

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

THIAGO RESIN NIERO

**EFEITO DA ANTISSEPSIA DUPLA DOS TETOS NA PRÉ-ORDENHA SOBRE A
LIMPEZA, CONTAGEM BACTERIANA DOS TETOS E INFECÇÕES
INTRAMAMÁRIAS EM VACAS LEITEIRAS**

**LAGES
2023**

THIAGO RESIN NIERO

**EFEITO DA ANTISSEPSIA DUPLA DOS TETOS NA PRÉ-ORDENHA SOBRE A
LIMPEZA, CONTAGEM BACTERIANA DOS TETOS E INFECÇÕES
INTRAMAMÁRIAS EM VACAS LEITEIRAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração em Produção Animal.
Orientador: Prof. Dr. André Thaler Neto.
Coorientadora: Prof.^a Dra. Sandra Maria Ferraz.

**LAGES
2023**

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE OBRA

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Niero, Thiago Resin
EFEITO DA ANTISSEPSIA DUPLA DOS TETOS NA
PRÉ-ORDENHA SOBRE A LIMPEZA, CONTAGEM
BACTERIANA DOS TETOS E INFECÇÕES
INTRAMAMÁRIAS EM VACAS LEITEIRAS / Thiago Resin
Niero. -- 2023.
80 p.

Orientador: André Thaler Neto
Coorientadora: Sandra Maria Ferraz
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages,
2023.

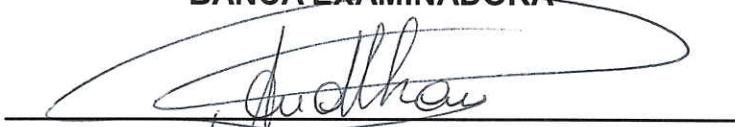
1. Pré-dipping. 2. Higiene dos tetos. 3. Limpeza das luvas.
4. Mastite. 5. Qualidade do leite. I. Thaler Neto, André . II.
Ferraz, Sandra Maria . III. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Titulo.

THIAGO RESIN NIERO

EFEITO DA ANTISSEPSIA DUPLA DOS TETOS NA PRÉ-ORDENHA SOBRE
A LIMPEZA, CONTAGEM BACTERIANA DOS TETOS E INFECÇÕES
INTRAMAMAMÁRIAS EM VACAS LEITEIRAS

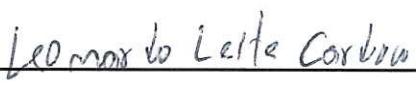
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração em Produção Animal.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. André Thaler Neto
CAV – UDESC, Lages, SC

Membros:


Prof. Dr. José Carlos de Figueiredo Pantoja
UNESP, Botucatu, SP


Dr. Leonardo Leite Cardozo
ORDEMILK, Treze Tílias, SC

Lages, 15 de junho de 2023.

Dedico este trabalho ao meu amor, à minha família, aos meus amigos e a todos que me auxiliaram de alguma forma para a concretização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, pelas bênçãos de cada dia, pela certeza de sua presença me protegendo e iluminando meu caminho.

Ao meu amor, Gabriela Dick, por ser minha parceira para todas as horas, me incentivando e me dando força diariamente para que eu não desistisse deste meu objetivo.

À minha família, especialmente aos meus pais, Cleder Niero e Sirli Resin, aos meus irmãos e aos meus avós que mesmo longe, sempre me deram forças e amparo para que esse sonho se tornasse possível.

Ao senhor Olímpio e à dona Lúcia por me dar abrigo em sua casa ao longo destes anos de mestrado.

Ao meu orientador, Professor André Thaler Neto pelo exemplo de profissional, pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa e pela orientação e sugestões para realização deste trabalho.

À minha coorientadora, Professora Sandra Maria Ferraz pelas sugestões nas avaliações microbiológicas e por disponibilizar estrutura e equipe para auxílio nas análises.

A todos os meus colegas do grupo de pesquisa, bolsistas, voluntários e técnicos de laboratório que me auxiliaram nas etapas de planejamento e execução do experimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV por proporcionar ensino gratuito e de qualidade e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES) pela bolsa concedida.

RESUMO

Esta dissertação foi dividida em dois experimentos. No primeiro experimento, com vacas em pastejo, objetivou-se avaliar a eficácia da antisepsia dupla (AD) sobre a limpeza, contagem bacteriana dos tetos e novas infecções intramamárias em comparação com a antisepsia convencional (AC). Inicialmente dois grupos de 8 vacas foram submetidas a AD (uma antisepsia antes e outra após a retirada dos primeiros jatos de leite) e a AC (somente uma imersão após a retirada dos primeiros jatos de leite) em todas as ordenhas. O experimento foi realizado por 8 meses e as vacas que pariram durante o período foram inscritas alternadamente em um dos grupos. O antisséptico comercial utilizado foi a base de peróxido de hidrogênio e ácido láctico em ambos os tratamentos. Foi avaliado, quinzenalmente, a contagem bacteriana dos tetos antes e após a antisepsia, o escore de limpeza de úbere (ELU) e tetos (ELT), a contagem de células somáticas (CCS) do leite, a hiperqueratose de ponta de tetos, a profundidade de úbere e *udder clearance*. As informações meteorológicas e os casos de mastite clínica também foram registrados. Os dados foram analisados por meio do pacote estatístico SAS®. O período experimental foi caracterizado por baixos índices pluviométricos, resultando em tetos ligeiramente sujos antes da antisepsia. Em média os úberes encontravam-se acima do jarrete, não predispondo a tetos sujos. Não observamos diferença entre AD e AC na redução do ELT ($P = 0,18$) e das contagens de *Staphylococcus* spp. ($P = 0,52$), *Streptococcus* spp. ($P = 0,32$), coliformes ($P = 0,16$), Gram-negativos não coliformes ($P = 0,52$) e contagem bacteriana total ($P = 0,15$). Não houve diferenças na CCS ($P = 0,14$), na ocorrência de novas mastites subclínicas, nas infecções subclínicas crônicas e de curas ($P = 0,18$), assim como de mastite clínica ($P = 0,80$) entre AC e AD. Sendo assim, em vacas mantidas em sistema baseado em pastagens, a AD trás benefícios quando os tetos se apresentam, na média, tetos ligeiramente sujos ($ELT = 2$) antes da antisepsia. No segundo experimento, com vacas confinadas em sistema *free-stall*, objetivou-se avaliar o efeito da AD com um ou dois tipos de antissépticos sobre a limpeza e contagem bacteriana dos tetos e das luvas do ordenhador em comparação com a AC. O estudo foi delineado na forma de um quadrado latino 3 x 3 (três grupos e três tratamentos). Os tratamentos foram: antisepsia convencional (AC), antisepsia dupla dos tetos com um antisséptico (AD1A) ou com dois antissépticos (AD2A). Na AC e na AD1A foi utilizado um antisséptico comercial a base de ácido láctico e na AD2A utilizou-

se ácido lático na primeira imersão e cloro na segunda. Foram realizadas 3 repetições com 5 dias de adaptação e um de coleta. Foi realizado a contagem bacteriana dos tetos antes e após a antisepsia dos mesmos grupos bacterianos pesquisados no experimento 1 e avaliado o ELU e ELT. A contagem bacteriana total da luva do ordenhador também foi realizada. Análises de contraste entre a AD e AC e entre as AD1A e AD2A foram realizadas por meio do pacote estatístico SAS®. A AD tendeu a reduzir mais o ELT ($P = 0,09$) quando comparada com a AC. A redução de *Staphylococcus* spp. foi maior para AD ($P = 0,04$) e houve uma tendência na AD2A em melhor reduzir *Staphylococcus* spp. ($P = 0,07$) quando comparada com a AD1A. A redução de CBT dos tetos foi maior para a AD ($P = 0,01$). A CBT das luvas do ordenhador antes e após a antisepsia foram menores para AD ($P < 0,01$ e $P = 0,01$). Desta forma, a antisepsia dupla pré-ordenha é uma alternativa eficaz para redução de alguns grupos bacterianos e para evitar a disseminação de bactérias pelos ordenhadores em vacas confinadas. A superioridade da AD no confinamento pode estar atrelada a tetos com maior ELT (mais sujos) antes da ordenha quando comparado com as condições do sistema baseado em pastagens observadas no experimento 1.

Palavras-chave: *Pré-dipping*; Higiene dos tetos; Limpeza das luvas; Mastite; Qualidade do leite.

