

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Validação do Sistema CBTTest para avaliação da qualidade
microbiológica de colostro**

Giulia Gobbo Rodrigues

Trabalho de conclusão de curso apresentado como
parte dos requisitos para obtenção do título de:
Engenheira Agrônoma

**Piracicaba
2020**

Giulia Gobbo Rodrigues

**Validação do Sistema CBTesT para avaliação da qualidade microbiológica de
colostro**

Orientador(a):
Prof^a Dr^a **CARLA MARIS MACHADO BITTAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Engenheira Agrônoma

**Piracicaba
2020**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos meus familiares e amigos que me acompanharam nesta jornada, cada qual com seus conselhos certeiros, cobranças sensatas e companhias inigualáveis.

Às pessoas que convivi nos bem vividos anos de graduação e às que estiveram ao meu lado durante o intercâmbio, momentos desafiadores e de grande aprendizado profissional e pessoal.

Aos amigos que se esforçaram para se fazerem presentes mesmo afastados fisicamente, que compartilharam seu tempo e experiências, que doaram um pouco de si e levam um pouco de mim.

À Gloriosa Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, a qual devo toda minha gratidão pelos anos de muito aprendizado na Engenharia Agronômica, de extremo crescimento pessoal, oportunidades e amizades que levarei por toda minha vida.

À professora Dra. Carla Maris Machado Bittar por ter me concedido a oportunidade de ser sua orientada, por todo auxílio na realização deste trabalho e pela porta sempre aberta.

Aos grupos de estágio o qual tive o privilégio de participar, especialmente ao Clube de Criação de Bezerras (CCB) por toda a ajuda na execução das atividades do trabalho, companheirismo no dia-a-dia e parceria em momentos de lazer.

Por fim, a todos amigos que contribuíram de alguma forma para minha formação como Engenheira Agrônoma e como pessoa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO	13
2.1 Colostrogênese.....	13
2.2 Qualidade do colostro.....	13
2.2.1 Concentração de imunoglobulinas.....	14
2.2.2 Qualidade microbiológica.....	14
2.3 Transferência de Imunidade Passiva.....	15
2.4 Contaminação por microrganismos.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Locais de coleta.....	17
3.2 Coleta de amostras.....	17
3.3 Padrão Ouro.....	19
3.4 CBTTest.....	21
3.5 Concordância entre os métodos CBTTest e Padrão Ouro.....	24
3.6 Validação da IA na contagem de UFC.....	25
3.7 Análise estatística dos resultados.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	25
4.1 Comparação entre métodos.....	32
4.2 Comparação entre os meios de contagem.....	36
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
REFERÊNCIAS.....	39
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	41

RESUMO

Validação do Sistema CBTTest para avaliação da qualidade microbiológica de colostro

O colostro bovino de boa qualidade é essencial para garantir o desenvolvimento saudável de bezerros através da transferência de imunidade passiva bem sucedida. Existe forte correlação entre a contaminação do colostro por microrganismos e a falha na transferência de imunidade passiva. Isso devido à possibilidade das bactérias se ligarem a macromoléculas de proteínas, como as imunoglobulinas, tornando-as indisponíveis para absorção no intestino do bezerro. Portanto, medir a qualidade microbiológica do colostro é tão importante quanto quantificar a quantidade de imunoglobulinas. O objetivo deste estudo foi validar o Sistema CBTTest, um método de mensuração da carga microbiana no colostro bovino, com os resultados obtidos através da metodologia de avaliação referência. As amostras ($n = 20$) foram coletadas em quatro diferentes áreas do estado de São Paulo, Brasil, sendo metade de colostro fresco e a outra metade de colostro congelado. A principal diferença entre os métodos utilizados para a avaliação da qualidade microbiológica foi o diluente utilizado, sendo água destilada para o método referência e solução salina (0,9%) para o Sistema CBTTest. Os resultados das placas foram analisados por contagem visual e inteligência artificial, e essas diferenças também foram avaliadas. A maioria das placas apresentou valores de Contagem Bacteriana Total (CBT) acima de 300 mil UFC/mL. Para avaliação estatística foi utilizado diagrama de dispersão e considerados os valores de CBT e logaritmo de CBT (logCBT). A comparação entre os métodos pelos valores de logCBT resultou em coeficiente de determinação $R^2 = 0,815$, indicando uma correlação considerável e possibilitando a validação deste sistema. Provavelmente o número restrito de amostras avaliadas e a alta carga microbiana foram fatores limitantes para uma correlação maior. A contagem através da inteligência artificial mostrou-se muito eficiente ($R^2 = 0,915$ para CBT e $R^2 = 0,975$ para logCBT) principalmente para valores de CBT próximos do limite aceitável por estar dentro da janela de leitura ideal do algoritmo.

Palavras-chave: colostro bovino, qualidade do colostro, qualidade

ABSTRACT

Agreement analysis between CBTest System and golden standard method for evaluation of colostrum microbiological quality

The good quality of bovine colostrum is essential to guarantee a calf's healthy development by having a successful passive immune transfer. There is a correlation between colostrum contamination with microorganisms and the failure of passive immune transfer, due to the possibility of bacteria bonding with macromolecules of protein such as immunoglobulins, becoming unavailable for absorption in calf's gut. For that reason, measuring the colostrum microbiological quality is such important as quantifying the amount of immunoglobulins. The objective of this study was to validate CBTest System, a method of measuring the microbial load in bovine colostrum, comparing the results with the golden standard values acquired from the same specimens. The samples (n=20) were collected in four different areas of São Paulo, Brazil, being half from fresh colostrum, and other half from frozen ones. The main difference between chosen methods was the sample diluent, distilled water for the golden standard and saline solution (0,9%) for CBTest System. The plates results were analyzed by visual counting and artificial intelligence, and those difference were also measured. The majority of plates showed Total Bacterial Count (TBC) values above 300 thousand CFU/mL. For statistical evaluation were used a scatter diagram and values of TBC and logarithm TBC (logTBC). The comparison between both methods using logTBC resulted in determination coefficient $R^2 = 0,815$, indicating a considerable correlation enabling the validation of this system. Probably the restricted number of samples evaluated and the high microbial load were limiting factors to a higher correlation. The artificial intelligence count was very efficient ($R^2 = 0,915$ for TBC and $R^2 = 0,975$ for logTBC) especially for values of total bacterial count close to the acceptable limit, for being within the ideal reading window of the algorithm.

Keywords: bovine colostrum, colostrum quality, microbiological quality

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Homogeneização e coleta do colostro recém ordenhado.....	18
Figura 2: Esquema da diluição seriada em 4 etapas seguindo a metodologia do padrão ouro. O diluente utilizado foi água destilada e em cada tubo Falcon foi adicionado 9 mL de diluente antes da diluição.....	19
Figura 3: Equipamentos utilizados para a diluição e inoculação de uma amostra de colostro pelo padrão ouro.....	20
Figura 4: Placas na incubadora BOD em dois estágios: 24 horas de incubação (placas à esquerda) e 0 horas de incubação (placas à direita).....	20
Figura 5: A mesma placa (PO A9-1) após o período de incubação, antes da contagem (à esquerda) e depois da contagem com auxílio de uma caneta de ponta fina (à direita).....	21
Figura 6: Etapas de diluição e inoculação pelo sistema CBTTest foram realizadas no interior do mini laboratório SmarLab (à esquerda) com auxílio do kit CBTTest (à direita) contendo tubos Falcon e ampola com solução salina (0,9%) para a diluição, pipeta Pasteur descartável, placas próprias para cálculo da CBT e suporte para tubos.....	22
Figura 7: Esquema da diluição seriada em 3 etapas do CBTTest. O diluente utilizado foi solução salina a concentração de 0,9% e em cada tubo Falcon foi adicionado 10 mL de diluente antes da diluição.....	23
Figura 8: Placa identificada com o <i>QR code</i> (à esquerda) e placas no interior da estufa microbiológica na parte inferior do SmartLab (à direita).....	23
Figura 9: Captura da tela do aplicativo após fazer a leitura da placa (OF A15-2) utilizando IA para detecção de UFC e cálculo do CBTTest (à esquerda) e a mesma placa no suporte para leitura do teste.....	24
Figura 10: Figura 10: Valores de CBT (mil UFC/mL) calculados pelos métodos CBTTest e Padrão Ouro.....	27
Figura 11: Classificação da CBT calculada pelo método Padrão Ouro. Os números indicam a quantidade de placas com valores de CBT em cada categoria, e estas estão indicadas entre parêntesis.....	32
Figura 12: Classificação da CBT calculada pelo método CBTTest. Os números indicam a quantidade de placas com valores de CBT em cada categoria, e estas estão indicadas entre parêntesis.....	32

Figura 13: : Diagrama de dispersão dos valores de logCBT pelos métodos CBTTest e Padrão Ouro.....	33
Figura 14: Placas com alta carga microbiana. Método Padrão Ouro na parte superior, da esquerda para a direita: amostra 10 duplicata 2 (CBT = 13.190 mil UFC/mL), amostra 12 duplicata 1 (CBT = 7.835 mil UFC/mL) e amostra 16 duplicata 2 (CBT = 6.695 mil UFC/mL). Método CBTTest na parte inferior, da esquerda para a direita: amostra 3 duplicata 2 (CBT = 1.435,1 mil UFC/mL), amostra 9 duplicata 1 (CBT = 1.702,4 mil UFC/mL) e amostra 16 duplicata 2 (CBT = 1.413,8 mil UFC/mL).....	35
Figura 15: Placas contaminadas que apresentaram mudança na coloração e colônias de fungos.....	35
Figura 16: Diagrama de dispersão de dados da contagem visual e inteligência artificial.....	35
Figura 17: Diagrama de dispersão de dados da contagem visual e inteligência artificial utilizando os valores da logCBT.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de equipamento para avaliação da qualidade do colostro quanto à concentração de imunoglobulinas.....	14
Tabela 2: Local, tipo e data de coleta das amostras.....	17
Tabela 3: Local de coleta, classificação do animal, volume total, valores e classificação do Brix das amostras utilizadas. Para classificação do Brix, valores $\geq 22\%$ são considerados de alta qualidade (verde) e $< 22\%$ de baixa qualidade (rosa).....	26
Tabela 4: Categorização dos valores de CBT por cor.....	28
Tabela 5: Valores de CBT das amostras coletadas no Pasto, para ambos métodos de análise: Padrão Ouro e CBTest.....	29
Tabela 6: Valores de CBT das amostras coletadas no <i>Free Stall</i> , para ambos métodos de análise: Padrão Ouro e CBTest.....	30
Tabela 7: Valores de CBT das amostras coletadas na fazenda comercial BB, para ambos métodos de análise: Padrão Ouro e CBTest.....	31
Tabela 8: Valores de CBT das amostras coletadas na fazenda comercial denominada FT, para ambos métodos de análise: Padrão Ouro e CBTest.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBT	Contagem Bacteriana Total
CV	Contagem Visual
FTIP	Falha de Transferência de Imunidade Passiva
IA	Inteligência Artificial
Ig	Imunoglobulinas
IgG	Imunoglobulina G
logCBT	Logarítmico CBT
PO	Padrão Ouro
TIP	Transferência de Imunidade Passiva
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

