotgun sequencing. *Journal of Applied Microbiology*, v. 112, n. 4, p. 639-650, 2012.
- BHATT, V.D., PATEL, M.S., JOSHI, C.G. e KUNJADIA, A. Identification and antibiogram of microbes associated with bovine mastitis. *Animal Biotechnology*, v. 22, n. 3, p. 163-169, 2011.
- BI, Y., WANG, Y. J., QIN, Y., VALLVERDÚ, R. G., GARCÍA, J. M., SUN, W., CAO, Z. et al. Prevalence of bovine mastitis pathogens in bulk tank milk in China. *Plos One*, v. 11, n. 5, p. e0155621, 2016.
- BIANCONI, L.L.; GAMEIRO, A.H.; SAES, M.S.M. Um modelo de gestão e avaliação de procedimentos operacionais na pecuária leiteira. Anais. *XLV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural*. CD-ROM. Londrina: SOBER, 2007.
- BODILIS, J., NSIGUE-MEILO, S., BESAURY, L., e QUILLET, L. Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA gene in *Pseudomonas*. *Plos One*, v. 7, n. 4, p. e35647, 2012.
- BOKULICH, N.A.; JOSEPH, C.M.J.; ALLEN, G.; BENSON, A.K.; MILLS, D.A. Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. *Plos One*, v. 7, n. 5, p. e36357, 2012.
- BOSSHARD, P. P., ZBINDEN, R., ABELS, S., BÖDDINGHAUS, B., ALTWEGG, M., e BÖTTGER, E. C. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 4, p. 1359-1366, 2006.
- BOTARO, B. G., GAMEIRO, A. H., SANTOS, M. V. D., Quality based payment program and milk quality in dairy cooperatives of Southern Brazil: an econometric analysis. *Scientia Agricola*, v. 70, p. 21-26, 2013.
- BOUCHARD, D. S., SERIDAN, B., SARAOU, T., RAULT, L., GERMON, P., GONZALEZ-MORENO, C., CHAIN, F. et al. Lactic acid bacteria isolated from bovine mammary microbiota: potential allies against bovine mastitis. *Plos One*, v. 10, n. 12, p. e0144831, 2015.
- BOWMAN, J. S., RASMUSSEN, S., BLOM, N., DEMING, J. W., RYSGAARD, S., e SICHERITZ-PONTEN, T. Microbial community structure of Arctic multiyear sea ice and surface seawater by 454 sequencing of the 16S RNA gene. *The ISME journal*, v. 6, n. 1, p. 11, 2012.
- BRADLEY, A. Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal*, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.

BRADLEY, A.J., LEACH, K.A., BREEN, J.E., GREEN, L.E., GREEN, M.J., Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Veterinary Research*, v. 160, p. 253-258, 2007.

BRADLEY, R. D. e HILLIS, D. M. Recombinant DNA sequences generated by PCR amplification. *Molecular Biology and Evolution*, v. 14, n. 5, p. 592-593, 1997.

BRASIL. DECRETO Nº 9.013, DE 29 DE MARÇO DE 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2017.

BRASIL. Instrução Normativa nº 07, de 03 de maio de 2016. Estabelece novos prazos de vigência para valores de CCS e CBT. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2016.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade, Qualidade, Coleta e Transporte de leite. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999: altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2011.

BRASILB. Instrução Normativa nº 32, de 30 de junho de 2011. Prorroga vigência da Instrução Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2011^B.

BRASIL. Instrução normativa n.62, de 30 de dezembro de 2011. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2011^B.

BRITO, J.R.F., BRITO, M.A.V. Programas de controle das mastites causadas por microrganismos contagiosos e do ambiente. *Embrapa Gado de Leite-Documents (INFOTECA-E)*. p. 25, Juiz de Fora, EMBRAPA/CNPGL, 1998.

BRITO, M.A.V.P., BRITO, J.R.F., RIBEIRO, M.T., VEIGA, V.M. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

BUENO, V. F. F., MESQUITA, A.J., NICOLAU, et al. Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e período do ano no Estado de Goiás. *Revista Brasileira Ciência Veterinária*, v.15, p.40-44, 2008.

CAMERON, S.J.S., HUWS, S.A., HEGARTY, M.J., SMITH, D.P.M., MUR, L.A.J., 2015. The human salivary microbiome exhibits temporal stability in bacterial diversity. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 91, n. 9, 2015.

CAPODIFOGGIO, E., VIDAL, A. M. C., LIMA, J. A. S., BORTOLETTO, F., D'ABREU, L. F., GONÇALVES, A. C. S., NETTO, A. S. et al. Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 7, p. 5214-5223, 2016.

CAPORASO JG, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, BITTINGER K, BUSHMAN FD, COSTELLO EK et al. (2010b). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, v. 7, n. 5, p. 335, 2010.

CAPORASO, J. G., LAUBER, C. L., WALTERS, W. A., BERG-LYONS, D., HUNTLEY, J., FIERER, N., GORMLEY, N. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, v. 6, n. 8, p. 1621, 2012.

CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Impacto da Instrução Normativa 51 na qualidade do leite. In: *ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES*, Botucatu. Anais... Botucatu: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES FMVZ – UNESP, n. 4, p.30-37, 2007.

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

CERQUEIRA, M. M. O.; PICININ, L. C. A.; FONSECA, L. M.; et al. Qualidade da água e seu impacto na qualidade microbiológica do leite. In: *Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite*, Goiânia. Anais... Goiânia: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, p. 273-289, 2006.

CHAMPAGNE, C.P.; LAING, R. R.; Roy D., MAFU, A. A. Psicrotófilos em produtos lácteos: seus efeitos e seu controle. *Comentários críticos. Ciência dos Alimentos e Nutrição*, v. 34, n. 1, p. 1-30, 1994

CHAO A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*, p. 265-270, 1984.