ABSTRACT

This dissertation was divided into two experiments. In the first experiment, with cows in a pasture-based system, we aimed to evaluate the effectiveness of double disinfection (DD) on cleanliness, teat bacterial counts and new intramammary infections compared to conventional disinfection (CONV). Initially two groups of 8 cows were submitted to DD (one disinfection before and another after the forestripping) or CONV (only one immersion after the forestripping) in all milkings for 8 months. The experiment was carried out for 8 months and the cows that calved during the period were alternately assigned to one of the groups. The commercial disinfectant used was based on hydrogen peroxide and lactic acid in both treatments. Fortnightly, the bacterial count of the teats before and after disinfection, the udder cleanliness score (UCS), teats cleanliness score (TCS), the somatic cell count (SCC) of the milk, the hyperkeratosis of the teats and the depth of udder and udder clearance were evaluated. Meteorological information and cases of clinical mastitis were also recorded. Treatment effects were evaluated using the SAS® statistical program. Overall, the experimental period was characterized by low rainfall, resulting in slightly dirty teats before milking. The udders were generally above the hocks, not predisposing to dirty teats. We did not observe any difference between DD and CONV in reducing TCS ($P = 0.18$) and *Staphylococcus* spp. ($P = 0.52$), *Streptococcus* spp. ($P = 0.32$), coliforms ($P = 0.16$), Gram-negative noncoliform ($P = 0.52$) and TBC ($P = 0.15$). There were no differences in SCC ($P = 0.14$), new subclinical mastitis, chronic subclinical infections and cures predicted by SCC ($P = 0.18$) and clinical mastitis ($P = 0.80$) between CONV and DD. Therefore, in cows kept in a pasture-based system, DD does not bring benefits when teats are, on average, slightly dirty teats (TCS = 2) before disinfection. In the second experiment, with cows confined in a free-stall system, we aimed to evaluate the effect of DD with one and two types of disinfectants on the cleanliness and bacterial count of teats and milking gloves. The study was designed in the form of a 3 x 3 Latin square (three groups and three treatments). The treatments were: conventional disinfection (CONV), double teat disinfection using the same disinfectant (DD1D) and double teat disinfection using two disinfectants (DD2D). In CONV and DD1D, a commercial disinfectant based on lactic acid was used, and in DD2D, lactic acid was used in the first immersion and chlorine in the second. Three repetitions were performed with five days of adaptation and one day of collection. The

bacterial count of the teats was performed before and after the disinfection of the same bacterial groups researched in experiment 1 and the UCS and TCS were evaluated. The TBC of the milker's glove was also performed. Contrast analyzes between DD and CONV and between DD1D and DD2D were performed using the SAS® statistical program. TCS reduction tended to be greater for DD ($P = 0.09$) than for CONV. The reduction of *Staphylococcus* spp. was higher for DD ($P = 0.04$) and there was a trend in DD2D to better reduce *Staphylococcus* spp. ($P = 0.07$) when compared with DD1D. TBC reduction from teats was greater for DD ($P = 0.01$). The TBC of the milker's gloves before and after disinfection were lower for DD ($P < 0.01$ and $P = 0.01$). In this way, pre-milking double disinfection is an effective alternative to reduce some bacterial groups and to prevent the dissemination of bacteria by milkers in confined cows. The superiority of DD in confinement may be linked to teats with higher ELT (dirtier) before milking when compared with the conditions of the pasture-based system observed in experiment 1.

Keywords: Pre-dipping; Teat hygiene; Glove cleaning; Mastitis; Milk quality.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 - Esquema de aplicação da AC (antisepsia convencional) e da AD (antisepsia dupla)	44
Figura 2 - Escores de Limpeza de Tetos (ELT).....	46
Figura 3 - Suabe sendo friccionado na face lateral externa do teto após o protocolo de antisepsia pré-ordenha.....	46
Figura 4 - Colônias bacterianas isoladas no CEDIMA, CAV/UDESC.....	48
Figura 5 - Classificação da mastite subclínica a partir da CCS (CS/ml) de duas coletas subsequentes com intervalo de 15 dias.	49
Figura 6 - Gráfico da precipitação (mm), da temperatura do ar média (°C) e da umidade relativa do ar média (%) resultantes da média do dia anterior a coleta e no dia da coleta durante o experimento.....	55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Valores médios dos indicadores utilizados para a seleção não aleatória das vacas na formação dos grupos com antisepsia convencional (AC) e antisepsia dupla (AD).....	43
Tabela 2 - Valores médios ± erros-padrão da média e valores de P dos escores de limpeza de teto na antisepsia convencional (AC) e da antisepsia dupla (AD)	52
Tabela 3 - Valores médios ± erros-padrão da média das contagens bacterinas em logaritmo na base 10 da antisepsia convencional (AC) e da antisepsia dupla (AD).	53
Tabela 4 - Porcentagem de novas mastites subclínicas, curas, infecções subclínicas crônicas e de vacas sadias na antisepsia dupla (AD) e convencional (AC).	54
Tabela 5 - Cargas fatoriais, comunalidades e porcentagem da variância de cada variável na avaliação da inter-relação das contagens bacterianas e os escores de limpeza de tetos de antes e após a antisepsia e as informações meteorológicas.....	56

CAPÍTULO III

Table 1 - Mean values and residual standard deviations (RSD) of teat cleanliness score (TCS) and P values for the contrasts between double disinfection (DD) and conventional (CONV) and between double disinfection with 1 disinfectant (DD1D) and with two disinfectants (DD2D).....	71
Table 2 - Mean values and residual standard deviations (RSD) of bacterial count on the teats and P values for the contrasts between double disinfection (DD) and conventional (CONV) and between double disinfection with 1 disinfectant (DD1D) and with two disinfectants (DD2D).....	72
Table 3 - Mean values and residual standard deviations (RSD) of the total bacterial count (TBC) on the milkers' gloves and P values for the contrasts between double disinfection (DD) and conventional (CONV) and between double disinfection with 1 disinfectant (DD1D) and with two disinfectants (DD2D)..	73

Table 4 - Factor loads, communalities, and variance percentage of each variable regarding the evaluation of the inter-relation of bacterial count before and after treatment.....	74
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES

BAL	Bactérias ácido lático probióticas
BPO	Boas práticas de ordenha
°C	Graus Celsius/degrees Celsius
CBT_A	Contagem bacteriana total dos tetos antes da antisepsia
CBT_D	Contagem bacteriana total dos tetos após a antisepsia
CBT	Contagem bacteriana total
CBTLuva_A	Contagem bacteriana total da luva antes da antisepsia
CBTLuva_D	Contagem bacteriana total da luva após a antisepsia
COLC_POST	Coliforms count after treatment
COLC_PRE	Coliforms count before treatment
CCOL_A	Contagem de coliformes antes da antisepsia
CCOL_D	Contagem de coliformes após a antisepsia
CCS	Contagem de Células Somáticas
CFU	Colony-forming units
CFU/ml	Colony-forming units per milliliter
CGNEG_A	Contagem de Gram-negativos antes da antisepsia
CGNEG_D	Contagem de Gram-negativos após a antisepsia
cm	centímetro/ centimeter
CNCOL_A	Contagem de Gram-negativos não coliformes antes da antisepsia
CNCOL_D	Contagem de Gram-negativos não coliformes após a antisepsia
CONV	Conventional disinfection
CPP	Contagem Padrão em Placa
CS/ml	Células somáticas/mililitro
CSTA_A	Contagem de <i>Streptococcus</i> spp. antes da antisepsia
CSTA_D	Contagem de <i>Streptococcus</i> spp. após a antisepsia
CSTE_A	Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. antes da antisepsia
CSTE_D	Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. após a antisepsia
AC	Antisepsia convencional
AD	Antisepsia dupla/double disinfection
AD1A	Antisepsia dupla com o mesmo antisséptico/double teat disinfection using the same disinfectant