1 INTRODUÇÃO

Durante a gestação, ruminantes não conseguem transferir imunoglobulinas para seus fetos através da placenta, e isso faz com que os recém-nascidos sejam totalmente dependentes do colostro, que fornecerá os anticorpos necessários para a sobrevivência e saúde nas primeiras semanas de vida do animal (TIZARD in YANAKA et al., 2012). Assim, o colostro torna-se essencial para o bom desenvolvimento dos bezerros, principalmente devido à Transferência de Imunidade Passiva (TIP) que permite que o animal tenha anticorpos circulante para se defender dos desafios até que seu sistema imune esteja maduro.

O sucesso da TIP depende de fatores como a qualidade do colostro (quantidade de imunoglobulinas nele presente e grau de contaminação por bactérias) e o volume a ser fornecido e o intervalo de tempo em que o fornecimento deve ocorrer, referente à janela de absorção das moléculas de imunoglobulina (BITTAR et al., 2018). A qualidade nutricional do colostro pode variar de acordo com a raça do animal, a alimentação no pré-parto, o sistema imunológico da matriz – uma vez que a exposição da vaca a ambientes com patógenos antes da gestação, pode contribuir para a formação de anticorpos, o volume de colostro produzido, o número de lactações da vaca, a duração do período seco, a imunização dos animais pré-parto, entre outros fatores (BITTAR et al., 2018; DONOVAN et al., 1986).

A contaminação microbiana do colostro pode torná-lo inadequado para o fornecimento, visto que as bactérias podem diminuir a absorção intestinal de macromoléculas como as imunoglobulinas (JAMES et al., 1981). Consequentemente, poderá influenciar negativamente a imunidade que o recém-nascido desenvolverá, aumentando as chances deste animal ter um sistema imunológico deficiente, o que pode gerar maiores custos com medicamentos.

A quantidade de imunoglobulinas pode ser mensurada indiretamente através de um colostrômetro, que relaciona a densidade do colostro com a quantidade de imunoglobulinas presentes; ou utilizando um refratômetro de Brix, que correlaciona a quantidade de imunoglobulinas com sólidos solúveis, e esta por sua vez com a porcentagem em Brix (FLEENOR e STOTT, 1980; BIELMANN et al., 2010; BITTAR e PAULA, 2014).

Como a boa qualidade do colostro é indispensável e há correlação desta com a presença de bactérias contaminantes, a avaliação da qualidade microbiológica na própria

fazenda pode auxiliar no controle da qualidade e na tomada de decisão quanto ao uso do colostro devido à sua classificação. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a concordância do método de análise CBT, que pode ser realizado em fazendas, com o método padrão laboratorial para a avaliação da qualidade microbiológica do colostro de vacas leiteiras.

2 REVISÃO

Os ruminantes possuem placenta do tipo sindesmocorial, que não possibilita a troca sanguínea materno-fetal. Assim, não há transferência de imunoglobulinas maternas para o feto no período pré-natal. O primeiro contato do neonato com estas proteínas será na ingestão do colostro, e por isso a colostragem de alta qualidade nas primeiras horas de vida é de extrema importância (FEITOSA, 1999; BITTAR *et al.*, 2018).

2.1 Colostrogênese

O colostro é uma secreção láctea que se acumula nas glândulas mamárias da vaca durante as últimas semanas de gestação, e é o primeiro líquido a ser ordenhado após o parto. Sua produção é estimulada por hormônios lactogênicos ainda no período seco e interrompida na hora do parto. É composto por imunoglobulinas (Ig), citocinas, leucócitos maternos, fatores de crescimento, hormônios, fatores antimicrobianos inespecíficos e nutrientes. As imunoglobulinas atuam como fontes imediatas de anticorpos, enquanto as citocinas e os leucócitos auxiliam no desenvolvimento e aumentam a rapidez da resposta imunológica a抗ígenos (BARRINGTON e PARISH, 2001; CHASE *et al.*, 2008; GODDEN, 2008).

Além dos anticorpos, a ingestão de colostro nas primeiras horas de vida fornecerá ao neonato nutrientes fundamentais para sua sobrevivência. O alto teor de lipídeos é a principal fonte de energia e atua na produção e manutenção de calor, a lactose atua como aporte energético e as demais proteínas auxiliam na absorção de nutrientes e desenvolvimento do trato gastrointestinal (SANTOS *et al.*, 2017).

As concentrações destes componentes no colostro de primeira ordenha variam entre os animais de acordo com diversos fatores. Godden (2008) relata que as características do colostro se alteram ao decorrer das ordenhas, e que em até 6 ordenhas é possível obter o leite com os atributos desejáveis para a comercialização.

2.2 Qualidade do colostro

Os bezerros nascem muito mais susceptíveis a adquirir doenças e infecções (BARRINGTON e PARISH, 2001). Para garantir transferência de anticorpos adequada aos bezerros recém nascidos e possibilitar que estes tenham bom desenvolvimento e desempenho, é imprescindível a utilização de colostros de alta qualidade. A classificação

da qualidade de um colostro pode ser referente a quantidade de Ig nele presente ou quanto a presença de microrganismos não desejáveis.

2.2.1 Concentração de imunoglobulinas

A determinação da quantidade de Ig pode ser realizada utilizando um colostrômetro ou um refratômetro de Brix, óptico ou digital. O colostrômetro é um hidrômetro que mede a densidade do colostro, a qual tem relação direta com a quantidade de Ig presente. Seus resultados podem ser afetados pela temperatura do colostro no momento da mensuração e são expressos em miligramas por litro, sendo classificado como de alta qualidade quando a leitura é superior a 50 mg de Ig/mL (FLEENOR e STOTT, 1980).

O refratômetro de Brix é utilizado para medir o teor de sacarose em líquidos. Contudo, na ausência de sacarose existe uma alta correlação entre a porcentagem de Brix e o teor de sólidos totais. Essa porcentagem de Brix, por sua vez, pode ser associada com a concentração de imunoglobulina G (IgG) do colostro. Os resultados são expressos em porcentagem e o colostro é classificado como de alta qualidade – concentração de IgG superior a 50 mg/mL - quando a leitura no refratômetro é 22% de Brix (BIELMANN *et al.*, 2010; BITTAR e PAULA, 2014).

Tabela 1: Tipos de equipamento para avaliação da qualidade do colostro quanto à concentração de imunoglobulinas.

Equipamento	Método	Classificação
Colostrômetro	Relação entre a quantidade de Ig e densidade do colostro	Alta qualidade > 50 mg de Ig/mL Moderado 20 - 50 mg de Ig/mL Baixa qualidade < 20 mg de Ig/mL
Refratômetro de Brix	Relação entre Brix e teor de IgG presente no colostro	Alta qualidade > 22% de Brix

2.2.2 Qualidade microbiológica

A qualidade microbiológica do colostro pode ser mensurada através da Contagem Bacteriana Total (CBT) em placas específicas, de acordo com o método referência para inspeções de produtos lácteos (*Standard Methods for the Examination of Dairy Products* - APHA, 1992). Os resultados são expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mililitro de colostro.

Valores para CBT de até 50.000 UFC/mL de colostro classificam a amostra como sendo de ótima qualidade, entre 50.000 e 100.000 UFC/mL de boa qualidade e ainda

aceitáveis. Os valores acima de 100.000 UFC/mL são classificados como baixa qualidade e já não são recomendados para a ingestão por bezerros, pois com o aumento da carga microbiana não há garantia do sucesso da Transferência de Imunidade Passiva (TIP) (GODDEN, 2008; SANTOS *et al.*, 2017; JAMES *et al.*, 1981).

Segundo Guzman-Carazo *et al.* (2020), além da presença de microrganismos indesejáveis no colostro diminuírem a absorção de IgG, eles aumentam o risco de contaminação por patógenos. Esta redução ocorre, pois, as bactérias presentes no colostro se ligam com as Ig livres presentes no lúmen intestinal, ou bloqueiam a absorção e transporte das mesmas pelas células do epitélio intestinal (JAMES *et al.*, 1981; STEWART *et al.*, 2005; GODDEN, 2008).

2.3 Transferência de Imunidade Passiva

Além dos fatores nutricionais, o colostro irá fornecer ao recém-nascido anticorpos através da TIP. Apesar de temporária, ela garante um aporte de anticorpos necessários para o animal nas primeiras semanas de vida, até que ele desenvolva seu sistema imunológico. A Falha de Transferência de Imunidade Passiva (FTIP) está relacionada com maior susceptibilidade a enfermidades, menor produtividade individual e taxas de mortalidade mais elevadas, que por sua vez resultam em perdas econômicas (McGUIRK e COLLINS, 2004).

O sucesso da TIP depende basicamente da concentração de Ig presentes no colostro, do volume que será ingerido, da qualidade microbiológica do colostro e da eficiência de absorção dos anticorpos pelo trato gastrointestinal do animal (FEITOSA, 1999; BITTAR *et al.*, 2018).

A concentração de Ig presente no colostro e o volume total ingerido, via mamadeira ou sonda esofágica, podem ser controlados antes do fornecimento. Segundo Godden (2008), a qualidade microbiológica do colostro afeta na eficiência de absorção dos anticorpos, e portanto demanda atenção. Quando comprometida, devem ser tomadas medidas relacionadas a sanidade dos equipamentos e utensílios usados entre a ordenha e o fornecimento.