CHASTRE, J., FAGON, J. Ventilator-associated pneumonia. *American Journal of Respiratory And Critical Care Medicine*, v. 165, n. 7, p. 867-903, 2002.

CHOI, J. Y., PARK, Y. S., KIM, C. O., YOON, H. J., SHIN, S. Y., KIM, Y. A., KIM, J. M. et al. Mortality risk factors of *Acinetobacter baumannii* bacteraemia. *Internal Medicine Journal*, v. 35, n. 10, p. 599-603, 2005.

CICCONI-HOGAN, K. M., GAMROTH, M., RICHERT, R., RUEGG, P. L., STIGLBAUER, K. E., e SCHUKKEN, Y. H. Associations of risk factors with somatic cell count in bulk tank milk on organic and conventional dairy farms in the United States. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 6, p. 3689-3702, 2013.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria inaccessible from Animals; Approved Standard - 3 ed. *CLSI document M31-A3*. v. 28, n. 8, 116p., 2008.

COLE, J. R., WANG, Q., CARDENAS, E., FISH, J., CHAI, B., FARRIS, R.J., KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S., MCGARRELL, D.M., MARSH, T., GARRITY, G.M. e TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. 1, p. D141-D145, 2008.

COLE, J.R., WANG, Q., FISH, J.A., CHAI, B., MCGARRELL, D.M., SUN, Y., et al. Ribosomal database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. D1, p. D633-D642, 2013.

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

- COSER, S. M., LOPES, M. A., COSTA, G. M., Mastite Bovina: Controle e prevenção. *Boletim Técnico*. n. 93, p. 1-30, Lavras, 2012.
- COSTA, M. C., WEESE, J. S. Understanding the Intestinal Microbiome in Health and Disease. The Veterinary clinics of North America. *Equine Practice*. doi: 10.1016/j.cveq.2017.11.005, 2018.
- COSTA, F. F. *Interferência de práticas de manejo na qualidade microbiológica do leite produzido em propriedades rurais familiares*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2006.
- COSTA, G. M., BARROS, R. A., da COSTA CUSTODIO, D. A., de PÁDUA PEREIRA, U., FIGUEIREDO, D. J., da SILVA, N. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.
- COSTA, L. B., RAJALA-SCHULTZ, P. J., e SCHUENEMANN, G. M. Management practices associated with presence of *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk from Ohio dairy herds. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 2, p. 1364-1373, 2016.
- COSTA, M. C., STÄMPFLI, H. R., ARROYO, L. G., ALLEN-VERCOE, E., GOMES, R. G., e WEESE, J. S. Changes in the equine fecal microbiota associated with the use of systemic antimicrobial drugs. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, p. 19, 2015.
- COSTELLO M, RHEE MS, BATES MP, CLARK S, LUEDECKE LO, KANG DH. Eleven-year trends of microbiological quality in bulk tank milk. *Food Protect Trends*, v. 23, p. 393– 400, 2003.
- COUSIN, M. A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *Journal of Food Protection*, v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.
- CRUZ, F.T., MENASCHE, R. Tradition and diversity jeopardised by food safety regulations? The Serrano Cheese case, Campos de Cima da Serra region, Brazil. *Food Policy*, v. 45, p. 116-124, 2014.
- DA CUNHA, A. F., BRAGANÇA, L. J., QUINTÃO, L. C., COELHO, K. S., DE SOUZA, F. N., e CERQUEIRA, M. M. O. P. Prevalência, etiologia e fatores de risco de mastite clínica em rebanhos leiteiros de Viçosa-MG. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 10, n. 1, p. 48-54, 2016.
- DA SILVA, J. G. *Identificação molecular de bactérias ácido-láticas e propriedades probióticas in vitro de Lactobacillus spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá*, Minas Gerais. 82 p. Dissertação Mestrado, Escola de Veterina – UFMG, 2016.
- DATTA, N., e DEETH, H. C. Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *LWT-Food Science and Technology*, v. 36, n. 2, p. 173-182, 2003.
- DE JONGHE, V., COOREVITS, A., VANHOORDE, K., MESSENS, W., VAN LANDSCHOOT, A., DE VOS, P., et al. Influence of storage conditions on the growth of *Pseudomonas* species in refrigerated raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 2, p. 460-470, 2011.
- DELTA INSTRUMENTS: CombiscopeFTIR – analisador automático para gordura, proteína, lactose, sólidos, ponto de congelamento e CCS. *Guia do usuário*. The Netherlands. 2ª Revisão. 2008.
- DEMME, B., e S. ABEGAZ. Isolation and identification of major bacterial pathogen from clinical mastitis cow raw milk in Addis Ababa, Ethiopia. *Academic Journal Animal Diseases*, v. 4, p. 44-51, 2015.

DESANTIS, T. Z., HUGENHOLTZ, P., LARSEN, N., ROJAS, M., BRODIE, E. L., KELLER, K., et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.

DIAS, R. V. C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. *Acta Veterinaria Brasileira*, v.1, n. 1, p. 23-27, 2007.

DOUTERELO I, SHARPE RL, BOXALL JB. Influence of hydraulic regimes on bacterial community structure and composition in an experimental drinking water distribution system. *Water Research*, v. 47, n. 2, p. 503-516, 2013.

DU PREEZ, J.H. Bovine mastitis therapy and why it fails. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 71, n. 3, p. 201-208, 2000.

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

EDGAR RC, HAAS BJ, CLEMENTE JC, QUINCE C AND KNIGHT R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, v. 27, n. 16, p. 2194-2200, 2011.

EDGAR, Robert C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

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

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

EMANUELSON, U.; NIELSEN, C. Weak associations between mastitis control measures and bulk milk somatic cell counts in Swedish dairy herds. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 8, p. 6572-6576, 2017.