AD2A	Antisepsia dupla com dois antissépticos diferentes/double teat disinfection using two disinfectants
Dif_CBT	Diferença entre a contagem bacteriana total dos tetos de depois e antes da antisepsia
Dif_COLC	Difference between coliforms count before and after treatment
Dif_CNCOL	Diferença entre a contagem de Gram-negativos não coliformes de depois e antes da antisepsia
Dif_GNNCOLC	Difference between Gram-negative noncoliform before and after treatment
Dif_COL	Diferença entre a contagem de coliformes de depois e antes da antisepsia
Dif_ELT	Diferença entre o escore de limpeza de tetos de depois e antes da antisepsia
Dif_GNEG	Diferença entre a contagem de Gram-negativos de depois e antes da antisepsia
Dif_STA	Diferença entre a contagem de <i>Streptococcus</i> spp. de depois e antes da antisepsia
Dif_STAC	Difference between <i>Staphylococcus</i> spp. before and after treatment
DIF_STE	Diferença entre a contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. de depois e antes da antisepsia
Dif_STEC	Difference between <i>Streptococcus</i> spp. count before and after treatment
Dif_TBC	Difference between total bacterial count before and after treatment
Dif_TCS	Difference between teat cleanliness score after and before treatment
Dif_TGNEGC	Difference between total Gram-negative count before and after treatment
EH	Escore de hiperqueratose de ponta de teto
ELT_A	Escore de limpeza de tetos antes da antisepsia
ELT_D	Escore de limpeza de tetos após a antisepsia
ELT	Escore de Limpeza de Tetos
ELU	Escore de Limpeza de Úbere
EPI	Equipamento de proteção individual

FC	Fator de correção
GNB	Total Gram-negative bacteria
GNNCOLC_POST	Gram-negative noncoliform count after treatment
GNNCOLC_PRE	Gram-negative noncoliform count before treatment
kg	Quilograma
log	Representação logarítmica/logarithmic representation
ml	Militro/milliliter
mm	Milímetros/millimeters
NMC	National Mastitis Council
PCA	Plate count agar
POST	After treatment
ppm	Parte por milhão/parts per million
PRE	Before treatment
RSD	Residual standard deviations
s	Segundo/seconds
SCC	Somatic cell count
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativo
SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positivo
STAC_POST	<i>Staphylococcus</i> spp. count after treatment
STAC_PRE	<i>Staphylococcus</i> spp. count before treatment
STEC_POST	<i>Streptococcus</i> spp. count after treatment
STEC_PRE	<i>Streptococcus</i> spp. count before treatment
TBC	Total bacterial count
TBCGloves_POST	Total bacterial count of the gloves after disinfection.
TBCGloves_PRE	Total bacterial count of the gloves before disinfection
TBC_PRE	Total bacterial count before treatment
TBC_POST	Total bacterial count after treatment
TCS	Teats cleanliness score
TCS_POST	Teat cleanliness score after treatment
TCS_PRE	Teat cleanliness score before treatment
TGNC_POST	Total Gram-negative count after treatment
TGNC_PRE	Total Gram-negative count before treatment
UCS	Udder cleanliness score
UFC	Unidade Formadora de Colônia

UFC/ml	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
μ l	Microlitro/microliter
μ l/ml	Microlitro por mililitro/microliter per milliliter

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
CAPÍTULO I	22
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1.1 Antissepsia dos tetos na pré-ordenha.....	22
1.2 Testes <i>in vivo</i> de eficácia dos antissépticos	24
1.3 <i>Pré-dipping</i> e as infecções intramamárias	27
1.4 Uso de luvas na rotina de ordenha	29
1.5 Antissepsia dupla dos tetos na pré-ordenha.....	31
2. REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO II	38
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.1 Limpeza de úbere e tetos.....	45
2.2 Contagem bacteriana dos tetos.....	46
2.3 CCS e diagnóstico de mastite	48
2.4 Conformação de úbere e escore de hiperqueratose de ponta de teto	49
2.5 Dados meteorológicos.....	50
2.6 Análise estatística	50
3. RESULTADOS	52
4. DISCUSSÃO	57
5. CONCLUSÃO.....	59
6. REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO III	63
1. INTRODUCTION	65
2. MATERIAL AND METHODS.....	66
2.1 Experiment design	66
2.2 Udder and teat cleanliness score	67
2.3 Teat bacterial count.....	68
2.4 Gloves bacterial count	69
2.5 Statistical Analysis	69
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	70
4. CONCLUSION.....	75
5. ACKNOWLEDGEMENTS	75
6. DECLARATION OF COMPETING INTEREST	75

7. REFERENCES	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79

INTRODUÇÃO

No Brasil, a identidade e as características do leite cru refrigerado são definidas pela Instrução Normativa 76 de 26 de novembro de 2018 (BRASIL, 2018), a qual estabelece que o leite cru refrigerado na propriedade rural deve apresentar médias geométricas trimestrais de Contagem Padrão em Placas (CPP) de no máximo de 300.000 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/ml. A CPP indica a qualidade microbiológica do leite e está diretamente relacionada, entre outros aspectos, à limpeza e antisepsia dos tetos antes da ordenha (ELMOSLEMANY et al., 2010).

A antisepsia pré-ordenha, comumente conhecida como *pré-dipping*, consiste basicamente em reduzir a população bacteriana da superfície dos tetos antes da ordenha (PANKEY, 1989). Muitos estudos já comprovaram a eficácia de diversos antissépticos na prevenção de mastite, devido a redução da população de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e coliformes dos tetos que podem ascender para o interior do úbere e desencadear a doença (BAUMBERGER; GUARÍN; RUEGG, 2016; INGAWA; ADKINSON; GOUGH, 1992; VISSIO et al., 2020).

A limpeza dos tetos antes da ordenha é o passo inicial para a garantia da qualidade microbiológica no leite cru. Em sistemas confinados de criação, a sujidade dos tetos está diretamente relacionada às condições da cama e higiene das instalações (ECKELKAMP et al., 2016). Já em sistemas baseado em pastagens, as vacas estão expostas a condições ambientais, como chuva e alta umidade, que aumenta a sujidade dos tetos (NOGARA et al., 2022).

Alguns trabalhos já buscaram alternativas para aumentar a eficiência dos protocolos de limpeza e antisepsia antes da ordenha. Magnusson et al. (2006) comprovaram a superioridade de protocolos de *pré-dipping* que utilizam toalhas de tecido úmidas, devido a maior fricção com a superfície dos tetos. Porém, o emprego de toalhas individuais é dispendioso e requer tempo para correta limpeza e sanitização após seu uso (SILVA, 2011). Uma alternativa, é a utilização da antisepsia dupla dos tetos. Nesta técnica, a primeira aplicação de antisséptico é realizada com o intuito de umedecer os tetos que com a fricção das mãos do ordenhador no momento do teste da caneca de fundo preto ou retirada dos primeiros jatos de leite facilita o desprendimento da sujidade. Assim, permite a limpeza mais eficiente na segunda antisepsia e secagem dos tetos.

A antisepsia dupla pré-ordenha é defendida por técnicos a campo e utilizada em algumas propriedades (DURST, 2012). No entanto, não há relatos de sua eficácia na literatura, tanto em sistemas confinados como em sistema baseado em pastagem. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da antisepsia dupla pré-ordenha em reduzir a sujidade e a contagem bacteriana dos tetos em bovinos leiteiros confinados e em pastejo quando comparado à antisepsia pré-ordenha convencional. Objetivamos ainda, avaliar a eficácia da antisepsia dupla pré-ordenha em prevenir novas infecções intramamárias em vacas em pastejo e em reduzir a contagem bacteriana na luva do ordenhador em bovinos confinados.

A dissertação está sendo apresentada em três capítulos. O primeiro é composto pela revisão bibliográfica. O segundo constitui o artigo científico “Efeito da antisepsia dupla dos tetos na pré-ordenha sobre a limpeza, contagem bacteriana dos tetos e novas infecções intramamárias em vacas leiteiras em pastejo”. Enquanto o terceiro capítulo apresenta o artigo científico “Effect of two different double premilking teat disinfection protocols on bacterial count on teat skin of cows and milkers' gloves in a free-stall-housed dairy herd”.

CAPÍTULO I

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Antissepsia dos tetos na pré-ordemha

A qualidade microbiológica do leite é de extrema importância para a produção e durabilidade de produtos lácteos (BOOR et al., 2017). Muitos dos microrganismos presentes no leite são de origem ambiental e podem estar presente nos tetos e úbere das vacas antes da ordenha (GALTON et al., 1982). Desta forma, a antissepsia dos tetos pré-ordenha, comumente conhecido como *pré-dipping*, visa reduzir a carga bacteriana dos tetos para evitar a contaminação do leite e impedir o ingresso ascendente desses agentes na glândula mamária levando a quadros de mastite (PANKEY, 1989). Cortinhas et al. (2018) constataram, no sudeste do Brasil, que a antissepsia dos tetos antes de ordenha tem forte associação com a Contagem Padrão em Placas (CPP) e contagem de coliformes no leite, demonstrando a importância do *pré-dipping* na qualidade microbiológica do leite cru.