2.4 Contaminação por microrganismos

A contaminação do colostro por microrganismos pode ocorrer ainda nas glândulas mamárias, ao entrar em contato com patógenos presentes neste meio, ou então ocorrer durante sua manipulação e armazenamento (SANTOS *et al.*, 2017). No segundo caso, a

contaminação pode ocorrer quando o colostro entra em contato com os equipamentos de ordenha, recipientes de coleta, utensílios usados no fornecimento, armazenagem, e descongelamento, que carecem de cuidados com a higiene ou não possuem locais adequados para serem mantidos.

Segundo Stewart *et al* (2005), a contaminação ocorre principalmente no segundo cenário exposto, hipótese comprovada em um estudo onde amostras de colostro coletadas direto no teto do animal após assepsia foram comparadas com amostras coletadas de um balde após ordenha. Os valores de CBT encontrados nas amostras do teto foram baixos, diferente dos valores das amostras do mesmo colostro coletadas diretamente no balde.

Gelsinger *et al.* (2015) relataram uma relação entre o tratamento térmico de colostro e o aumento da absorção de IgG, que supostamente está associada à desnaturação das bactérias nele presentes.

Um estudo comparou a eficiência de absorção de Ig de acordo com os níveis de IgG no soro após 24 horas do fornecimento de dois tratamentos, sendo um colostro cru, e o outro colostro pasteurizado. As demais variáveis como quantidade de Ig no colostro, volume e tempo entre nascimento e ingestão foram iguais para ambas situações, sendo a única diferença atrelada à presença ou não de bactérias. Os animais alimentados com colostro pasteurizado tiveram maiores taxas de eficiência de absorção de IgG (GODDEN, 2008).

Diversos autores citam, ainda, que os microrganismos presentes no colostro podem ser prejudiciais à saúde do animal recém-nascido uma vez que, desprovido de sistema imunológico maduro, estará exposto a todos os patógenos ali presentes. Entre os microrganismos que podem ser transmitidos através do colostro estão os agentes causais de importantes doenças que acometem bezerros como diarreia (*Salmonella spp.* e *Escherichia coli*), pneumonia (*Mycoplasma spp.*) e tuberculose (*Mycobacterium bovis*) (STEWART *et al.*, 2005).

Portanto, mesmo que o colostro apresente alta concentração de Ig e seja classificado como de alta qualidade, a contaminação microbiológica pode não só diminuir a quantidade de anticorpos absorvidos efetivamente, como infectar animais em vulnerabilidade. Assim, é essencial o monitoramento da carga microbiana presente na secreção láctea para garantir sucesso na TIP, diminuir a ocorrência de patologias entre os neonatos e assegurar um bom desenvolvimento do animal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Vinte amostras de colostro ($n = 10$ frescas e $n = 10$ congeladas) foram coletadas em quatro locais distintos que tiveram o nome abreviado para manter a privacidade (Tabela 2) e processadas entre setembro e dezembro de 2020. As vacas eram da raça holandesa, e estavam alojadas em sistema *Free Stall*, composto ou em pasto no período que antecedeu o parto, e tinham acesso irrestrito a água e alimento.

3.1 Locais de coleta

Das vinte amostras de colostro de primeira ordenha, doze foram coletadas no Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, em Piracicaba, São Paulo, sendo dez provenientes de alojamento a pasto e duas provenientes do *Free Stall*. As demais amostras foram coletadas em duas fazendas comerciais: três na BB, em Piracicaba, São Paulo, e cinco na FT, em São Pedro, São Paulo.

Tabela 2: Local, tipo e data de coleta das amostras.

Amostras	Local de Coleta	Tipo de Amostra	Data de Coleta
1	Pasto	Congelada	25/09/20
2	Pasto	Fresca	02/10/20
3	Pasto	Fresca	13/10/20
4	BB	Fresca	15/10/20
5	<i>Free Stall</i>	Congelada	18/10/20
6	Pasto	Congelada	18/10/20
7	Pasto	Congelada	19/10/20
8	Pasto	Congelada	21/10/20
9	BB	Congelada	22/10/20
10	Pasto	Congelada	25/10/20
11	Pasto	Fresca	31/10/20
12	Pasto	Congelada	08/11/20
13	BB	Fresca	10/11/20
14	Pasto	Fresca	14/11/20
15	<i>Free Stall</i>	Fresca	16/11/20
16	FT	Fresca	19/11/20
17	FT	Fresca	19/11/20
18	FT	Fresca	23/11/20
19	FT	Congelada	04/11/20
20	FT	Congelada	03/11/20

3.2 Coleta de amostras

A amostragem foi realizada de forma padronizada para ambos métodos de avaliação – Padrão Ouro (PO) ou CBTTest, em até 2 horas após a ordenha. O colostro foi

ordenhado mecanicamente dentro de um balde higienizado e com tampa. Após a homogeneização, o colostro foi coletado em tubo tipo Falcon estéril previamente identificado (Figura 1).



Figura 1: Homogeneização e coleta do colostro recém ordenhado.

Tomou-se nota do volume total ordenhado utilizando uma jarra graduada higienizada, e do Brix através de um refratômetro ótico. Após a coleta, decidiu-se se a amostra seria manuseada em sequência, sendo rotulada como amostra fresca, ou congelada para avaliação posterior.

As amostras congeladas permaneceram de 3 a 30 dias em freezer convencional, e o descongelamento foi realizado em banho-maria com temperatura máxima controlada de 50 °C, mimetizando o que o produtor realiza quando faz uso de colostro do banco. Após finalizada esta fase, as amostras foram diluídas, inoculadas e incubadas do mesmo modo que as amostras frescas, de acordo com cada método de avaliação. Vale ressaltar que todas as amostras foram avaliadas por ambas metodologias, PO e sistema CBTTest. Todo o processo desde a coleta até contagem das amostras foi realizado em superfícies previamente higienizadas com álcool 70% e o operador utilizando luvas descartáveis.

3.3 Padrão Ouro

As etapas do PO foram realizadas de acordo com as indicações nos métodos padrões para inspeções de produtos lácteos (*Standard Methods for the Examination of Dairy Products* - APHA, 1992).

A diluição seriada foi realizada com água destilada conforme a Figura 2, com auxílio de uma pipeta automática de volume ajustável (*Eppendorf® Research, Alemanha*) e ponteiras estéreis descartáveis.

Após a homogeneização da amostra coletada, 1 mL de colostro foi pipetado e adicionado em um tubo Falcon (A) contendo 9 mL de água destilada, totalizando 10 mL de solução (concentração atingida de 10^{-1}). O tubo A foi invertido 20 vezes para uniformizar a solução e, em seguida, 1 mL do tubo A foi pipetado e despejado no tubo B, que já continha 9 mL de água destilada, totalizando 10 mL de solução (concentração atingida de 10^{-2}). O tubo B também foi homogeneizado e esse processo se repetiu mais duas vezes até o tubo D conter uma solução de 10 mL, com concentração de colostro equivalente a 10^{-4} .

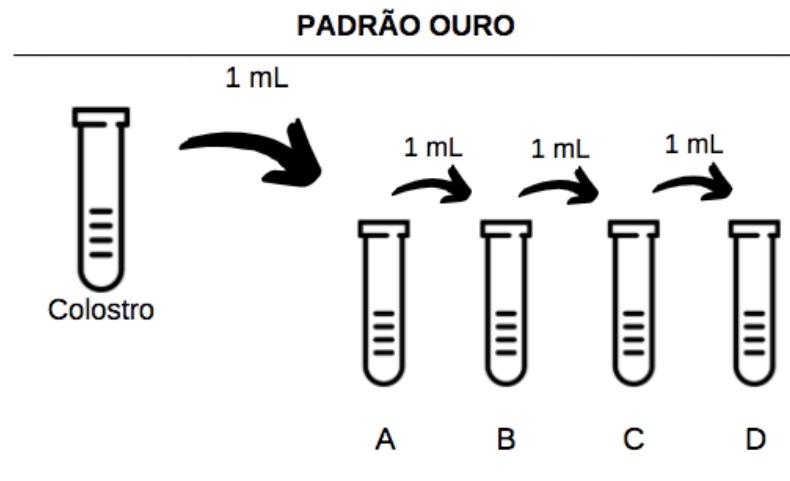


Figura 2: Esquema da diluição seriada em 4 etapas seguindo a metodologia do padrão ouro. O diluente utilizado foi água destilada e em cada tubo Falcon foi adicionado 9 mL de diluente antes da diluição.

Para a inoculação, 1 mL de colostro diluído a 10^{-4} (tubo D) foi pipetado e despejado no centro de uma placa própria para Contagem Bacteriana Total (*CompactDry®TC, Nissui Pharmaceutical Co. LTD., Japão*) previamente identificada. A mesma amostra foi inoculada em duas placas, duplicata 1 e 2, e o conteúdo incubado de ambas foi proveniente do tubo D (Figura 3).

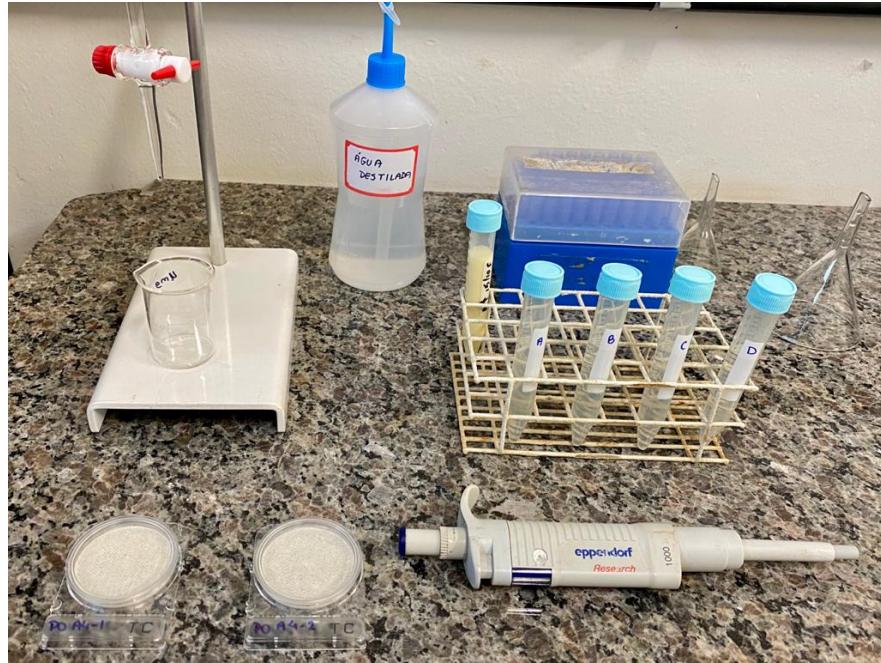


Figura 3: Equipamentos utilizados para a diluição e inoculação de uma amostra de colostrum pelo padrão ouro.