ENEROTH, Å., CHRISTIANSSON, A., BRENDEHAUG, J., MOLIN, G., 1998. Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *International Dairy Journal*, v. 8, n. 9, p. 829-834, 1998.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the internet. *International Journal Systematic Bacterial.*, v.47, n. 2, p.590-592, 1997. (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Last full update March 02/2007. Disponível em: URL: <http://www.bacterio.net>, Acessado em: 10/03/2017.

FEDERHEN, S. The NCBI Taxonomy database. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. D1, p. D136-D143, 2011.

FOLLY, M. M.; MACHADO, S. C. A. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando-se métodos de inibição microbiana, enzimático e imunoensaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do estado do rio de janeiro, Brasil. *Ciência Rural*, v. 31, n. 1, p. 95-98, 2001.

FOSS ELETRIC: BactoScan FC. Analisador automático para contagem bacteriana total (CBT). *Reference Manual*. 172p. Hilerod, Dinamarca, 2001.

FOULQUIÉ-MORENO, M. R. et al. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

FRANÇA, M. M., DEL VALLE, T. A., CAMPANA, M., VERONESE, L. P., NASCIMENTO, G., e MORAIS, J. P. G. Mastitis causative agents and SCC relationship with milk yield and composition in dairy cows. *Archivos De Zootecnia*, v. 66, n. 253, 2017.

FRANCO, B.D.G.M. Foodborne diseases in Southern South America. *Food Science And Technology*, p. 733-744, 2003.

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

GANDA, E. K., BISINOTTO, R. S., LIMA, S. F., KRONAUER, K., DECTER, D. H., OIKONOMOU, G., BICALHO, R. C. et al. Longitudinal metagenomic profiling of bovine milk to assess the impact of intramammary treatment using a third-generation cephalosporin. *Scientific Reports*, v. 6, p. 37565, 2016.

GAO, J. Barkema, H. W., Zhang, L., Liu, G., Deng, Z., Cai, L., Han, B. et al. Incidence of clinical mastitis and distribution of pathogens on large Chinese dairy farms. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 6, p. 4797-4806, 2017.

GARRITY, George M.; HOLT, John G. The road map to the manual. In: *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York: Berlín: Springer- Verlag, v.1, p.119-166, 2001.

GOMES, B. C. et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, v. 25, n. 5, p. 668-675, 2008.

GOMEZ-ALVAREZ, V., REVETTA, R.P., SANTO DOMINGO, J.W. Metagenomic analyses of drinking water receiving different disinfection treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 17, p. 6095-6102, 2012.

GOTELLI, N.J. e COLWELL, R.K. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*, v. 4, n. 4, p. 379-391, 2001.

GRÖHN, Y. T., WILSON, D. J., GONZÁLEZ, R. N., HERTL, J. A., SCHULTE, H., BENNETT, G., e SCHUKKEN, Y. H. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 10, p. 3358-3374, 2004.

HALL, B.G. Snp-associations and phenotype predictions from hundreds of microbial genomes without genome alignments. *PLoS One*, v. 9, n. 2, p. e90490, 2014.

HALTIA, L., HONKANEN-BUZALSKI, T., SPIRIDONOVA, I., OLKONEN, A. AND MYLLYS, V. A study of bovine mastitis, milking procedures and management practices on 25 Estonian dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 48, n. 1, p. 22, 2006.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 69, n. 1, p. 195-195, 2005.

HANTSIS-ZACHAROV, E. e HALPERN, M. *Chryseobacterium haifense* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 57, n. 10, p. 2344-2348, 2007.

- HANTSIS-ZACHAROV, E., HALPERN, M., Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 73, n. 22, p. 7162-7168, 2007.
- HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Sciences*, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.
- HIGHLANDER, S. K. High throughput sequencing methods for microbiome profiling: application to food animal systems. *Animal Health Research Reviews*, v. 13, n. 1, p. 40-53, 2012.
- HILLERTON, J.E.; BERRY, E.A. The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. *Veterinary Clinical Food Animal Practice*, v. 19, n. 1, p. 157-169, 2003.
- HOGAN, J.S.; GONZÁLEZ, R.N.; HARMON, R.J.; NICKERSON, S.C.; OLIVER, S.P.; PANKEY, J.W.; SMITH, K.L. Laboratory handbook on bovine mastitis. Verona: *National Mastitis Council*, p. 222, 2005.
- HOLINGER EP, ROSS KA, ROBERTSON CE, STEVENS MJ, HARRIS JK, PACE NR. Molecular analysis of point-of-use municipal drinking water microbiology. *Water Research*, v. 49, p. 225-235, 2014.
- HOLLAND, J. K., J. C. HADRICH, C. A. WOLF, AND J. LOMBARD. Economics of measuring costs due to mastitis-related milk loss. In.: *AAEA e WAEA Joint Annual Meeting*, San Francisco, CA, 2015.
- HOLT, et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 5a edição, Baltimore, 1994.
- HONG, CHEN, SI, Y.X., XING, Y., LI, Y., Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 14, p. 10788-10799, 2015.
- HOOD L. Tackling the microbiome. *Science*, v. 336, p. 1209. 2012.
- HUGENHOLTZ P, HUBER T. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, v. 53, n. 1, p. 289-293, 2003.
- HURLBERT, S.H. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*, v. 52, n. 4, p. 577-586, 1971.
- HWANG, C., LING, F., ANDERSEN, G.L., LECHEVALLIER, M.W., LIU, W.T. Microbial community dynamics of an urban drinking water distribution system subjected to phases of chloramination and chlorination treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 22, p. 7856-7865, 2012.
- IDF. International IDF Standard 141C: Whole milk – determination of milkfat, protein and lactose content. *Guidance on the operation of mid-infrared instruments*. Brussels, 15f, 2000.
- IDF. International IDF Standard 148A:1995: *Milk – Enumeration of somatic cell*. Brussels, 8f, 1995.
- INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. *Laboratory methods for use in mastitis work*. Brussels, 27p. Boletim 132, 1981.