A antissepsia dos tetos, principalmente após a ordenha, começou a ficar popular após a publicação do plano de cinco pontos para controle de mastite publicado pelo *National Mastitis Council* (NMC) em 1970 (HILLERTON; BOOTH, 2018). Já a antissepsia antes da ordenha surgiu anos depois, no fim da década de 70, na California. Burknell foi o pioneiro em testar o iodo como antisséptico dos tetos antes da ordenha, com o foco na redução dos quadros de mastite causados por agentes ambientais, principalmente coliformes (PANKEY; DRECHSLER, 1993). Atualmente, vários agentes antissépticos já foram testados e aprovados para antissepsia dos tetos antes da ordenha, como por exemplo: iodo, dióxido de cloro, clorexidine, diamina, peróxido de hidrogênio, ácido lático e ácido salicílico (FITZPATRICK et al., 2019, 2021a).

Segundo Galton et al. (1982), somente os tetos devem ser higienizados e secos, pois a lavagem do úbere contribui para a maior CPP do leite devido à dificuldade de secagem. A aplicação do antisséptico normalmente é realizada por aspersão ou imersão dos tetos na solução líquida ou na forma de espuma. Amaral et al. (2004) avaliaram a técnica de aplicação de um antisséptico a base de cloro e

constataram que os métodos de imersão, spray e uso de esponja foram igualmente eficazes na redução de *Staphylococcus* spp., coliformes e microrganismos mesófilos da superfície dos tetos.

De forma geral, o produto antisséptico deve permanecer em contato com tetos por, no mínimo, 30 segundos para a correta antisepsia (GONÇALVES; TOMAZI; DOS SANTOS, 2017; TOLEDO, 2021). Segundo Enger et al. (2015), o tempo de ação ideal para antisséptico da classe dos iodóforos é 30 segundos enquanto produtos à base de peróxido de hidrogênio é de 15 segundos. A secagem dos tetos com papel toalha ou toalha de tecido lavável é fundamental para remoção do antisséptico e evitar resíduos excessivos no leite, especialmente, de iodo (GALTON et al., 1984; GLEESON et al., 2009).

Alguns estudos *in vitro* foram conduzidos a fim de verificar a eficácia dos antissépticos a patógenos relacionados à mastite bovina. Larocque et al. (1992) constataram que o ácido dodecilbenzeno sulfônico a 1,94%, o iodo complexado com etanol a 1% e o acetado de clorexidina a 0,5% com emoliente são eficazes *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Nocardia asteroides*.

Muitos estudos avaliaram a eficácia de antissépticos contra *Staphylococcus* spp., visto a importância desse agente, principalmente o *S. aureus*, nos quadros de mastite contagiosa. Santos et al. (2018) observaram que o clorexidine a 2% durante os tempos de 30 e 60 segundos reduziu em mais de 98% a população de *Staphylococcus* spp. *in vitro*. Um estudo semelhante foi conduzido por Ramalho et al. (2012) com *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e observaram que 100% dos SCP foram resistentes a clorexidina a 2%. Os autores também verificaram que 68,8% e 87,5% dos *Staphylococcus aureus* foram sensíveis ao cloro a 2,5% e à clorexidina a 2%, respectivamente, após 60 segundos de exposição. No geral, os *Staphylococcus* apresentaram maior sensibilidade ao cloro a 2,5%.

Medeiros et al. (2009) testaram 50 cepas de *Staphylococcus aureus* e 10 cepas de SCP isolados de mastite bovina frente aos antissépticos a base de cloro a 2,5%, iodo a 0,57%, clorexidine a 2%, amônia quaternária a 4% e ácido lático a 2%. Os autores concluíram que 100% das cepas de *Staphylococcus aureus* e SCN foram sensíveis ao iodo a 0,57%. Enquanto, 97,8% e 100% dos *Staphylococcus aureus* e SCN, respectivamente, foram resistente ao cloro a 2,5% após 60 segundos de

exposição. Desta forma, os trabalhos alertam para a avaliação regular da eficácia dos antissépticos nas propriedades, visto a variabilidade de susceptibilidade *in vitro* encontrada entre microrganismos de mesma espécie ou gênero (MEDEIROS et al., 2009; RAMALHO et al., 2012).

No que diz respeito as leveduras causadoras de mastite, Coutinho et al. (2012) relatam que 100% das leveduras foram sensíveis ao clorexidine a 2,0% em todos os tempos de exposição (de 15 a 600 segundos). Após 60 segundos, o iodo a 0,57% também foi igualmente eficaz em eliminar todas as leveduras. Em relação a *Prototheca zopfii*, alga unicelular causadora de mastite, Lassa, Jagielski e Malinowski (2011) observaram que um antisséptico comercial com 1,0% de iodo ativo diluído a 1:100 e outro antisséptico com 3,0% de cloreto de didecidimetilamônio diluído a 1:10 foram capazes de eliminar 100% da *Prototheca zopfii*. Salermo et al. (2010), observaram que concentrações baixas de hipoclorito de sódio (0,039 a 0,156%) e iodo (0,156 a 0,625%) são capazes de inativar eficientemente a *Prototheca zopfii*.

1.2 Testes *in vivo* de eficácia dos antissépticos

A eficácia dos antissépticos em reduzir a carga bacteriana dos tetos *in vivo* são avaliadas através da contagem bacteriana em suaves de tetos realizados antes e após o *pré-dipping*. No geral, são utilizados meios de cultura seletivos para *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e coliformes com o intuito de investigar a eficácia a esses gêneros bacterianos, pois podem levar a quadros de mastite (BAUMBERGER; GUARÍN; RUEGG, 2016; FITZPATRICK et al., 2019, 2021a; GUARÍN; BAUMBERGER; RUEGG, 2017).

Gleeson et al. (2009) constataram uma maior probabilidade do *pré-dipping* com clorexidina e com cloro em melhor reduzir, respectivamente, a população de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. dos tetos quando comparado com a lavagem com água seguido da secagem. Não houve diferenças nas contagens de coliformes entre fazer ou não a antisepsia dos tetos. Segundo Gibson et al. (2008), a lavagem dos tetos com uma solução a base de cloro (150 ppm) seguido da secagem é mais eficaz em reduzir a CBT nos tetos (redução média de $-0,81 \log_{10}$) do que somente o pano seco (redução média de $-0,39 \log_{10}$), a lavagem com água seguida

da secagem (redução média de $-0,59 \log_{10}$) e uma única imersão na solução de cloro seguido da secagem após 15 segundos (redução média de $-0,39 \log_{10}$).

Em um estudo em 10 propriedades de Wisconsin, Baumberger, Guarín e Ruegg, (2016) compararam a imersão dos tetos em iodo 0,5% seguido da secagem com um equipamento comercial semiautomático de antisepsia pré-ordenha que utiliza dióxido de cloro. Ambas as técnicas de desinfecção se mostraram uma boa alternativa para antisepsia os tetos. No geral, o uso do equipamento comercial semiautomático reduziu com maior intensidade a população de coliformes dos tetos (redução de $-2,43 \log_{10}$, $P < 0,01$). Também foi observado uma interação do tratamento por fazenda o que leva a crer que o sistema de gestão empregado também possui relação com a eficácia da antisepsia dos tetos antes da ordenha.

Fitzpatrick et al. (2019) ao avaliar a eficácia de 10 antissépticos comerciais recomendados para *pré-dipping* verificaram uma redução geral da contagem de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e coliformes de 76%, 73% e 60%, respectivamente. O produto a base de biguanida foi o mais eficaz em eliminar bactérias dos gêneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. com redução, respectivamente, de 90% e 94%. Já para coliformes o produto mais eficaz foi a base de iodo 0,5% com redução de 91%. Em 2021, os mesmos autores ampliaram o estudo e testaram 96 produtos antissépticos disponíveis na Irlanda. Nesse estudo, constatou-se que todos foram eficazes em reduzir a carga microbiana, porém a proporção de redução variou entre os gêneros bacterianos. Desta forma, é importante conhecer quais os agentes ambientais presente nos tetos para indicar o antisséptico mais eficaz (FITZPATRICK et al., 2021a).

Mendonça et al. (2020) avaliaram três antissépticos comerciais a base de ácido lático, clorexidina e hipoclorito de sódio utilizados na pré-ordenha sobre a composição microbiológica da pele dos tetos e do leite. Não houve diferença na contagem de bactérias mesófilas dos tetos entre os antissépticos, porém, após 14 dias de tratamento, houve um aumento da contagem dessas bactérias no leite das vacas tratadas com hipoclorito de sódio ($4,55 \log_{10}$). Dutra et al. (2017) observaram que o ácido lático foi o mais eficaz em reduzir a população de *Pseudomonas* spp. (redução entre 35 e 40%) na pele dos tetos antes da ordenha, enquanto o iodo reduziu com maior intensidade a população de coliformes (redução entre 35 e 40%) e SCN (redução entre 70 e 80%).