As placas foram incubadas por 48 horas em uma estufa BOD (*TE-391, Tecnal Equipamentos Científicos, Brasil*), com temperatura controlada de 36 °C com variação de ± 1 °C (Figura 4).

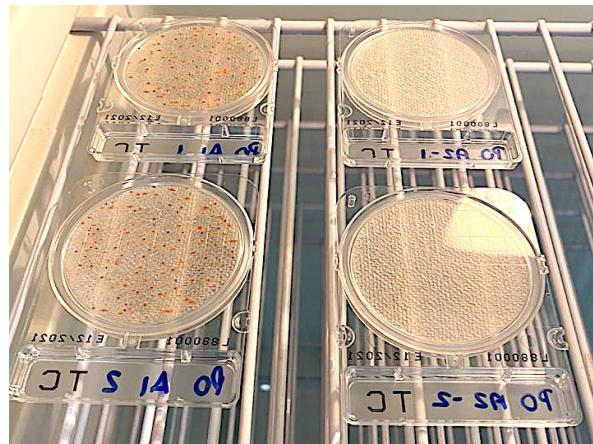


Figura 4: Placas na incubadora BOD em dois estágios: 24 horas de incubação (placas à esquerda) e 0 horas de incubação (placas à direita).

Após esse período, a leitura dos resultados se deu através da Contagem Visual (CV) de UFC. Essa contagem foi feita em cima de uma superfície plana, com fundo branco e boa iluminação (Figura 5). Cada placa foi contada 4 vezes e a média das contagens foi utilizada como valor final de UFC para cada placa.

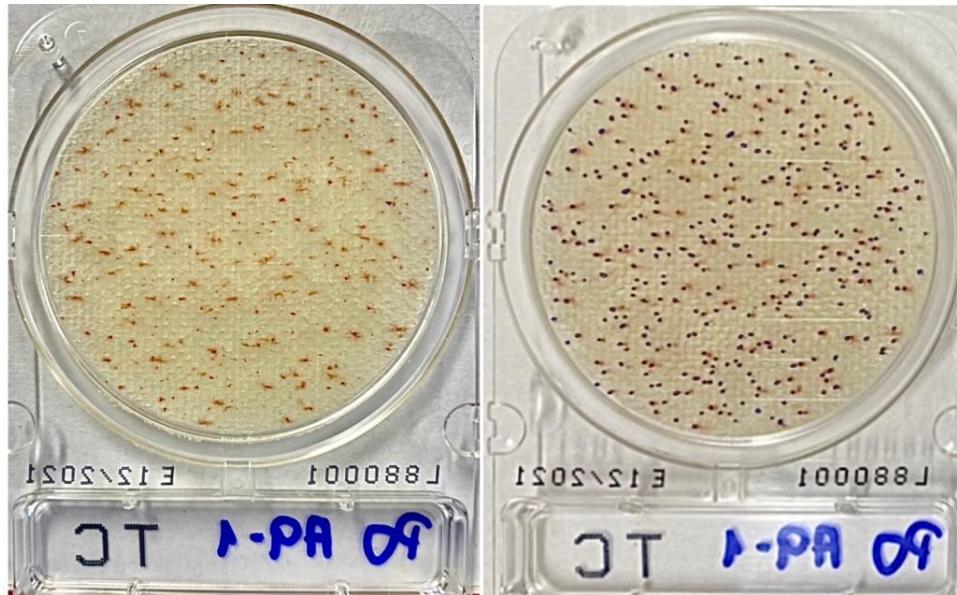


Figura 5: A mesma placa (PO A9-1) após o período de incubação, antes (à esquerda) e depois da contagem com auxílio de uma caneta de ponta fina (à direita).

Para calcular os valores de CBT referentes a cada placa, foi realizado o cálculo abaixo, que considera a taxa de diluição da amostra de 10^{-4} :

$$\text{CBT (mil UFC/mL)} = \frac{\text{nº UFC} \times 10.000}{1.000}$$

3.4 CBTest

Para a diluição, inoculação, incubação e leitura dos resultados pelo método CBTest foram seguidas as recomendações do pacote tecnológico proposto pela *OnFarm, Brasil*. Os procedimentos foram realizados no interior do mini laboratório SmartLab (*OnFarm, Brasil*), conforme ilustrado na Figura 6.

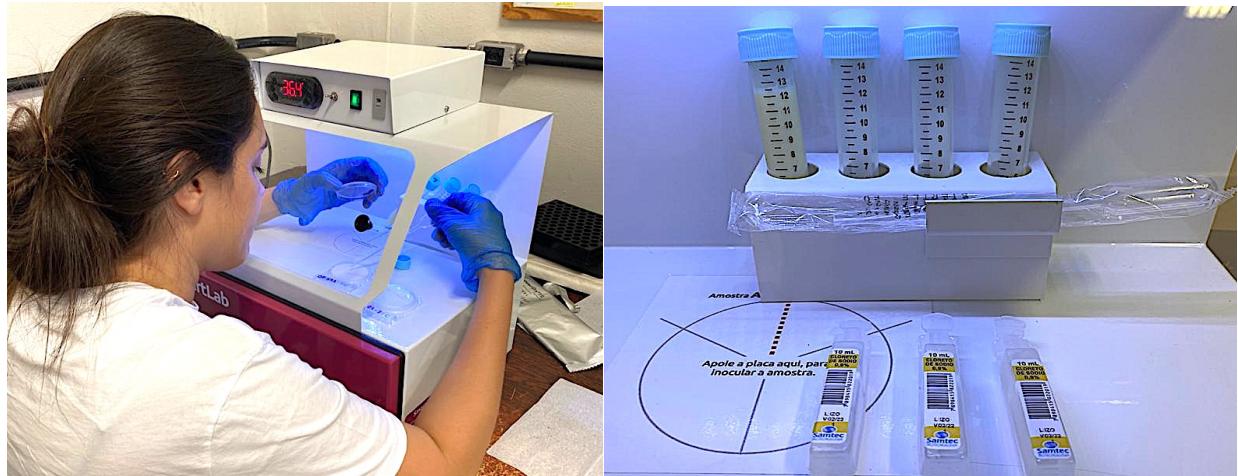


Figura 6: Etapas de diluição e inoculação pelo sistema CBTTest foram realizadas no interior do mini laboratório SmarLab (à esquerda) com auxílio do kit CBTTest (à direita) contendo tubos Falcon e ampola com solução salina (0,9%) para a diluição, pipeta Pasteur descartável, placas próprias para cálculo da CBT e suporte para tubos.

A diluição em sequência foi realizada com solução salina a concentração de 0,9% (Figura 7), e realizada com auxílio de uma pipeta Pasteur descartável graduada com volume de 1 mL, que compunha o kit.

A amostra coletada foi homogeneizada e, com auxílio da pipeta descartável, 1 mL de colostro foi mensurado e adicionado em um tubo Falcon (1) contendo 10 mL de solução salina, totalizando 11 mL de solução (concentração atingida de 9.11^{-1}). O tubo 1 foi invertido 20 vezes para uniformizar a solução e, em seguida, 1 mL dele foi pipetado e despejado no tubo 2, que já continha 10 mL do diluente. O tubo 2 então ficou com volume de 11 mL e concentração de 8.11^{-2} . Por fim, o tubo 2 foi homogeneizado e 1 mL da solução foi pipetado e despejado no tubo 3, que ficou com volume final de 11 mL e concentração de 7.11^{-3} .

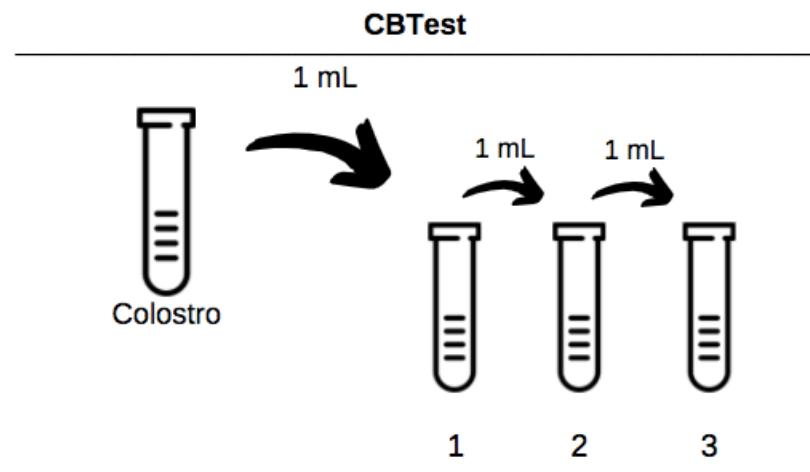


Figura 7: Esquema da diluição seriada em 3 etapas do CBTTest. O diluente utilizado foi solução salina a concentração de 0,9% e em cada tubo Falcon foi adicionado 10 mL de diluente antes da diluição.

A inoculação foi realizada com auxílio da pipeta, onde 1 mL da solução foi sugado do tubo 3 e despejado no centro de uma placa própria para Contagem Bacteriana Total (*CompactDry®TC*, *Nissui Pharmaceutical Co. LTD.*, Japão) previamente identificada. Este passo se repetiu para ambas duplicatas.

Em seguida, foi adicionado na tampa de cada placa um adesivo de identificação por *QR code* (Figura 8). As placas inoculadas pelo sistema CBTTest foram então inseridas no sistema da empresa via aplicativo próprio intitulado OnFarmApp (desenvolvido pela OnFarm Locação e Suporte de Máquinas e Equipamentos Ltda).

Uma vez identificadas e inseridas no sistema, estas placas foram incubadas na estufa microbiológica acoplada ao mini laboratório SmartLab, programada para manter a temperatura em $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e permaneceram por 48 horas até o momento da leitura.