IRAMAIN, M. S., POL, M., KOROL, S., HERRERO, M. A., FORTUNATO, M. S., BEARZI, C., MALDONADO MAY, V. et al. *Pseudomonas aeruginosa* en agua y leche cruda: informe preliminar. *InVet*, v. 7, n. 1, p. 133-137, 2005.

ISO 21187/International Dairy Federation (IDF) 196–Milk –*Quantitative determination of Bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results*. Brussels,Belgium, 13p. 2004.

IZIDORO, T. B., J. G. PEREIRA, V. M. SOARES, T. L. B. SPINA, AND J. P. A. N. PINTO. Proteolytic activity of psychotropic bacteria in milk stored at different temperatures. *Revista Ceres*, v. 60, n. 4, p. 452-457, 2013.

JAMALI, H., RADMEHR, B., e ISMAIL, S. Short communication: prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 4, p. 2226-2230, 2014.

JANDA, J. M., ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 9, p. 2761-2764, 2007.

JATOBÁ, R. B. *Estabelecimento de uma curva de calibração para o equipamento Bactcount para monitoramento da qualidade do leite cru refrigerado*. 47f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2009.

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

JONASSON, J., OLOFSSON, M., MONSTEIN, H.J. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16s rDNA fragments. *Apmis*, v. 110, n. 3, p. 263-272, 2002.

JONES, G. M., AND J. M. SWISHER. Environmental streptococcal and coliform mastites. N° 404–234. *Disponível em:* <http://pubs.ext.vt.edu/category/dairy-cattle.html>., acessado: 10 dezembro de 2017.

JONGMAN, R.H.G.; TER BRAAK, C.J.F. e VAN TONGEREN, O.F.R. *Data analysis in community and landscape ecology*. 2nd ed., Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1995.

JORGENSEN, H. J., MORK, T., HOGÅSEN, H. R., e RORVIK, L. M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, n. 1, p. 158-166, 2005.

KABLE ME, SRISENGFA Y, LAIRD M, ZARAGOZA J, MCLEOD J, HEIDENREICH J, MARCO ML. The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *MBio*, v. 7, n. 4, p. e00836-16, 2016.

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

KIM, M.; LEE, K.; YOON, S.; KIM, B.; CHUN, J.; YI, H. Analytical tools and databases for metagenomics in the next-sequencing era. *Genomics and Informatics*, v. 3, p. 102-113, 2013.

KÖLJALG, U., NILSSON, R. H., ABARENKOV, K., TEDERSOO, L., TAYLOR, A. F., BAHRAM, M., DOUGLAS, B. et al. Towards a unified paradigm for sequence- based identification of fungi. *Molecular Ecology*, v. 22, n. 21, p. 5271-5277, 2013.

KOZICH, J. J., WESTCOTT, S. L., BAXTER, N. T., HIGHLANDER, S. K., e SCHLOSS, P. D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 79, n. 17, p. 5112-5120, 2013.

KUEHN, J. S., GORDEN, P. J., MUNRO, D., RONG, R., DONG, Q., PLUMMER, P. J. E PHILLIPS, G. J. Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. *Plos One*, v. 8, n. 4, p. e61959, 2013.

LACERDA, L.M., MOTA, R.A., SENA, M. J. Qualidade microbiológica da água utilizada em fazendas leiteiras para limpeza das tetas de vacas e equipamentos leiteiros em três municípios do Estado do Maranhão. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.76, n.4, p.569-575, 2009.

LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. et al. *Lactic Acid Bacteria-Microbiological and Functional Aspects*. 4 ed. New York, CRC Press, p 2; 40; 77-92, 2012.

LAMARCHE, A., MARTIN, B., HAUWUY, A., COULON, J. B., e POUTREL, B. Evolution of milk somatic cell count of cows grazing an alpine pasture according to the infection of udder by pathogens. *Annales de Zootechnie*, v. 49, n. 1, p. 45-54, 2000.

LE LOIR, Y., BARON, F. AND GAUTIER, M. Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetic Molecular Research*, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LEROY, F., DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

LIRO C.V., GRANJA R.E.P e ZOCHE F. Perfil do consumidor de leite no vale do rio São Francisco, Pernambuco. *Ciência Animal Brasileira*, v. 12, n. 4, p. 718-726, 2011.

LONGENBERGER, A. H. et al. Campylobacter jejuni infections associated with unpasteurized milk: multiple states. *Clinical Infectious Diseases*, v. 57, n. 2, p. 263-266, 2013.

MA, Y., RYAN, C., BARBANO, D. M., GALTON, D. M., RUDAN, M. A., e BOOR, K. J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 2, p. 264-274, 2000.

MAGALHÃES, H. R., EL FARO, L., CARDOSO, V. L., PAZ, C. C. P., CASSOLI, L. D., e MACHADO, P. F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n. 2, p. 415-421, 2006.

MAGNAVITA, A. P. A. *Avaliação das Características Físico-Químicas e da Presença de Resíduos de Antimicrobianos em Leite Pasteurizado nas regiões Sudoeste e Sul Bahiano*. 68f. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), 2012.

MAHMMOD, Y. S., KLAAS, I. C., KATHOLM, J., LUTTON, M., E ZADOKS, R. N. Molecular epidemiology and strain-specific characteristics of *Streptococcus agalactiae* at the herd and cow level. *Journal of Dairy Science*, v. 98, n. 10, p. 6913-6924, 2015.

MANLY, B.F.J. *Multivariate statistical methods: a primer*. 2nd ed., London, Chapman e Hall, 1994.