Segundo um estudo realizado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), a mamada dos bezerros antes da ordenha para estimular a ejeção do leite aumenta em até 10 vezes a carga microbiana dos tetos. Desta forma, o mesmo estudo demonstrou que o uso de antissépticos após a mamada a base de iodo ou clorexidina conseguiu reduzir a carga bacteriana em mais de 90%. A lavagem com água e secagem com papel toalha também reduziu a contagem bacteriana, mas em menor intensidade (BRITO; PAIVA E BRITO; VERNEQUE, 2000).

Além da eliminação de microrganismos, os protocolos de limpeza dos tetos devem reduzir a quantidade de esporos de anaeróbios ambientais, visto a resistência dessa forma bacteriana aos tratamentos térmicos na indústria de laticínios (MAGNUSSON et al., 2006). Rasmussen, Galton e Petersson (1991) constataram que o uso de toalhas de algodão úmidas por 20 segundos de fricção nos tetos, independente da concentração de iodo (0,25 e 0,5%), foi mais eficaz na redução de esporos dos tetos. Um estudo semelhante conduzido por Magnusson et al. (2006) trouxe resultados parecidos. O uso de toalhas laváveis úmidas com ou sem sabão por 20 segundos seguido da secagem com papel toalha foi o protocolo mais vantajoso na remoção de esporos dos tetos. Em ambos os trabalhos, os autores relatam que os benefícios das toalhas de tecido se devem a maior ação física gerada na superfície dos tetos durante os procedimentos de limpeza mais longos (MAGNUSSON et al., 2006; RASMUSSEN; GALTON; PETERSSON, 1991).

Estudos que avaliaram o efeito da antisepsia pré-ordenha sobre a população de fungos nos tetos são raros. Maciel (2018) no estado de Rondônia/Brasil, testou a lavagem dos tetos com água em comparação com a antisepsia com hipoclorito e sódio a 1,0% e iodo a 0,8% na redução de bolores e leveduras dos tetos antes da ordenha. O iodo a 0,8% foi o mais eficaz com eliminação de todos os bolores e leveduras em 3 amostras e menores escores de crescimento fúngico. Em contrapartida, a lavagem com água não eliminou totalmente os bolores e leveduras de nenhuma amostra, demonstrando a importância da antisepsia dos tetos antes da ordenha para preservar a qualidade microbiológica do leite cru.

1.3 Pré-dipping e as infecções intramamárias

Além de garantir a qualidade microbiológica do leite cru, a antisepsia dos tetos pré-ordenha visa evitar que os agentes ambientais presentes nos tetos ascendam para o interior da glândula mamária e causem mastite (PANKEY, 1989). Os critérios para estabelecer novas infecções intramamárias variam entre os estudos. Segundo Santos e Fonseca (2019), novos quadros de mastite são caracterizados pelo surgimento de mastite clínica em pelo menos um quarto mamário com intervalo entre quadros de, no mínimo, 14 dias ou pelo diagnóstico de mastite subclínica pela elevação da CCS para acima de um nível pré-estabelecido, normalmente 200.000 células/ml. Em relação a cultura microbiológica, são consideradas novas infecções intramamárias o isolamento de um microrganismo posterior à cultura negativa ou ao isolamento de um agente distinto na cultura anterior (WILLIAMSON; LACY-HULBERT, 2013).

Nas últimas 3 décadas, a eficácia do *pré-dipping* em prevenir infecções intramamárias foi descrita por muitos autores. Oliver et al. (1993a) com um antisséptico a base de hipoclorito de sódio e ácido lático relataram redução de 34% nas infecções causadas pelos principais patógenos de mastite ao realizar a antisepsia dos tetos antes e após a ordenha do que somente após a ordenha. Em estudos semelhantes com iodo e clorexidina, o uso do *pré* e *pós-dipping* foram, respectivamente, 48,6% e 30,6% mais eficazes em prevenir novas infecções intramamárias quando comparado ao grupo tratado apenas com o *pós-dipping* (OLIVER et al., 1993b, 1994).

Galton, Peterson e Merrill (1988) contaminaram diariamente os tetos de 84 vacas com um inóculo de *Streptococcus uberis* por 18 semanas. Os autores objetivaram comparar a antisepsia dos tetos com iodo a 0,1%, a limpeza com água e nenhuma preparação pré-ordenha sobre os quadros de mastite. O protocolo que melhor previu novas infecções intramamárias por *Streptococcus uberis* foi a antisepsia com iodo a 0,1% (redução de 66% maior em comparação com nenhuma preparação dos tetos). A limpeza com água ficou em segundo lugar e reduziu 44% das infecções intramamárias comparado com a não limpeza pré-ordenha.

Ingawa, Adkinson e Gough (1992) avaliaram um gel a base de iodo a 0,5% e detergente como antisséptico antes da ordenha e constataram que as vacas desse grupo tiveram menor CCS eletrônica ($5,05 \log_{10}$ células/ml) quando comparado com

pré-dipping com solução de iodóforo a 0,5% ($5,24 \log_{10}$ células/ml) e somente lavagem com água ($5,18 \log_{10}$ células/ml). Oliver et al. (2001) comprovaram a eficácia de uma combinação fenólica em reduzir infecções intramamárias causadas por *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus coagulase positiva* e patógenos Gram-negativos. Peters et al. (2000), também aprovou o uso de compostos fenólicos na prevenção de mastites por patógenos maiores e menores. Já Vissio et al. (2020) testaram um antisséptico a base de cobre e zinco e observaram a não inferioridade do produto em prevenir novas infecções intramamárias por exposição natural quando comparado com o ácido glicólico.

Apesar das vantagens demostradas nesses estudos, a eficácia do *pré-dipping* em reduzir a incidência de infecções intramamárias é controversa na literatura. Sheldrake e Hoare (1980) em um rebanho desafiado experimentalmente por *Staphylococcus aureus*, não verificaram diferença nas infecções intramamárias causadas por esse agente entre realizar a lavagem dos tetos pré-ordenha com água e clorexidina a 2% e somente água. Hillerton et al. (1993) e Ruegg e Dohoo (1997), também não observaram benefícios ao uso da antisepsia pré-ordenha em reduzir a taxa de incidência de mastite clínica.

Gleeson, Flynn e O'Brien (2018) conduziram um estudo com dois tratamentos (com e sem *pré-dipping*) durante toda a lactação de mais de 250 vacas em pastejo. As amostras para cultura de microbiológica e CCS foram coletadas 5 vezes durante a lactação e todos os casos de mastite clínica foram registrados. No geral, não se constatou diferenças entre os tratamentos na taxa de novas infecções intramamárias (17% com *pré-dipping* e 22% sem *pré-dipping*). Segundo os autores, esse resultado se deve a baixa CCS registradas nesses rebanhos (mediana próxima a 170 células/ml para ambos os tratamentos) e concluem que o *pré-dipping* não traz benefícios na incidência de mastite em propriedades com média de CCS menor que 200.00 células/mL. Em um estudo semelhante conduzido por Williamson e Lacy-Hulbert (2013) na Nova Zelândia com mais de 450 vacas em pastejo, o emprego do *pré-dipping* com cloro (6000 ppm) também não reduziu a CCS e as infecções intramamárias causadas por qualquer patógeno, seja ele ambiental ou contagioso.

Fitzpatrick et al. (2021b) com vacas a pasto, estudaram o efeito de um antisséptico de espuma a base de ácido láctico na prevenção de novas infecções intramamárias em vacas no início da lactação. Os autores concluíram que o uso do antisséptico reduziu a contagem bacteriana dos tetos, no entanto não previu novas

infecções intramamárias quando comparado com a limpeza somente com água. No entanto, as CCS dos rebanhos estudados eram menores que 140.000 células/ml.

Morton et al. (2014) e Rowe, Tranter e Laven (2018) realizaram estudos na Nova Zelândia e Austrália, respectivamente, com o propósito de verificar se o emprego da antisepsia antes da ordenha em vacas em pastejo era capaz de reduzir a incidência de mastite clínica em pelo menos 50%. Segundo os autores, 50% era a mínima redução para justificar os custos adicionais com antisséptico, mão-de-obra e tempo na realização do *pré-dipping*. Os estudos concluíram que a antisepsia antes da ordenha não reduziu as infecções intramamárias nessa proporção quando comparado a nenhuma preparação pré-ordenha. Morton et al. (2014) relatam que o resultado se deve a baixa pluviosidade durante o período experimental, o que contribuiu para tetos mais limpos no momento da ordenha e baixa incidência de mastite clínica. Essa justificativa pode ser válida, visto que em uma das propriedades havia tetos mais sujos e a redução na taxa de mastite clínica foi maior que 50%.