Figura 8: Placa identificada com o *QR code* (à esquerda) e placas no interior da estufa microbiológica na parte inferior do SmartLab (à direita).

A leitura dos resultados das placas inoculadas pelo sistema CBTTest foi realizada através de dois métodos, sendo eles a contagem visual – conforme realizada no método PO, e contagem automática pelo OnFarmApp, utilizando modelo de aprendizagem profunda por redes neurais artificiais (IA).

Para a execução da leitura utilizando o aplicativo, as placas foram posicionadas no suporte para placas fornecido junto com o SmartLab, com fundo branco e em local bem iluminado. Foi feita, então, a leitura do *QR code* para identificação da placa, tirou-se uma foto e foi selecionada a opção para contagem de colônias “automático”. Após o processamento, foi obtido o número de colônias e valor de CBTTest, equivalente à CBT, em mil UFC/mL, calculados por IA para a placa em questão.



Figura 9: Captura da tela do aplicativo após fazer a leitura da placa (OF A15-2) utilizando IA para detecção de UFC e cálculo do CBTTest (à esquerda) e a mesma placa no suporte para leitura do teste.

3.5 Validação do método CBTTest

Os dois métodos de cálculo de CBT foram comparados a fim de se obter a validação do sistema CBTTest. Para isso, os dados de CBT obtidos pelo método PO foram calculados considerando os valores de UFC médios provenientes de 4 contagens visuais,

e a CBT calculada de acordo com a fórmula especificada acima (item 3.3). Para o CBTTest, foram considerados os valores de CBT fornecidos no aplicativo, calculados pela IA. Os valores de CBT foram transformados em \log_{10} , obtendo-se a logCBT, dada em $(\log_{10} \times \text{UFC/mL})$, e então comparados quando a concordância.

3.6 Validação da IA na contagem de UFC

Para esta validação foram utilizadas apenas as placas do método CBTTest, onde cada placa foi lida por CV e IA, e o cálculo da CBT pela CV seguiu a fórmula especificada no item 3.3. Os valores de CBT contabilizados pelos dois métodos de contagem foram transformados em \log_{10} e a logCBT foi então comparada.

3.7 Análise estatística dos resultados

Para análise dos resultados foram criados gráficos de dispersão e elaboradas curvas de regressão através de planilha do Excel, para comparar relação entre os valores obtidos para os métodos Padrão Ouro e CBTTest, e entre a contagem visual de UFC e a contagem utilizando IA. Foi calculado também o coeficiente de determinação, para analisar a variância dos dados explicada por um modelo linear

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados referentes ao volume total da ordenha e o Brix de cada amostra estão representados na Tabela 3. A produção média na primeira ordenha foi de 4,9 litros e o valor médio do Brix foi de 26,9%.

Tabela 3: Local de coleta, Classificação do animal, volume total, valores e classificação do Brix das amostras utilizadas. Para classificação do Brix, valores $\geq 22\%$ são considerados de alta qualidade (verde) e $< 22\%$ de baixa qualidade (rosa).

Amostra	Animal	Local	Volume (L)	Brix (%)
1	Novilha	Pasto	4,50	21
2	Vaca	Pasto	3,50	23,5
3	Novilha	Pasto	5,25	30
4	Vaca	BB	7,90	21
5	Vaca	<i>Free Stall</i>	13,90	28
6	Vaca	Pasto	8,00	25
7	Vaca	Pasto	2,35	30
8	Vaca	Pasto	7,00	30
9	Vaca	BB	4,00	29
10	Vaca	Pasto	0,90	30
11	Novilha	Pasto	5,85	18
12	Vaca	Pasto	1,80	26
13	Vaca	BB	9,10	30
14	Vaca	Pasto	5,00	30
15	Vaca	<i>Free Stall</i>	4,90	30
16	Novilha	FT	2,50	30
17	Vaca	FT	4,80	22
18	Vaca	FT	1,20	26
19	Vaca	FT	5,00	30
20	Novilha	FT	1,50	29

Apenas 3 amostras apresentaram valores de Brix inferiores a 22%, sendo classificadas como colostro de baixa qualidade quanto a concentração de Ig. Estes valores podem ser associados a novilhas nulíparas ou primíparas (amostra 1 e 11), ou devido ao elevado volume de colostro produzido (amostra 4).

De modo geral, a CBT calculada pelo PO é numericamente mais elevada do que os valores adquiridos pelo método CBTest (Figura 10). A CBT média do Padrão Ouro foi de 2.917 mil UFC/mL, enquanto para o CBTest foi equivalente a 503 mil UFC/mL.

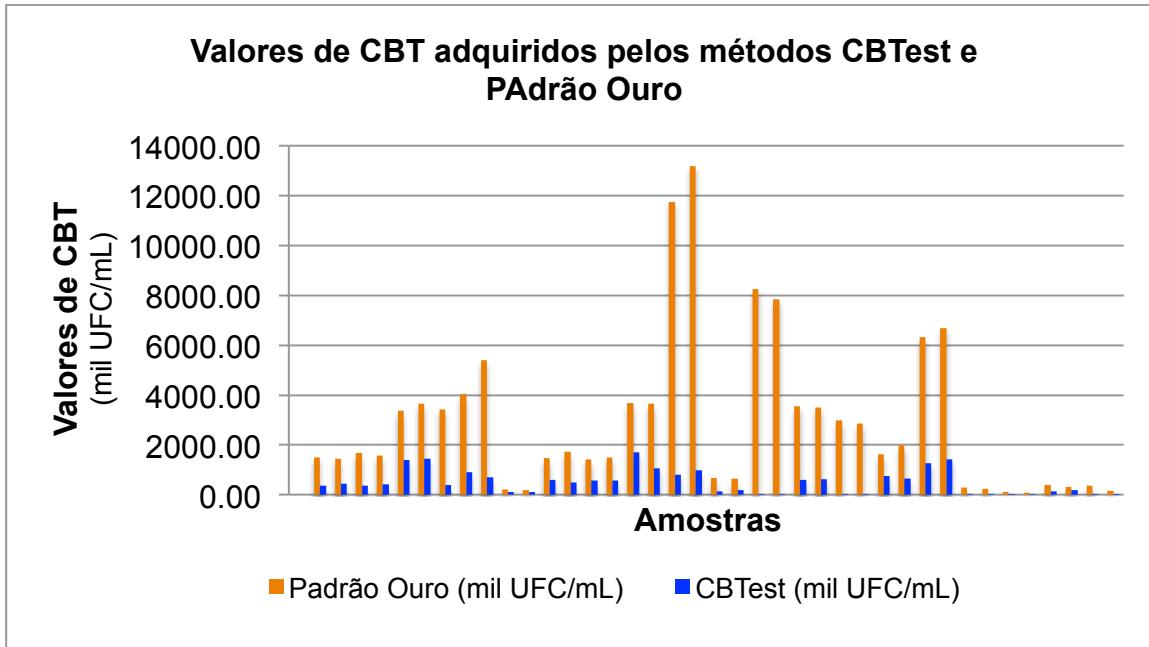


Figura 10: Valores de CBT (mil UFC/mL) calculados pelos métodos CBTTest e Padrão Ouro.

A maioria dos valores de CBT determinados via CV e utilizando IA ficaram acima do limite aceitável de 100 mil UFC/mL, estabelecido pelo *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (APHA, 1992). Assim, com a finalidade de distinguir as amostras com valores superiores a 100 mil UFC/mL por níveis de contaminação, os valores de CBT foram divididos em grupos e categorizados de acordo com seus valores.

Tabela 4: Categorização dos valores de CBT por cor.

Verde	≤ 100 mil UFC/mL
Amarelo	101 < 200 mil UFC/mL
Rosa	201 < 300 mil UFC/mL
Roxo	≥ 301 mil UFC/mL

Como exemplificado na Tabela 2, o maior número de amostras (10 de um total de 20) foi coletado no local denominado Pasto. Dessa amostras, apenas 20% das placas obtiveram valores dentro do limite aceitável para CBT, tanto pelo PO quanto pelo CBTTest, e para a CV ou IA. Para os valores de CBT acima de 200 mil UFC/mL houve divergência entre os resultados adquiridos tanto entre os métodos de cálculo da CBT quanto entre os meios de contagem de UFC (apenas para as placas do CBTTest).

Tabela 5: Valores de CBT das amostras coletadas no local denominado como Pasto, para ambos métodos de análise: Padrão Ouro e CBTTest.

ID Placa	Contagem Visual	IA (OnFarmApp)
	CBT (mil UFC/mL)	CBTest (mil UFC/mL)
PO A1-1	200,65	-
PO A1-2	193,99	-
OF A1-1	277,18	360,4
OFA1-2	281,17	438,9
PO A2-1	222,28	-
PO A2-2	210,63	-
OF A2-1	542,38	356,4
OF A2-2	522,08	417,6
PO A3-1	781,63	-
PO A3-2	901,75	-
OF A3-1	1593,87	1404,5
OF A3-2	1756,59	1435,1
PO A6-1	29,61	-
PO A6-2	25,29	-
OF A6-1	121,12	114,4
OF A6-2	116,46	115,7
PO A7-1	195,99	-
PO A7-2	229,26	-
OF A7-1	584,97	590,5
OF A7-2	573,33	492,1
PO A8-1	190,33	-
PO A8-2	197,99	-
OF A8-1	613,92	565,3
OF A8-2	563,35	562,6
PO A10-1	1562,59	-
PO A10-2	1755,59	-
OF A10-1	1451,23	806
OF A10-2	1172,94	972,2
PO A11-1	90,18	-
PO A11-2	87,18	-
OF A11-1	145,08	142,30
OF A11-2	173,36	176,90
PO A12-1	1096,41	-
PO A12-2	1042,84	-
OF A12-1	7,99	5,3
OF A12-2	5,32	5,3
PO A14-1	397,30	-
PO A14-2	381,33	-
OF A14-1	44,59	39,9
OF A14-2	49,91	41,2
Média	509,74	452,13

As duas amostras coletadas no local denominado *Free Stall* apresentaram valores de CBT acima do limite aceitável, sendo superiores a 201 mil UFC/mL para o método PO e superiores a 301 mil UFC/mL pelo CBTTest. As proporções para ambos meios de contagem de UFC foram iguais para o último método.