- MARTIN, J. G. P.- Resíduos de Antimicrobianos em Leite. *Alimentar e Nutricional*, v. 18, n. 2, p. 80-87, 2011.
- MARTINS, M.L., PINTO, C.L., ROCHA, R.B., DE ARAUJO, E.F., VANETTI, M.C., 2006. Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 111, n. 2, p. 144-148, 2006.
- MCDONALD T.J., MCDONALD J.S. Streptococci isolated from bovine intramammary infections. *American Journal of Veterinary Research*, v. 37, n. 4, p. 377-381, 1976.
- MCINNIS, E.A.; KALANETRA, K.M.; MILLS, D.A.; MAGA, E.A. Analysis of rae goat milk microbiota: impact of stage of lactation and lysozyme on microbial diversity. *Food Microbiology*, v. 46, p. 121-131, 2015.
- MEDEIROS, E. S., MOTA, R. A., SANTOS, M. V., FREITAS, M. F., PINHEIRO JÚNIOR, J. W., e TELES, J. A. A. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de Staphylococcus spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 7, p. 569-574, 2009.
- MELO, A. S. O que ganhamosco 'confundindo' riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? *Biota Neotropica*, v. 8, n. 3, p. 21-27, 2008.
- MELO, P. D. C., FERREIRA, L. M., NADER-FILHO, A., ZAFALON, L. F., e GODOY VICENTE, H. I. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de staphylococcus aureus isoladas de casos de mastite subclínica bovina. *Bioscience Journal*, p. 94-99, 2012.
- MENDES, R.S., EVANGELISTA, L.R., THOMAZ, S.M., AGOSTINHO, A.A. e GOMES, L.C. A unified index to measure ecological diversity and species rarity. *Ecography*, v. 31, n. 4, p. 450-456, 2008.
- MIGNARD, S., AND J. P. FLANDROIS. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods*, v. 67, n. 3, p. 574-581, 2006.
- MOLINA, A. L., TOBO, P. R. Uso das Técnicas de Biologia Molecular para Diagnóstico, *Einstein*, v. 2, n. 2, p. 136-9, 2004.
- MORAES, P. M. et al. Bacteriocinogenic and virulence potential of Enterococcus isolates obtained from raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology*, v. 113, n. 2, p. 318-328, 2012.
- MULLER, E. E., Qualidade do Leite, Células Somáticas e Prevenção da Mastite. *Sul-Leite: Simpósio Sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil*. v. 2, p. 206-217, 2002.
- MYLLYS, V., HOKANEN-BUZALSKI, T., HUOVINEN, P., et al. Association of changes in the bacterial ecology of bovine mastitis with changes in the use of milking machines and antibacterial drugs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 35, n. 4, p. 363-369, 1994.
- NAKAZATO T, OHTA T, BONO H. Experimental design-based functional mining and characterization of high-throughput sequencing data in the sequence read archive. *PLoS One*, v. 8, n. 10, p. e77910, 2013.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; 7th ed. NCCLS document M2-A7. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Wayne, Pa. 2000.

- NERO, L. A., MAZIERO, D., e BEZERRA, M. M. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão-PR. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 24, n. 1, p. 21-26, 2003.
- NERO, L. A., DE MATTOS, M. R., BELOTI, V., BARROS, M. A. F., E FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 2, 2007.
- NERO, L. A.; VIÇOSA, G. N.; PEREIRA, F. E. V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 2, p. 5, 2009.
- O'CONNELL, A., RUEGG, P. L., JORDAN, K., O'BRIEN, B., e GLEESON, D. The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. *Journal of Dairy Sciences*, v. 99, n. 5, p. 3367-3374, 2016.
- OIKONOMOU, G., BICALHO, M. L., MEIRA, E., ROSSI, R. E., FODITSCH, C., MACHADO, V. S.; BICALHO, R. C. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *Plos One*, v. 9, n. 1, p. e85904, 2014.
- OIKONOMOU, G., MACHADO, V. S., SANTISTEBAN, C., SCHUKKEN, Y. H., e BICALHO, R. C. Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. *PLoS One*, v. 7, n. 10, p. e47671, 2012.
- OLIVEIRA, C. J. B.; LOPES JÚNIOR, W. D.; QUEIROGA, R. C. R. E.; GIVISIEZ, P. E. N.; AZEVEDO, P. S.; PEREIRA, W. E.; GEBREYES, W. A. Risk factors associated with selected indicators of milk quality in semiarid northeastern Brazil. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 6, p. 3166-3175, 2011.
- OLIVEIRA, M. R. M.; MEDEIROS, M.. Agentes causadores de mastite e resistência bacteriana. *Revista Científica do curso de Medicina Veterinária-FACIPLAC*, v. 2, n. 1, p. 45-60, 2015.
- OLIVER, J.D. Viable but nonculturable bacteria in food environments. In P.M. Fratamico and A.K. Bhunia (eds.), *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*, p. 99-112, 2005.
- OSTYN A., DE BUYSER M. L., GUILLIER F., GROULT J., FELIX B., SALAH S., et al.. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Eurosurveillance*, v. 15, n. 13, p. 19528, 2010.
- OULAS, A., PAVLOUDI, C., POLYMENAKOU, P., PAVLOPOULOS, G. A., PAPANIKOLAOU, N., KOTOULAS, G., ILIOPOULOS, L. ET AL. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. *Bioinformatics And Biology Insights*, v. 9, p. BBI. S12462, 2015.
- PAIVA, C.A.V.; et al. Evolução anual da qualidade do leite cru refrigerado processado em uma indústria de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, p.471-478, 2012.
- PAIVA, M. A. V. Diagnóstico microbiológico da mastite bovina. *Ciência Animal Brasileira*, p. 1-13, 2009.
- PANTOJA, J.C., REINEMANN, D.J., RUEGG, P.L. Associations among milk quality indicators in raw bulk milk. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 10, p. 4978-4987, 2009.
- PANTOJA, J.C., REINEMANN, D.J., RUEGG, P.L. Factors associated with coliform count in unpasteurized bulk milk. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 6, p. 2680-2691, 2011.