1.4 Uso de luvas na rotina de ordenha

O uso de luvas pelo ordenhadores contribui para a menor transmissão de microrganismos contagiosos entre as vacas durante a ordenha (OLDE RIEKERING et al., 2008; NICKERSON, 2014). Olde Riekering et al. (2008) demonstraram que a quantidade de bactérias nas luvas é 75% menor do que na pele das mãos, comprovando a menor aderência bacteriana às luvas. Segundo o mesmo estudo, as luvas desinfetadas possuem 98% menos bactérias quando comparado com a mão nua sem antisepsia. Desta forma, a desinfecção das luvas reduz ainda mais a carga bacteriana e deve ser implementada no manejo de ordenha (TOLEDO, 2021).

Devido a menor transmissão bacteriana entre vacas pelo ordenhador, o uso de luvas auxilia na redução da incidência de casos de mastites, principalmente por microrganismos contagiosos, como o *Staphylococcus aureus* (ARNOLD, 2011). Dufour et al. (2012), em um estudo com 90 rebanhos comerciais de produção de leite no Canadá, observaram que o uso de luvas apresentou relação com a menor incidência e prevalência e com a maior eliminação de infecções intramamárias por *Staphylococcus aureus*. Fagundes et al. (2012) decretaram a presença de *S. aureus* no

leite de 8% e 25% das vacas quando era ou não empregado luvas durante a ordenha, respectivamente.

Como consequência da redução das infecções intramamárias, o uso de luvas durante a ordenha também impacta na contagem de células somáticas (CCS) do leite. Dufour et al. (2011), realizaram uma revisão bibliográfica referente aos fatores que manejo que influenciam na CCS e observaram uma relação positiva entre o emprego de luvas durante a ordenha e a menor CCS do leite. Plozza et al. (2011), constaram que 62% das propriedades com baixa prevalência de mastite subclínica (<20% das vacas com CCS maior que 200.000 CS/ml) usavam luvas durante a ordenha, ao passo que somente 26% das propriedades com prevalência maior empregavam as mesmas. Bach et al. (2008), em um estudo com 47 propriedades na Espanha, observaram que em locais onde os ordenhadores utilizavam luvas tenderam ($P = 0,07$) a ter CCS mais baixa (204.282 ± 21.325 CS/ml) do que locais onde não a utilizam (266.306 ± 25.133 CS/ml). O mesmo já tinha sido observado no estudo de Hutton et al. (1990), no qual as propriedades com baixa CCS (≤ 283.000 CS/ml) tenderam a usar mais luvas durante a ordenha do que as que tinham CCS maior que 283.000 CS/ml (18% vs 3%, $P = 0,09$).

A utilização de luvas durante a ordenha precisa ser melhor difundida. Gouvêa et al. (2020), em um estudo sobre práticas de ordenha no Brasil, salientam que o uso de luvas é mais comum em rebanhos maiores. Callay (2017) propôs técnicas de boas práticas de ordenha (BPO) a 4 propriedades comerciais em São Paulo/Brasil e constatou que o emprego de luvas durante a ordenha não foi adotado em nenhuma propriedade. Já Belage et al. (2017) também difundiram técnicas de BPO em 1373 propriedades canadenses e observaram que o uso e a desinfecção das luvas durante a ordenha assim como o uso de *pré-dipping* foram menos implementados pelas fazendas do que o *pós-dipping* e a secagem com papel toalha. O emprego de luvas é uma técnica simples que auxiliaria os produtores de leite no controle da mastite do rebanho, além de servir como equipamento de proteção individual (EPI) para os ordenhadores.

1.5 Antissepsia dupla dos tetos na pré-ordenha

A antissepsia dupla dos tetos na pré-ordenha (AD) não é descrita na literatura. Nela, os tetos entram em contato com o antisséptico duas vezes, uma antes e outra após a retirada dos primeiros jatos de leite para diagnóstico de mastite clínica. A primeira aplicação serve basicamente para umedecer os tetos para que com a fricção da mão do ordenhador na retirada dos primeiros jatos de leite haja a remoção mais eficiente da sujidade. Adicionalmente, a luva do ordenhador entra em contato com o antisséptico o que também provoca a sua desinfecção. A segunda aplicação do antisséptico objetiva eliminar os microrganismos dos tetos durante os 30 segundos de ação do agente químico. Após este período os tetos são secos com papel toalha e a ordenha é realizada. Na antissepsia convencional (AC), normalmente o teto entra em contato com o antisseptico após a retirada dos primeiros jatos de leite (GONÇALVES; TOMAZI; DOS SANTOS, 2017). Visto isso, surge a hipóteses de que a AD limpa melhor os tetos do que a AC devido a fricção da mão do ordenhador em tetos contendo antisséptico. Em consequência, a AD reduz mais eficientemente as bactérias dos tetos e evita que estes microrganismos ascendam para o interior da glândula mamária e provoquem mastite. Outra hipótese é de que a AD reduz a contagem bacteriana na luva do ordenhador, devido ao contato constante com o antisséptico, o que pode reduzir a transmissão de microrganismos contagiosos entre as vacas.

A AD é utilizada em algumas propriedades por recomendação de técnicos que buscam melhorar a eficiência de limpeza dos tetos e evitar quadros de mastite, principalmente de origem ambiental. Durst (2012), extensionista na Michigan State University, observou, sem evidências científicas, reduções da CCS em alguns rebanhos que implementaram a AD. Segundo ele, os produtores que utilizam a técnica afirmam que o retorno financeiro pela melhor qualidade do leite compensa o gasto em dobro com antisséptico. No entanto, esses relatos não têm comprovação científica, não havendo publicação científica que comprove a superioridade da AD em reduzir a sujidade, a contagem bacteriana dos tetos e as infecções intramamária quando comparado com a AC.

2. REFERÊNCIAS

- AMARAL, L. A.; ISA, H.; DIAS, L. T.; ROSSI JR, O. D.; NADER FILHO, A. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 173–177, 2004.
- ARNOLD, M. *Staphylococcus aureus* mastitis. **Cooperative Extension Service University of Kentucky**, v. 190, p. 1-4, 2011.
- BACH, A.; VALLS, N.; SOLANS, A.; TORRENT, T. Associations between nondietary factors and dairy herd performance. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 8, 3259–3267, 2008.
- BAUMBERGER, C.; GUARÍN, J. F.; RUEGG, P. L. Effect of 2 different premilking teat sanitation routines on reduction of bacterial counts on teat skin of cows on commercial dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2915–2929, 2016.
- BELAGE, E.; DUFOUR, S.; BAUMAN, C.; JONES-BITTON, A.; KELTON, D.F. The Canadian National Dairy Study 2015 - Adoption of milking practices in Canadian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 5, p. 3839-3849, 2017.
- BOOR, K. J.; WIEDMANN, M.; MURPHY, S.; ALCAINE, S. A. 100-Year Review: Microbiology and safety of milk handling. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9933–9951, 2017.
- BRASIL. **Instrução Normativa Nº 76, de 26 de novembro de 2018**. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Brasília, DF: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2018. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2021/07/IN-76_18_atualizada.pdf>. Acesso em: 8 jan. 2023.
- BRITO, J. R. F.; PAIVA e BRITO, M. A. V.; VERNEQUE, R. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Ciência Rural**, v. 10, n. 5, p. 847–850, 2000.
- CALLAY, R. E. C. **Capacitação técnica em boas práticas de ordenha e ocorrência de patógenos causadores de mastites contagiosas em propriedades leiteiras do estado de São Paulo**. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74132/tde-22022018-093958/publico/DO8442193COR.pdf>>. Acesso em: 26 jun 2023.
- CORTINHAS, C. S.; BOTARO, B. G.; DE MACEDO, S. N.; DOS SANTOS, M. V. Herd characteristics and management practices associated with bulk tank milk quality of dairy herds in southeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 50, n. 7, p. 1605–1610, 2018.

COUTINHO, L. C. A.; MEDEIROS, E. S.; SILVEIRA, N. S. S.; SILVA, L. B. G.; MOTA, R. A. Eficácia in vitro de desinfetantes utilizados na anti-sepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vaca com mastite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 1, p. 61–65, 2012.