O elevado índice de contaminação microbiológica nas amostras coletadas na Esalq/USP, tanto em alojamento a Pasto quanto *Free Stall* podem ser relacionadas a higienização dos equipamentos e utensílios usados para a ordenha, uma vez que os animais foram ordenhados no mesmo sistema.

Quando notou-se que os valores de CBT para estas amostras muito acima do aceitável, foi adotado um novo protocolo para limpeza dos baldes e mangueiras utilizados para ordenha e amostragem, o que resultou na diminuição dos valores de CBT para algumas amostras.

Tabela 6: Valores de CBT das amostras coletadas no *Free Stall*, para ambos métodos de análise: Padrão Ouro e CBTTest.

ID Placa	Contagem Visual	IA (OnFarmApp)
	CBT (mil UFC/mL)	CBTTest (mil UFC/mL)
PO A5-1	833,87	-
PO A5-2	717,74	-
OF A5-1	841,52	828,6
OF A5-2	828,77	703,6
PO A15-1	214,96	-
PO A15-2	263,54	-
OF A15-1	716,74	742,1
OF A15-2	693,12	638,4
Média	638,78	728,17

As três amostras coletadas na fazenda comercial BB apresentaram valores de CBT superiores a 301 mil UFC/mL, independente do método ou meio de contagem de UFC utilizados (Tabela 7).

O tempo médio entre a ordenha do colostro e a coleta das amostras nesta fazenda foi entre 1 a 2 horas. Neste intervalo, o colostro ficou em um balde com tampa em local não refrigerado. Os fatores tempo e refrigeração podem ter contribuído na proliferação de microrganismos, que por sua vez resultou em altos valores de CBT.

Tabela 7: Valores de CBT das amostras coletadas na fazenda comercial BB, para ambos métodos de análise: Padrão Ouro e CBTest.

Contagem Visual		IA (OnFarmApp)
ID Placa	CBT (mil UFC/mL)	CBTest (mil UFC/mL)
PO A4-1	456,87	-
PO A4-2	536,39	-
OF A4-1	566,12	395
OF A4-2	625,57	912,4
PO A9-1	487,81	-
PO A9-2	487,15	-
OF A9-1	1543,29	1702,4
OF A9-2	1225,85	1065,3
PO A13-1	471,84	-
PO A13-2	466,85	-
OF A13-1	796,94	597,2
OF A13-2	790,95	626,4
Média	704,63	883,12

Na outra fazenda comercial, intitulada FT, foram coletadas cinco amostras de colostrato. Houve divergência dos valores de CBT encontrados tanto entre os métodos PO e CBTest, quanto entre os meios de contagem de UFC. Nas placas onde se utilizou a metodologia PO, apenas 2 placas obtiveram valores dentro dos limites aceitáveis, enquanto a maioria das placas (60%) resultou em CBT acima de 301 mil UFC/mL.

Já pelo CBTest, apenas uma das placas (10%) analisadas através da CV estava abaixo do limite, enquanto que 50% (5 placas) apresentaram valores superiores a 301 mil UFC/mL. Das placas que tiveram a CBT calculadas por IA, 60% obtiveram valores abaixo ou iguais a 100 mil UFC/mL.

Esta foi a localidade mais distante do laboratório, e o intervalo de tempo entre a ordenha e congelamento ou processamento das amostras são fatores que afetam o desenvolvimento de microrganismos. Contudo, as coletas em tubo Falcon esterilizados foram realizadas minutos após a ordenha e estes foram mantidos refrigerados, o que explica os valores numéricos médios de CBT próximos a 350 mil UFC/mL para os métodos PO e CBTest, com exceção da amostra 16 (Tabela 8). A CBT média pelo método PO foi de 1.951 mil C/mL e do CBTest de 318 mil UFC/mL, mas desconsiderando a amostra 16 esses valores caem para 375 mil UFC/mL e 63 mil UFC/mL, respectivamente.

Tabela 8: Valores de CBT das amostras coletadas na fazenda comercial denominada FT, para ambos métodos de análise: Padrão Ouro e CBTest.

ID Placa	Contagem Visual	IA (OnFarmApp)
	CBT (mil UFC/mL)	CBTest (mil UFC/mL)
PO A16-1	6312,50	-
PO A16-2	6695,00	-
OF A16-1	10840,00	1259,50
OF A16-2	9183,33	1413,80
PO A17-1	300,00	-
PO A17-2	250,00	-
OF A17-1	172,50	25,30
OF A17-2	355,00	43,90
PO A18-1	100,00	-
PO A18-2	90,00	-
OF A18-1	105,00	20,00
OF A18-2	130,00	30,60
PO A19-1	397,50	-
PO A19-2	310,00	-
OF A19-1	1222,50	134,30
OF A19-2	1720,00	191,50
PO A20-1	370,00	-
PO A20-2	172,50	-
OF A20-1	100,00	27,90
OF A20-2	205,00	30,60
Média	1951,54	317,74

4.1 Comparação entre métodos

Os valores de CBT pelo PO foram majoritariamente altos, com apenas duas placas provenientes da mesma amostra (18) com valores dentro dos aceitáveis, o que representa 5% do total. Foram 3 as placas com valores entre 201 e 300 mil UFC/mL e 33 com valores superiores a 301 mil UFC/mL (82,5%), sendo o valor médio de CBT para as placas acima deste limite equivalente a 3.600 mil UFC/mL.

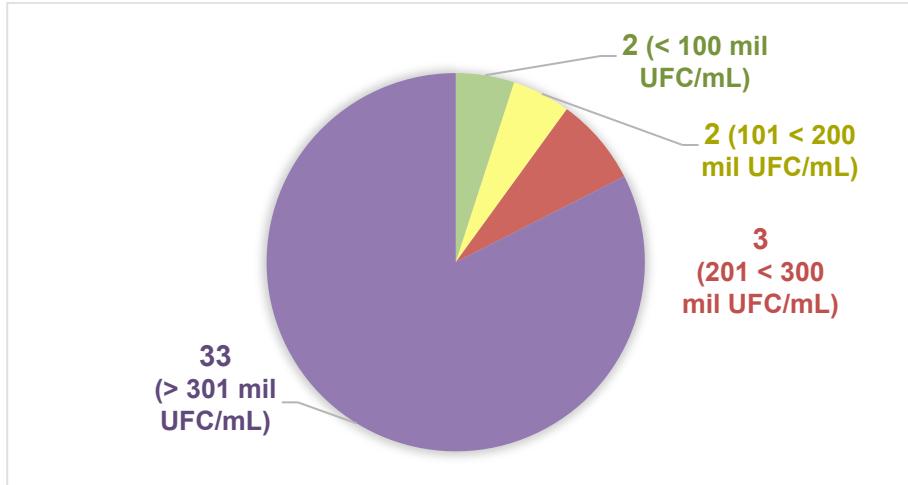


Figura 11: Classificação da CBT calculada pelo método Padrão Ouro. Os números indicam a quantidade de placas com valores de CBT em cada categoria, e estas estão indicadas entre parêntesis.

As placas resultantes do CBTTest apresentaram classificações melhores, onde 10 atingiram CBT inferior a 100 mil UFC/mL e 6, CBT entre 101 e 200 mil UFC/mL. Assim, 40% das placas processadas por este método teve CBT inferior a 200 mil UFC/mL. São 24 as placas com CBT superiores a 301 mil UFC/mL, e o valor de CBT médio calculado para esta categoria equivale 804 mil UFC/mL.

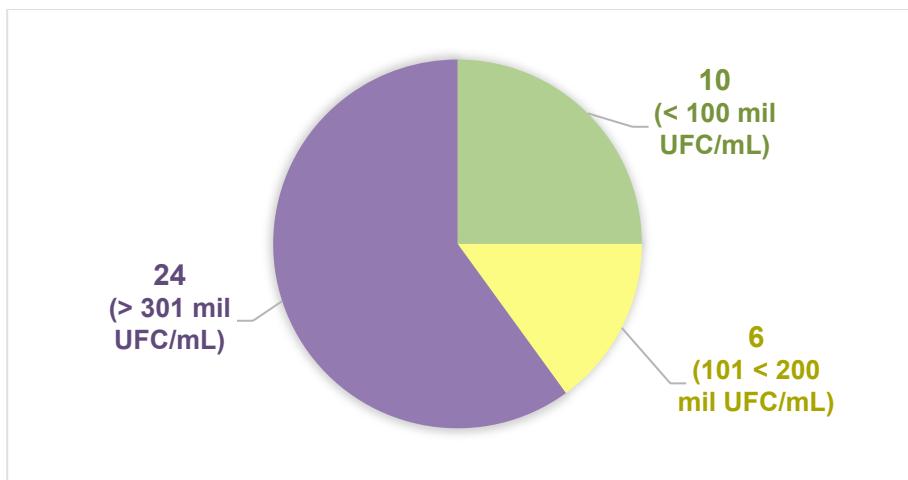


Figura 12: Classificação da CBT calculada pelo método CBTTest. Os números indicam a quantidade de placas com valores de CBT em cada categoria, e estas estão indicadas entre parêntesis.

Entretanto, quando comparado os valores de logCBT em um diagrama de dispersão, a concordância entre os dois métodos é evidenciada (figura 13). A correlação

entre os métodos Padrão Ouro e CBTTest é considerável para o conjunto de amostras avaliado ($R^2 = 0,815$), indicando que o sistema avaliado pode ser validado.