PEET, R.K. The measurement of species diversity. *Annual Review of Ecology And Systematics*, v. 5, n. 1, p. 285-307, 1974.

PEREIRA, R.V.V., LIMA, S., SILER, J.D., FODITSCH, C., WARNICK, L.D., BICALHO, R.C. Ingestion of milk containing very low concentration of antimicrobials: longitudinal effect on fecal microbiota composition in preweaned calves. *PLoS One*, v. 11, n. 1, p. e0147525, 2016.

PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras – Revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 16, p. 1-28, 2011.

PETROVSKI, K. R., HEUER, C., PARKINSON, T. J. AND WILLIAMSON, N. B. The incidence and aetiology of clinical bovine mastitis on 14 farms in Northland, New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 57, n. 2, p. 109-115, 2009

PIANA, S. C., PIANA, S. C., DE FARIÑA, L. O., FALCONI, F. A., e BUSARELLO, J. J. Avaliação da qualidade microbiológica da água de propriedades leiteiras dos municípios de Campo Bonito, Cascavel e Guaraniçua-PR. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 35, n. 1, p. 25-34, 2014.

PICININ, L.C. A. *Qualidade do leite e da água de algumas propriedades leiteiras de Minas Gerais*. 89f. Dissertação de Mestrado - Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

PIESSENS, V., E. V. COILLIE, B. VERBIST, K. SUPRE, G. BRAEM, A. V. NUFFEL, L. D. VUYST, M. HEYNDRIKX, AND S. D. VLIEGHER. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from Milk and environment of dairy cows differs between herds. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 6, p. 2933-2944, 2011.

PIESSENS, V., VAN COILLIE, E., VERBIST, B., SUPRÉ, K., BRAEM, G., VAN NUFFEL, A., DE VLIEGHER, S. et al. Distribution of coagulase-negative *Staphylococcus* species from milk and environment of dairy cows differs between herds. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 6, p. 2933-2944, 2011.

PINHEIRO de SÁ M.E.; CUNHA, M. de L.R. de S.; ELIAS A.O; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 41, p. 320-326, 2004.

PINZÓN-SÁNCHEZ, C.; CABRERA, V. E.; RUEGG, P. L. Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 4, p. 1873-1892, 2011.

PLUMED-FERRER, C., UUSIKYLÄ, K., KORHONEN, J., e VON WRIGHT, A. Characterization of *Lactococcus lactis* isolates from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, v. 167, n. 3-4, p. 592-599, 2013.

PODDER, M. P., ROGERS, L., DALEY, P. K., KEEFE, G. P., WHITNEY, H. G., e TAHLAN, K. *Klebsiella* species associated with bovine mastitis in Newfoundland. *Plos One*, v. 9, n. 9, p. e106518, 2014.

POLEGATO, E. P. S.; AMARAL, L. A. A qualidade da água na cadeia produtiva do leite: Nível de conhecimento do produtor rural. *Revista Higiene Alimentar*, v. 19, n. 129, p.15- 24, 2005.

PORTO, B. C., FUJIMOTO, G., DE FATIMA BORGES, M., BRUNO, L. M., & CARVALHO, J. D. G. Determinantes de virulência em *Enterococcus* endógenos de queijo artesanal. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, n. 1, p. 69-76. 2016.

- PRADO, P. I., LEWINSOHN, T. M., CARMO, R. D., e Hogan, D. J. Ordenação multivariada na ecologia e seu uso em ciências ambientais. *Ambiente e Sociedade*, v. 5, 2002.
- QUAST, C., PRUESSE, E., YILMAZ, P., GERKEN, J., SCHWEER, T., YARZA, P., ... & GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *QUAST, Nucleic acids research*, v. 41, n. D1, p. D590-D596, 2013.
- RAPINI, L.S.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, R.M.B.; SOUZA, M.R.; PENNA, C. F. A. M.. Qualidade microbiológica da água de propriedades leiteiras na região metropolitana de Belo Horizonte – MG. *Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.58, p.95-98, 2003.
- RASOLOFO, E. A., D. ST-GELAIS, G. LAPOINTE, e D. ROY. 2010. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 138, n. 1-2, p. 108-118, 2010.
- REZER, A. P. S. *Avaliação da Qualidade Microbiológica e Físico-Química do leite UHT integral comercializado no Rio Grande do Sul*. 73 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- REYES, J., CHAFFER, M., RODRIGUEZ-LECOMPTE, J. C., SÁNCHEZ, J., ZADOKS, R. N., ROBINSON, N., KEEFE, G. P. et al. Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* differs between countries. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 11, p. 9294-9297, 2017.
- RIEKERINK, R. G. O., BARKEMA, H. W., VEENSTRA, S., POOLE DE, DINGWELL, R.T., KEEFE, G.P. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 47, n. 6, p. 567, 2006.
- RIEKERINK, R. G. O., BARKEMA, H. W., SCHOLL, D. T., POOLE, D. E., e KELTON, D. F. Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 97, n. 1, p. 20-28, 2010.
- RIEKERINK, R. O., BARKEMA, H. W., KELTON, D. F., e SCHOLL, D. T. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 4, p. 1366-1377, 2008.
- RIEKERINK, R.O., BARKEMA, H., KELTON, D.F., KEEFE, G.P. AND SCHOLL, D.T. Risk factors for herd-level infection of contagious mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics*, Cairns, Australia, p. 598. 2006.
- RINKE C, SCHWIENTEK P, SCZYRBA A, IVANOVA NN, ANDERSON IJ, CHENG J-F, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, v. 499, n. 7459, p. 431, 2013.
- ROBINSON, D. A. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *British Medical Journal*, v. 282, n. 16, p. 1584, 1981.
- RODRIGUES, M. X., LIMA, S. F., CANNIATTI-BRAZACA, S. G., e BICALHO, R. C. The microbiome of bulk tank milk: characterization and associations with somatic cell count and bacterial count. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 4, p. 2536-2552, 2017.
- RODRIGUES, M. X., LIMA, S. F., HIGGINS, C. H., CANNIATTI-BRAZACA, S. G., e BICALHO, R. C. The Lactococcus genus as a potential emerging mastitis pathogen group: A report on an outbreak investigation. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 12, p. 9864-9874, 2016.