DUFOUR, S.; FRÉCHETTE, A.; BARKEMA, H.W.; MUSSELL, A.; SCHOLL, D.T. Invited review: Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 2, p. 553-579, 2011.

DUFOUR, S.; DOHOO, I.R.; BARKEMA, H.W.; DESCÔTEAUX, L.; DEVRIES, T.J.; REYHER, K.K.; ROY, J.P.; SCHOLL, D.T.. Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1283-1300, 2012.

DURST, P. **Double-dipping teats?** 2012. Disponível em: <https://www.canr.msu.edu/news/double-dipping_teats>. Acesso em: 05 mar. 2023.

DUTRA, M. M.; ARAÚJO, G. H. M.; SILVA, R. R.; CAMARGOS, A. S. Influência de diferentes soluções de pré-dipping na população microbiana dos tetos de vacas leiteiras criadas a pasto. **Colloquium Agrariae**, v. 13, n. 2, p. 116–122, 2017.

ECKELKAMP, E. A.; TARABA, J. L.; AKERS, K. A.; HARMON, R. J.; BEWLEY, J. M. Understanding compost bedded pack barns: Interactions among environmental factors, bedding characteristics, and udder health. **Livestock Science**, v. 190, p. 35–42, 2016.

ELMOSLEMANY, A. M.; KEEFE, G. P.; DOHOO, J. R.; WICHTEL, J. J.; STRYHN, H.; DINQWELL, 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.

ENGER, B. D.; FOX, L. K.; GAY, J. M.; JOHNSON, K. A. Reduction of teat skin mastitis pathogen loads: Differences between strains, dips, and contact times. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 2, p. 1354–1361, 2015.

FAGUNDES, H.; CORASSIN, C. H.; TAVOLARO, P.; OLIVEIRA, C. A. F.. Milk hygienic practices and occurrence of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in small-scale dairy farms in São Paulo, Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 28, p. 5805-5808, 2012.

FITZPATRICK, S. R.; GARVEY, M.; FLYNN, J.; JORDAN, K.; GLEESON, D. L. Are some teat disinfectant formulations more effective against specific bacteria isolated on teat skin than others? **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 61, n. 1, p. 1–5, 2019.

FITZPATRICK, S. R.; GARVEY, M.; FLYNN, J.; O'BRIEN, B.; GLEESON, D. The effect of disinfectant ingredients on teat skin bacteria associated with mastitis in Irish dairy herds. **Irish Veterinary Journal**, v. 74, n. 1, p. 1–12, 2021a.

FITZPATRICK, S. R.; GARVEY, M.; FLYNN, J.; O'BRIEN, B.; GLEESON, D. Effect of pre-milking teat foam disinfection on the prevention of new mastitis rates in early lactation. **Animals**, v. 11, n. 9, p. 1–12, 2021b.

GALTON, D. M.; ADKINSON, R. W.; THOMAS, C. V.; SMITH, T. W. Effects of Premilking Udder Preparation on Environmental Bacterial Contamination of Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 8, p. 1540–1543, 1982.

GALTON, D. M.; PETERSSON, L. G.; MERRILL, W. G.; BANDLER, D. K.; SHUSTER, D. E. Effects of Premilking Udder Preparation on Bacterial Population, Sediment, and Iodine Residue in Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 11, p. 2580–2589, 1984.

GALTON, D. M.; PETERSON, L. G.; MERRILL, W. G. Evaluation of Udder Preparations on Intramammary Infections. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 1417–1421, 1988.

GIBSON, H.; SINCLAIR, L. A.; BRIZUELA, C. M.; WORTON, H. L.; PROTHEROE, R. G. Effectiveness of selected premilking teat-cleaning regimes in reducing teat microbial load on commercial dairy farms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 295–300, 2008.

GLEESON, D.; O'BRIEN, B.; FLYNN, J.; O'CALLAGHAN, E.; GALLI, F. Effect of pre-milking teat preparation procedures on the microbial count on teats prior to clusters application. **Irish Veterinary Journal**, v. 62, n. 7, p. 461–467, 2009.

GLEESON, D.; FLYNN, J.; O'BRIEN, B. O. Effect of pre-milking teat disinfection on new mastitis infection rates of dairy cows. **Irish Veterinary Journal**, v. 71, n. 1, p. 1–8, 2018.

GOUVÊA, F.L.R.; CARDOZO, L.L.; CANAL, J.; TRONCARELLI, M.Z.; PANTOJA, J.C.F. A descriptive study of teat morphology, milking machine characteristics, and milking practices in a sample of Brazilian dairy herds. **Livestock Science**, v. 241, p. 104196, 2020.

GONÇALVES, J. L.; TOMAZI, T.; DOS SANTOS, M. V. Rotina de ordenha eficiente para produção de leite de alta qualidade. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 15, n. 2, p. 9–14, 2017.

GUARÍN, J. F.; BAUMBERGER, C.; RUEGG, P. L. Anatomical characteristics of teats and premilking bacterial counts of teat skin swabs of primiparous cows exposed to different types of bedding. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 2, p. 1436–1444, 2017.

HILLERTON, J. E.; SHEARN, M. F. H.; TEVERSON, R. M.; LANGRIDGE, S.; BOOTH, J. M. Effect of pre-milking teat dipping on clinical mastitis on dairy farms in England. **Journal of Dairy Research**, v. 60, n. 1, p. 31–41, 1993.

HILLERTON, J. E.; BOOTH, J. M. The Five-Point Mastitis Control Plan-A Revisory Tutorial! *In: Annual Meeting National Mastitis Council, 57., 2018, NMC Annual Meeting Proceeding*. Tucson: NMC, 2018. p. 3-19.

- HUTTON, C.T.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D. Mastitis Control Practices: differences between herds with high and low milk somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 4, p. 1135-1143, 1990.
- INGAWA, K. H.; ADKINSON, R. W.; GOUGH, R. H. Evaluation of a Gel Teat Cleaning and Sanitizing Compound for Premilking Hygiene. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 5, p. 1224–1232, 1992.
- LAROCQUE, L.; MALIK, S. S.; LANDRY, D. A; PRESSEAU, S.; SVED, S.; MATULA, T. In Vitro Germicidal Activity of Teat Dips Against Nocardia asteroides and Other Udder Pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 5, p. 1233–1240, 1992.
- LASSA, H.; JAGIELSKI, T.; MALINOWSKI, E. Effect of Different Heat Treatments and Disinfectants on the Survival of *Prototheca zopfii*. **Mycopathologia**, v. 171, n. 3, p. 177–182, 2011.
- MACIEL, R. V. **Avaliação do crescimento fúngico em amostras obtidas dos tetos de vacas leiteiras sadias, antes e após a realização do pré-dipping**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Rondônia, Rolim de Moura, 2018. Disponível em: <<https://www.ri.unir.br/jspui/handle/123456789/2746>>. Acesso em: 05 jan. 2023.
- MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVENSSON, B.; KOLSTRUP, C. Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3866–3875, 2006.
- MEDEIROS, E. S.; SANTOS, M. V.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; FARIA, E. B.; WANDERLEY, G. G.; TELES, J. A. A.; MOTA, R. A. Avaliação in vitro da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 71–75, 2009.
- MENDONÇA, B. S.; SILVA JUNIOR, R. C.; YOSHIMURA, H. E.; KNUPP, I. S.; BANKUTI, F. I.; POZZA, M. S. S. Comparativo entre desinfetantes utilizados no pre-dipping de vacas leiteiras. **Ciência Animal**, v. 30, n. 2, p. 23-33, 2020.
- MORTON, J. M.; PENRY, J. F.; MALMO, J.; MEIN, G. A. Premilking teat disinfection: Is it worthwhile in pasture-grazed dairy herds? **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 12, p. 7525–7537, 2014.
- NICKERSON, S.C. Management strategies to reduce heat stress, prevent mastitis and improve milk quality in dairy cows and heifers. **UGA Ectension**, v. 1426, p. 1-10, 2014.
- NOGARA, K. F.; KAELLE, G. C. B.; TAVARES, Q. G.; MARCON, T. R.; GOPINGER, E.; ZOPOLLATTO, M.; DEBORTOLI, E. C. Influência das estações do ano sobre a qualidade microbiológica do leite de fazendas leiteiras da região norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, 2022.

OLDE RIEKERINK, R.G.M.; SAMPIMON, O.C.; EERLAND, V.J.; SWARTS, M.J.; LAM, T.J.G.M. Comparing bacterial counts on bare hands with gloved hands during milking. In: MASTITIS CONTROL: FROM SCIENCE TO PRACTICE. 12, 2008, Netherlands (The Hague). **Proceedings of International Conference**. 2008. p. 77-82.