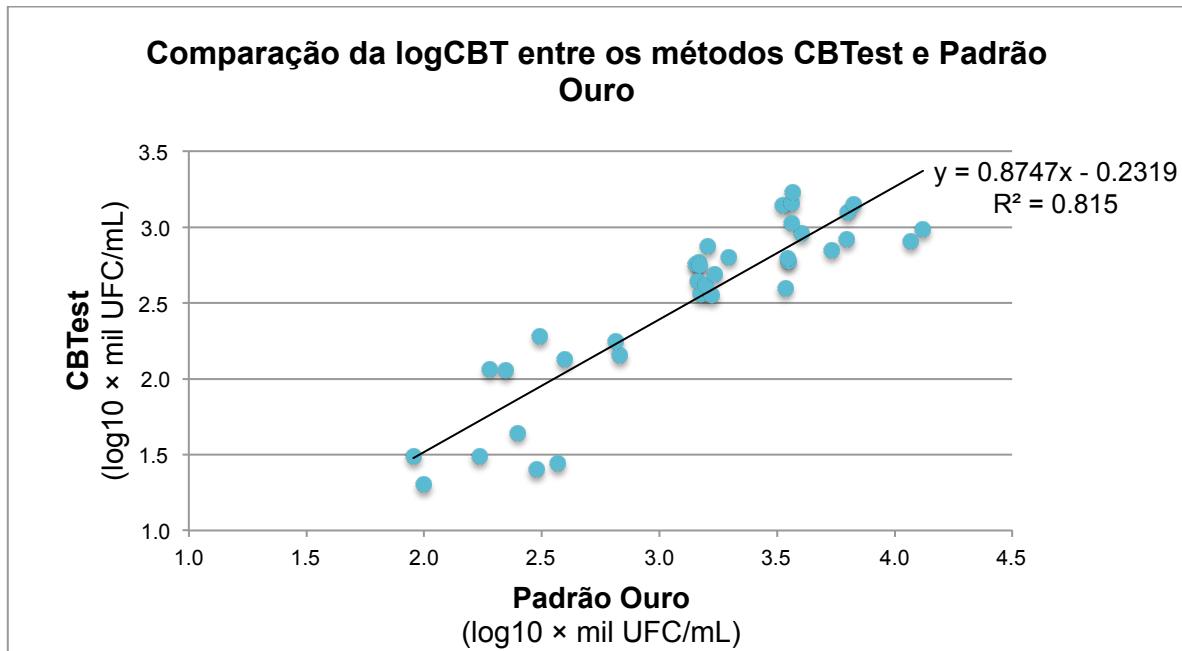


Figura 13: Diagrama de dispersão dos valores de logCBT pelos métodos CBTTest e Padrão Ouro.

Contudo, algumas ressalvas fazem-se necessárias. O número de amostras ($n=20$) utilizado neste estudo foi baixo e a maioria das placas apresentou carga microbiana muito superiores ao limite aceitável (Figuras 14 e 15). Ademais, foram feitas 3 diluições pelo método CBTTest e 4 pelo método Padrão Ouro, fator que também influencia nos resultados e deve ser considerado.

A comparação entre os valores de CBT sugere erroneamente que os métodos não possuem correlação, mas usualmente para análises microbiológicas são utilizados valores em logaritmo, que neste estudo indicou correlação considerável.

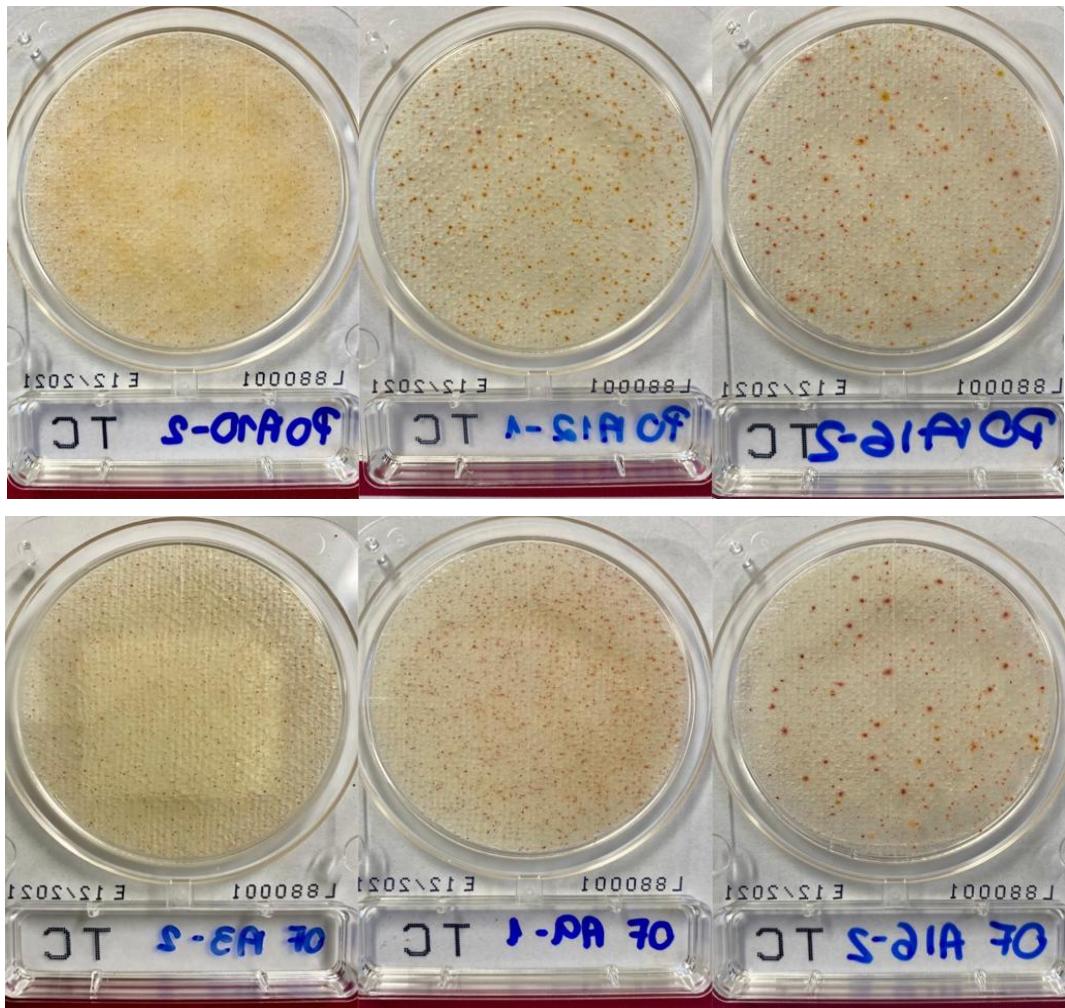


Figura 14: Placas com alta carga microbiana. Método Padrão Ouro na parte superior, da esquerda para a direita: amostra 10 duplicata 2 (CBT = 13.190 mil UFC/mL), amostra 12 duplicata 1 (CBT = 7.835 mil UFC/mL) e amostra 16 duplicata 2 (CBT = 6.695 mil UFC/mL). Método CBTest na parte inferior, da esquerda para a direita: amostra 3 duplicata 2 (CBT = 1.435,1 mil UFC/mL), amostra 9 duplicata 1 (CBT = 1.702,4 mil UFC/mL) e amostra 16 duplicata 2 (CBT = 1.413,8 mil UFC/mL).



Figura 15: Placas contaminadas que apresentaram mudança na coloração e colônias de fungos.

4.2 Comparação entre os métodos de contagem

Para a quantificação de UFC nas placas foram considerados a CV e a contagem automática através da IA. Visando validar o sistema de leitura utilizado pelo aplicativo OnFarmApp, foi feito um diagrama de dispersão considerando os valores de CBTTest fornecidos pela IA e os valores de CBT calculados através da CV.

Foram analisados os valores de CBT (Figura 16) e logCBT (Figura 17) dos dois métodos utilizados. O alto valor do coeficiente de determinação (R^2) em ambos diagramas indicam que os dados calculados pela IA possuem elevada de correlação com a CV, 91,5% e 97,5%, respectivamente, validando este sistema.

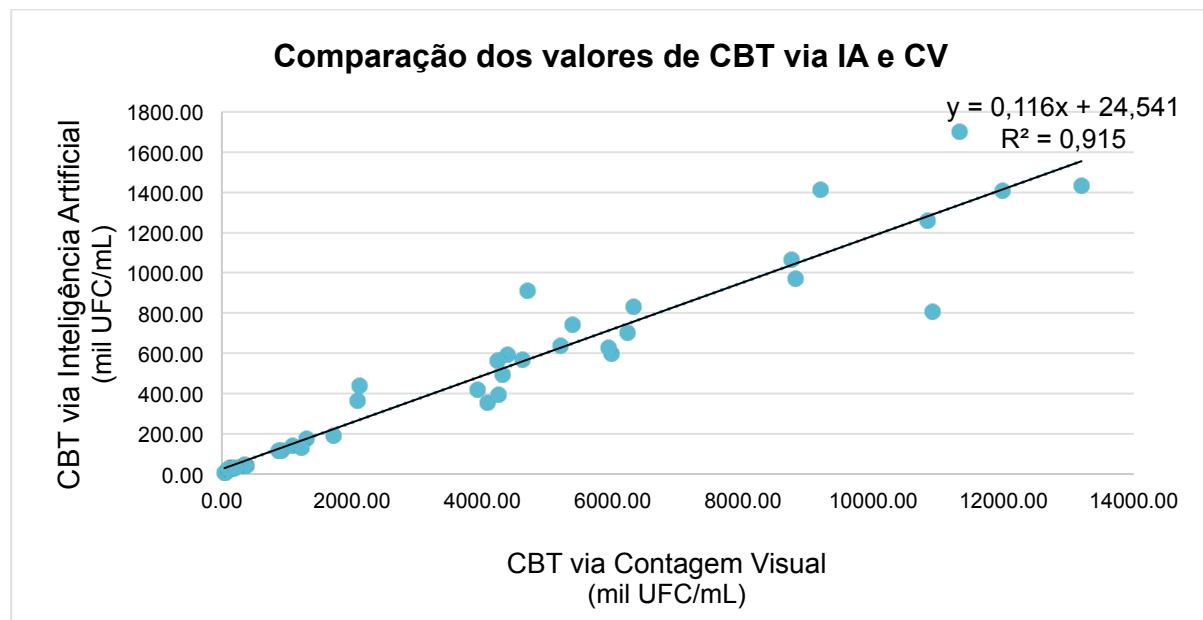


Figura 16: Diagrama de dispersão de dados da contagem visual e inteligência artificial

utilizando os valores da CBT.