- ROMA JUNIOR, L. C., MONTOYA, J. F.G., MARTINS, T.T., CASSIOLI, L. D., MACHADO, P. F.. Sazonalidade do teor de proteína e outros componentes do leite e sua relação com o programa de pagamento por qualidade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, n. 6, p. 1411- 1418, 2009.
- ROMERO, B., MOROSINI, M., LOZA, E., RODRIGUEZ-BANOS, M., NAVAS, E., CANTON, R., DEL CAMPO, R., Reidentification of *Streptococcus bovis* isolates causing bacteremia according to the new taxonomy criteria: still an issue? *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 9, p. 3228-3233, 2011.
- ROSS MG, RUSS C, COSTELLO M, et al. Characterizing and measuring bias in sequence data. *Genome Biology*, v. 14, n. 5, p. R51, 2013.
- RUEGG, P. L. Practical food safety interventions for dairy production. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. E1-E9, 2003.
- RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 12, p. 10381-10397, 2017.
- RYSANEK, D., BABAK, V., e ZOUHAROVA, M. Bulk tank milk somatic cell count and sources of raw milk contamination with mastitis pathogens. *Veterinarni Medicina*, v. 52, n. 6, p. 223, 2007.
- SALOMÃO, V.S.C. *Influência de diferentes tipos de micro-organismos na contagem bacteriana total e de células somáticas por citometria de fluxo e na composição centesimal do leite cru*. 2012. 49f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2012.
- SAMPAIO, V. S. C., SOUZA, F. N., SARAIVA, C. J. C., SANTOS, R. P., LEITE, M. O., RESENDE, G. M., GONÇALVES, N. C., DIONIZIO, F. L., e CERQUEIRA, M. M. O. P.. Influência de diferentes tipos de micro-organismos na contagem bacteriana total por citometria de fluxo do leite cru refrigerado. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 67, n. 2, p. 607-612, 2015.
- SANNASIDDAPPA, T. H., COSTABILE, A., GIBSON, G. R., e CLARKE, S. R. The influence of *Staphylococcus aureus* on gut microbial ecology in an *in vitro* continuous culture human colonic model system. *Plos One*, v. 6, n. 8, p. e23227, 2011.
- SANTOS, M. V. A qualidade do leite no Brasil. *Inforleite*, p30 – 32. 2013.
- SANTOS, K. M. O. et al. Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* strains: characterization of the bacteriocinogenic potential. *Annals of Microbiology*, v. 64, n. 4, p. 1463-1471, 2014.
- SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole, 2007. 313p
- SCHLOSS, P. D., GEVERS, D. e WESTCOTT, S. L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies. *Plos One*, v. 6, n. 12, p. e27310, 2011.
- SCHLOSS, P. D., WESTCOTT, S. L., RYABIN, T., HALL, J. R., HARTMANN, M., HOLLISTER, E. B., SAHL, J. W. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SCHMID D., FRETZ R., WINTER P., MANN M., HÖGER G., STÖGER A., et al.. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. *Wiener Klinische Wochenschrift*, v. 121, n. 3-4, p. 125-131, 2009.

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

SCHWARTZ, T., KOKNEN, W., Obst, U., e JANSEN, B. Detection of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 43, n. 3, p. 325-335, 2003.

SEARS, P. M., B. S. SMITH, P. B. ENGLISH, P. S. HERER, AND R. N. GONZALEZ. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, v. 73, n. 10, p. 2785-2789, 1990.

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

SIMBERLOFF, D. Rarefaction as a distribution-free method of expressing and estimating diversity. In *Ecological diversity in theory and practice* (edited by J.F. Grassle). *International Co-operative Publishing House*, p.159-176, 1979.

SINCLAIR, L., OSMAN, O. A., BERTILSSON, S., e EILER, A. Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: evaluating the illumina platform. *Plos One*, v. 10, n. 2, p. e0116955, 2015.

SMITH, B., *Tratado de medicina interna de grandes animais*. Volume 2, São Paulo, Manole, p.1045-1056, 1994.

SMITH, K. L., HOGAN, J. S. Environmental mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 9, n. 3, p. 489-498, 1993.

SOBER, ELLIOTT. A likelihood justification of parsimony. *Cladistics*, v. 1, n. 3, p. 209-233, 1985.

SORHAUG, T., e STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. *Trends in Food Science e Technology*, v. 8, n. 2, p. 35-41, 1997.

SOUZA G.N., BRITO J.R.F., MOREIRA E.C., BRITO M.A.V.P., BASTOS R.R. 2005. Fatores de risco associados à alta contagem de células somáticas do leite do tanque em rebanhos leiteiros da Zona da Mata de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 1, p. 251-260, 2005.

TAKAHASHI, F. H.; CASSOLI, L. D.; ZAMPAR, A.; MACHADO, P. F. Variação e monitoramento da qualidade do leite através do controle estatístico de processos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 13, n. 1, p. 99-107, 2012.

TAO, S., ORELLANA, R. M., WENG, X., MARINS, T. N., DAHL, G. E., e BERNARD, J. K. Symposium review: The influences of heat stress on bovine mammary gland function. *Journal of Dairy Science*, <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13727>.

TAYLOR, E. V. et al. Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997-2008. *Epidemiology and Infection*, v. 141, n. 5, p. 987-996, 2013.