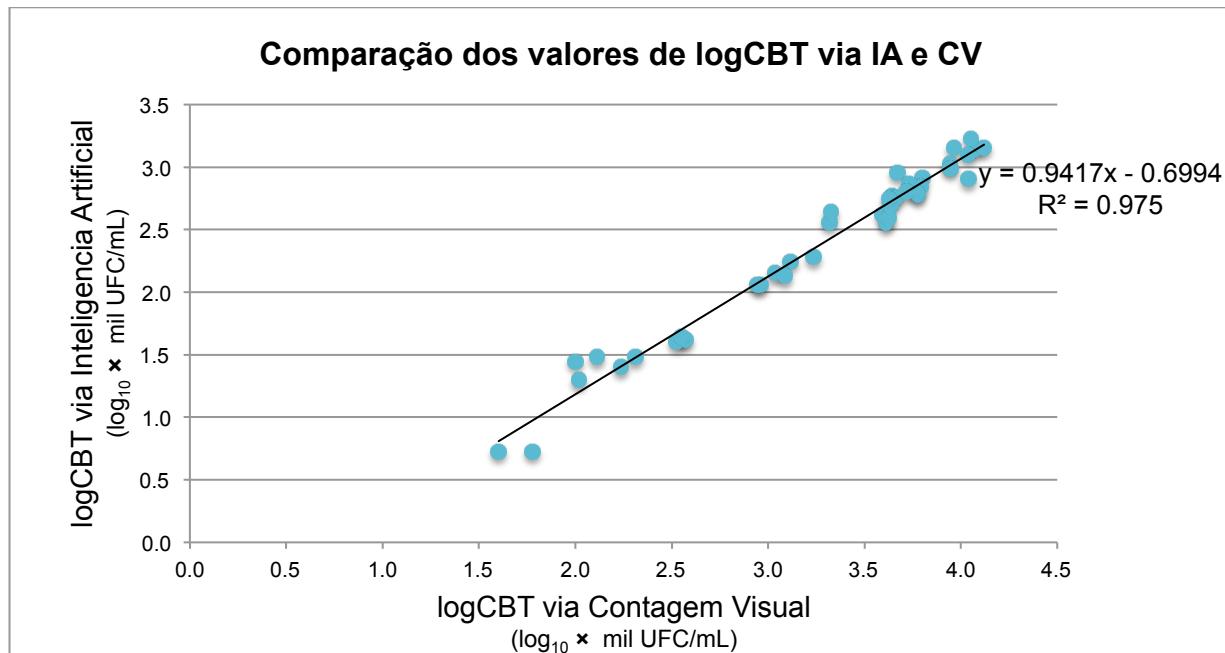


Figura 17: Diagrama de dispersão de dados da contagem visual e inteligência artificial utilizando os valores da logCBT.

Nota-se na Figura 16 que a correlação entre os valores mais baixos de CBT (até 200 mil UFC/mL para IA e até 2000 mil UFC/mL para CV) é ainda maior, estando mais próximos a linha de tendência, enquanto números maiores se distanciam um pouco mais da mesma.

Isso pode ser explicado devido a IA funcionar com uma faixa ideal de contagem, que vai de 10 a 300 colônias. O algoritmo calcula um erro de contagem tolerável, admitindo cerca de 8% de variação para CBT próximas ao limite aceitável e dentro da faixa ideal. Valores muito elevados influem no erro exponencialmente, aumentando a diferença entre os dados calculados via CV e IA.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de Contagem Bacteriana Total obtidos através do método Padrão Ouro foram, em sua maioria, superiores aos do sistema CBTTest. A alteração do diluente, o número de diluições e a alta carga microbiana influenciaram na variação em escala dos valores obtidos.

O sistema CBTTest e o método Padrão Ouro apresentaram, contudo, concordância considerável nas condições deste estudo ($R^2 = 0,815$ para comparações entre logCBT), validando este método. O baixo número de amostras e a alta carga bacteriana na maioria delas podem ter sido responsáveis por limitar essa correlação. O cuidado com a higiene dos locais e utensílios de coleta mostraram-se essenciais e proporcionalmente relacionados com altos valores de CBT.

A replicação da mesma metodologia em escala maior pode clarificar as correlações entre os métodos avaliados, garantindo maior assertividade nas análises. Sugere-se que, em estudos futuros, um protocolo padronizado de limpeza de sistema de ordenha seja adotado, uma vez que a alta carga microbiana nas amostras dificultou análises entre os diferentes métodos de cálculo de CBT avaliados.

A contagem de UFC pelo aplicativo do sistema CBTTest mostrou-se condizente com a contagem visual, sendo ainda mais eficiente para amostras com baixa carga microbiana.

REFERÊNCIAS

BARRINGTON, GM and PARISH, SM. **Bovine neonatal immunology**. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 17, no. 3 (2001): 463 - 476.

BIELMANN, V; GILLAN, J; PERKINS, NR; SKIDMORE, AL; GODDEN, S e LESLIE, KE. (2010). **An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle**. Journal of Dairy Science, 93 (8), 3713 - 3721.

BITTAR, CMM; PORTAL, RNS; PEREIRA, ACFC. **Criação de bezerras leiteiras**. Piracicaba: EDUSP, 2018.

CHASE, CCL; HURLEY, DJ.; REBER, AJ. **Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response**. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, v. 24, n. 1, p. 87 - 104, 2008.

DONOVAN, GA; BADINGA, LK; COLLIER, RJ; WILCOX, CJ e BRAUN, RK. **Factors influencing passive transfer in dairy calves**. Journal of Dairy Science 69, no. 3 (1986): 754 - 759.

FEITOSA, Francisco LF. **Importância da transferência da imunidade passiva para a sobrevivência de bezerros neonatos**. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP 2, no. 3 (1999): 17 - 22.

FLEENOR, WA; STOTT, GH. **Hydrometer Test for Estimation of Immunoglobulin Concentration in Bovine Colostrum**. Journal of Dairy Science, v. 63, n. 6, p. 973 - 977, 1980.

GELSINGER, SL; JONES, CM and HEINRICHS, AJ. **Effect of colostrum heat treatment and bacterial population on immunoglobulin G absorption and health of neonatal calves**. Journal of Dairy Science 98, no. 7 (2015): 4640 - 4645.

GODDEN, S. **Colostrum management for dairy calves**. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice 24, no. 1 (2008): 19 - 39.

GUZMAN-CARAZO, V; REYES-VÉLEZ, J; ELSOHABY, I; OLIVERA-ANGEL, M. **Factors associated with microbiological quality of bovine colostrum in Colombian dairy herds.** International Dairy Journal 105 (2020): 104670.

JAMES, RE; POLAN, CE; CUMMINS, KA. **Influence of Administered Indigenous Microorganisms on Uptake of [Iodine-125] T-Globulin In Vivo by Intestinal Segments of Neonatal Calves.** Journal of Dairy Science, v. 64, p. 52 - 61, 1981.

McGUIRK, SM; COLLINS, M. **Managing the production, storage, and delivery of colostrum.** Vet. Clin. Food. Anim., v. 20, p. 593 - 603, 2004

RICE, EW; BAIRD, RB; EATON, AD and CLESCERI, LS. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** Washington: APHA, AWWA, WPCR 1496 (2012).

SANTOS, G; SILVA, JT; SANTOS, FHR; BITTAR, CMM. **Nutritional and microbiological quality of bovine colostrum samples in Brazil.** Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v.46, n.1, p.72-79, January, 2017. Available on: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982017000100072&lng=en&nrm=iso>. Accesed on: November 24, 2020.

STEWART, S; GODDEN, S; BEY, R; RAPNICKI, et al. **Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum.** Journal of Dairy Science 88, no. 7 (2005): 2571 - 2578.

YANAKA, R; DE CAMARGO, DG; BOVINO, F; SANTOS, WA; DOCUSSE, MR; CAVASSANO, BS & FEITOSA, FL. **Macromolecules intestinal absorption period of goat kids after bovine colostrum intake.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 32 (8), 2012, p. 794 - 802.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AZEVEDO, RA e DUARTE, ER. **Aspectos microbiológicos do colostro bovino em diferentes técnicas de conservação e armazenamento: Uma revisão.** Rev. Eletrônica Pesq. Ani (2013): 84-98.

DONAHUE, M; GODDEN, SM; BEY, R; WELLS, S; *et al.* **Heat treatment of colostrum on commercial dairy farms decreases colostrum microbial counts while maintaining colostrum immunoglobulin G concentrations.** *Journal of dairy science* 95, no. 5 (2012): 2697-2702.

GUERREIRO, PK *et al.* **Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção.** Ciência e Agrotecnologia 29, no. 1 (2005): 216-222.

JOHNSON, JL; GODDEN, SM; MOLITOR, T; AMES, T e HAGMAN, D. **Effects of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of immune and nutritional parameters in neonatal dairy calves.** *Journal of dairy science* 90, no. 11 (2007): 5189-5198.

McGUIRK, S.M. **Solving Calf Morbidity and Mortality Problems.** In: American Association of Bovine Practitioners, Preconvention Seminar 7: Dairy Herd Problem Investigation Strategies 36th Annual Conference, 2003

NAYLOR, J.M.; KRONFELD, D.S. **Refractometry as a measure of the immunoglobulin status of the newborn dairy calf:** Comparison with the zinc turbidity test and single radial immunodiffusion. *Am. J. Vet. Res.*, v.38, p.1331-1334, 1977.

SILPER, BF *et al.* **Avaliação da qualidade do colostro e transferência de imunidade passiva em animais mestiços Holandês Zebu.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., Belo Horizonte, v. 64, n. 2, p. 281-285, Apr. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352012000200005&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 16 nov. 2020.

SILVA, Ana Paula da. **Avaliação da transferência de imunidade passiva em bezerros colostrados com colostro materno ou diferentes doses de substituto de colostro e seus efeitos na saúde e desempenho.** (Mestrado em Ciências Animais e Pastagens) Universidade de São Paulo, 2019.

SILVA, Thiago Farias da. **Correlação entre o crescimento bacteriano em placa com a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT) de leite proveniente de vacas com mastite subclínica do norte e noroeste fluminense.** Tese (mestrado em Produção Animal) Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2007.

STABEL, JR *et al.* **Destruction of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella* spp., and *Mycoplasma* spp. in raw milk by a commercial on-farm high-temperature, short-time pasteurizer.** Journal of dairy science, v. 87, n. 7, p. 2177-2183, 2004.

WELLS, S. J., DARGATZ, D. A., & OTT, S. L. **Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States.** (1996) Preventive Veterinary Medicine, 29.1, p. 9-19