- TEH, K. H., LINDSAY, D., PALMER, J., ANDREWES, P., BREMER, P., e FLINT, S. Proteolysis in ultra-heat-treated skim milk after exposure to multispecies biofilms under conditions modelling a milk tanker. *International Journal of Dairy Technology*, v. 67, n. 2, p. 176-181, 2014.
- TENHAGEN, B., KOSTER, G., WALLMANN, J. AND HEUWIESER, W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science*, v. 89, n. 7, p. 2542-2551, 2006.
- TOLLE, A. The microflora of the udder. p 4. In Factors Influencing the Bacteriological Quality of Raw Milk. *International Dairy Federation Bulletin*, v. 120, 1980.
- TOZZETTI, D. S.; BATAIER NETO, M.; ALMEIDA, L. R.; PICCININ, A. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária*, v. 6, n. 10, 2008.
- VACHEYROU, M., NORMAND, A.C., GUYOT, P., CASSAGNE, C., PIARROUX, R., BOUTON, Y. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology*, v. 146, n. 3, p. 253-262, 2011.
- VAN DE PEER, Y., CHAPELLE, S., DE WACHTER, R.A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research*, v. 24, n. 17, p. 3381-3391, 1996.
- VITHANAGE, N. R., DISSANAYAKE, M., BOLGE, G., PALOMBO, E. A., YEAGER, T. R., e DATTA, N. Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal*, v. 57, p. 80-90, 2016.
- VON NEUBECK, M., BAUR, C., KREWINKEL, M., STOECKEL, M., KRANZ, B., STRESSLER, T., WENNING, M. et al. Biodiversity of refrigerated raw milk microbiota and their enzymatic spoilage potential. *International Journal of Food Microbiology*, v. 211, p. 57-65, 2015.
- WANG, X., JORDAN, I. K., MAYER, L. W. A phylogenetic perspective on molecular epidemiology. In: *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). p. 517-536, 2015.
- WANG, Y.; QIAN, P. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *Public Library of Science*, v. 4, n. 10, e7401, 2009.
- WERNER, B., P. MORONI, G. GIOIA, L. LAVIN-ALCONERO, A. YOUSAF, M. E. CHARTER, B. M. CARTER, J. BENNETT, D. V. NYDAM, F. WELCOME, AND Y. H. SCHUKKEN. Short communication: Genotypic and phenotypic identification of environmental streptococci and association of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* with intramammary infections among different dairy farms. *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 6964-6969, 2014.
- WHELEHAN, C.J., MEADE, K.G., ECKERSALL, P.D., YOUNG, F.J. e O'FARRELLY, C. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region-specific changes in innate immune gene expression. *Veterinary Immunology And Immunopathology*, v. 140, n. 3-4, p. 181-189, 2011.
- WILSEY, B.J., CHALCRAFT, D.R., BOWLES, C.M. e WILLIG, M.R. Relationships among indices suggest that richness is an incomplete surrogate for grassland biodiversity. *Ecology*, v. 86, n. 5, p. 1178-1184, 2005.

WILSON, D. J., GONZALEZ, R. N., AND H. H. DAS. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *Journal of Dairy Science*, v. 80, n. 10, p. 2592-2598, 1997.

WHIST, A. C.; OSTERÅS, O.; SOLVEROD, L. *Streptococcus dysgalactiae* isolates at calving and lactation performance within the same lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 2, p. 766-778, 2007.

WOLDA, H. 1983. Diversity, diversity indices and tropical cockroaches. *Oecologia*, v. 58, n. 3, p. 290-298, 1983.

WYDER, A.B., BOSS, R., NASKOVA, J., KAUFMANN, T., STEINER, A., GRABER, H.U., *Streptococcus* spp. and related bacteria: their identification and their pathogenic potential for chronic mastitis – a molecular approach. *Research In Veterinary Science*, v. 91, n. 3, p. 349-357, 2011.

YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P-Q. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, v. 17, n. 1, p. 135, 2016.

ZENI, M. T. et al. Influência dos microrganismos psicrotóxicos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT. *Unoesc e Ciência-ACET*, v. 4, n. 1, p. 61-70, 2013.

ZHANG, F., WANG, Z., LEI, F., WANG, B., JIANG, S., PENG, Q., SHAO, Y. et al. Bacterial diversity in goat milk from the Guanzhong area of China. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 10, p. 7812-7824, 2017.

ZHANG, Z., LI, X. P., YANG, F., LUO, J. Y., WANG, X. R., LIU, L. H., e LI, H. S. Influences of season, parity, lactation, udder area, milk yield, and clinical symptoms on intramammary infection in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 99, n. 8, p. 6484-6493, 2016.

ZHOU, H. W., LI, D. F., TAM, N. F. Y., JIANG, X. T., ZHANG, H., SHENG, H. F., ZOU, F. et al. BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity. *The ISME Journal*, v. 5, n. 4, p. 741, 2011.

ZIMERMANN, K. F., ARAUJO, M. E. M. MASTITE BOVINA: agentes etiológicos e susceptibilidade a antimicrobianos. *Campo Digital*, v. 12, n. 1, 2017.

14. Animais com mastite são ordenhados por último: () sim () não

15. Realizou descarte de vacas nos últimos meses: () sim () não

16. Rotina de limpeza:

() Detergente alcalino clorado

() Detergente ácido

() Cloro

() Detergente neutro

17. Análise de água: () sim () não

18. Identificação do animal com mastite: () sim () não

19. Tratamento imediato do animal com mastite: () sim () não

20. Faz anotação dos casos de mastite do dia: () sim () não

21. Realiza cultura microbiológica: () sim () não

22. Destino do leite de descarte por tratamento de mastite: _____

23. Utiliza medicamento na secagem do animal: () sim () não

a) Forma da secagem: _____