OLIVER, S. P.; LEWIS, M. J.; INGLE, T. L.; GILLESPIE, B. E.; MATTHEWS, K. R. Prevention of Bovine Mastitis by a Premilking Teat Disinfectant Containing Chlorous Acid and Chlorine Dioxide. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 1, p. 287–292, 1993a.

OLIVER, S. P.; LEWIS, M. J.; INGLE, T. L.; GILLESPIE, B. E.; MATTHEWS, K. R.; DOWLEN, H. H. Premilking Teat Disinfection for the Prevention of Environmental Pathogen Intramammary Infections. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 10, p. 852–855, 1993b.

OLIVER, S. P.; GILLESPIE, B. E.; LEWIS, M. J.; INGLE, T. L.; DOWLEN, H. H. Evaluation of chlorhexidine as a premilking teat disinfectant for the prevention of intramammary infections during lactation. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 7, p. 614–618, 1994.

OLIVER, S. P.; GILLESPIE, B. E.; LEWIS, M. J.; IVEY, S. J.; ALMEIDA, R. A.; LUTHER, D. A.; JOHNSON, D. L.; LAMAR, K. C.; MOOREHEAD, H. D.; DOWLEN, H. H. Efficacy of a new premilking teat disinfectant containing a phenolic combination for the prevention of mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 6, p. 1545–1549, 2001.

PANKEY, J. W. Premilking Udder Hygiene. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 5, p. 1308-1312, 1989.

PANKEY, J. W.; DRECHSLER, P. A. Evolution of udder hygiene. Premilking teat sanitation. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 9, n. 3, p. 519–530, 1993.

PETERS, R. R.; KOMARAGIRI, S.; PAAPE, M. J.; DOUGLASS, L. W. Evaluation of 1.6% Phenol as a Premilking and Postmilking Teat Dip in Preventing New Bovine Intramammary Infections. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1750–1757, 2000.

PLOZZA, K; LIEVAART, J.J.; POTTS, G; BARKEMA, H.W. Subclinical mastitis and associated risk factors on dairy farms in New South Wales. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 1-2, p. 41-46, 2011.

RAMALHO, A. C.; SOARES, K. D. A.; DA SILVA, D. F.; BARROS, M. R. C.; JÚNIOR, J. W. P.; DE OLIVEIRA, J. M. B.; MOTA, R. A.; DE MEDEIROS, E. S. Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Staphylococcus* spp. Isolados em rebanhos leiteiros. **Pesquisa veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1285–1288, 2012.

RASMUSSEN, M. D.; GALTON, D. M.; PETERSSON, L. G. Effects of Premilking Teat Preparation on Spores of Anaerobes, Bacteria, and Iodine Residues in Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 8, p. 2472–2478, 1991.

ROWE, S. M.; TRANTER, W. P.; LAVEN, R. A. Effect of pre-milking teat disinfection on clinical mastitis incidence in a dairy herd in Northern Queensland, Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 96, n. 3, p. 69–75, 2018.

RUEGG, P. L.; DOHOO, I. R. A benefit to cost analysis of the effect of premilking teat hygiene on somatic cell count and intramammary infections in a commercial dairy herd. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 38, p. 632–636, 1997.

SALERNO, T.; RIBEIRO, M. G.; LANGONI, H.; SIQUEIRA, A. K.; COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; BUENO, V. F. F.; YAMAMURA, A. A. M.; ROESLER, U.; SILVA, A. V. In vitro algaecide effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine milk. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 2, p. 211–213, 2010.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Controle da Mastite e Qualidade do Leite: Desafios e Soluções**. 1. ed. Pirassununga: Edição dos Autores, 2019.

SANTOS, I. C.; SILVA, D. R.; OLIVEIRA, A. F.; OLIVEIRA, V. R.; MARTINS, L. A. Eficácia in vitro de desinfetantes utilizados no pré-dipping frente a amostras de *Staphylococcus* spp. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 3, n. 1, p. 1-4, 2018.

SHELDRAKE, R. F.; HOARE, R. J. T. Effect of a disinfectant udder wash and a post-milking teat dip on the bacterial population of the teat end and on the rate of new intramammary infection. **Journal of Dairy Research**, v. 47, n. 3, p. 253–258, 1980.

SILVA, J. L. V. **Contribuição para um manual de boas práticas de manejo da ordenha para a produção de leite de elevada qualidade nos Açores - Estudo de Alguns Pontos Críticos de Controlo**. 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar), Universidade dos Açores, Andra do Heroísmo, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.uac.pt/bitstream/10400.3/1360/1/DissertMaestradoJoseLuisValenteSilva2012.pdf>>. Acesso em: 15 jan 2023.

TOLEDO, I. Milking Management Program: Proper Milking Procedures to Optimize Milking Efficiency and Milk Quality. **EDIS UF IFAS Extension**, v. 2021, n. 5, p. 1-5, 2021.

VISSIO, C.; MELLA, A.; AMESTICA, L.; POL, M. Noninferiority study evaluating the efficacy of a teat disinfectant containing copper and zinc for prevention of naturally occurring intramammary infections in an automatic milking system. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 2, p. 1776–1784, 2020.

WILLIAMSON, J. H.; LACY-HULBERT, S. J. Effect of disinfecting teats post-milking or pre- and post-milking on intramammary infection and somatic cell count. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 61, n. 5, p. 262–268, 2013.

CAPÍTULO II

**EFEITO DA ANTISSEPSIA DUPLA DOS TETOS NA PRÉ-ORDENHA SOBRE A
LIMPEZA, CONTAGEM BACTERIANA DOS TETOS E NOVAS INFECÇÕES
INTRAMAMÁRIAS EM VACAS LEITEIRAS EM PASTEJO**

EFEITO DA ANTISSEPSIA DUPLA DOS TETOS NA PRÉ-ORDENHA SOBRE A LIMPEZA, CONTAGEM BACTERIANA DOS TETOS E NOVAS INFECÇÕES INTRAMAMÁRIAS EM VACAS LEITEIRAS EM PASTEJO

RESUMO

A antisepsia dupla (AD) difere da antisepsia convencional (AC) de tetos na pré-ordenha, pois os tetos passam pela antisepsia duas vezes para melhor remoção das sujidades dos tetos. A AD é recomendada por técnicos a campo, contudo, não há estudos que comprovem a sua superioridade em relação à AC. Desta forma, objetivamos avaliar a eficácia da AD sobre a limpeza, contagem bacteriana dos tetos e ocorrência de novas infecções intramamárias em vacas criadas em pastejo. O experimento foi realizado no rebanho de bovinos leiteiros do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da UDESC em Lages/SC. Inicialmente dois grupos com 8 vacas receberam a AD (uma antisepsia antes e outra após a retirada dos primeiros jatos de leite) ou a AC (somente uma imersão após a retirada dos primeiros jatos de leite) em todas as ordenhas. O experimento foi realizado por 8 meses e as vacas que pariram durante o período foram inscritas alternadamente em um dos grupos. O antisséptico comercial utilizado foi a base de peróxido de hidrogênio e ácido lático em ambos os tratamentos. Quinzenalmente, antes e após a antisepsia, foram avaliados o escore de limpeza dos tetos (ELT) e a contagem bacteriana de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., coliformes, Gram-negativos não coliformes e a contagem bacteriana total (CBT). Com a mesma frequência, foram coletadas amostras compostas de leite para Contagem de Células Somáticas (CCS) e avaliado os escores de hiperqueratose de ponta de tetos e dados de profundidade de úbere e *udder clearance*. As informações meteorológicas e os casos de mastite clínica também foram registrados. Os dados das variáveis qualitativas foram submetidos a análise de variância com medidas repetidas no tempo e as variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste de qui-quadrado através do pacote estatístico SAS®. O período experimental foi caracterizado por baixos índices pluviométricos, resultando em tetos ligeiramente sujos antes da antisepsia (ELT = 2,13 para AC e ELT = 2,16 para AD). Em média os úberes encontravam-se acima do jarrete, não predispondo a tetos sujos. Não observamos diferença entre AD e AC na redução do ELT ($P = 0,18$) e das contagens de *Staphylococcus* spp. ($P = 0,52$), *Streptococcus* spp. ($P = 0,32$),

coliformes ($P = 0,16$), Gram-negativos não coliformes ($P = 0,52$) e contagem bacteriana total ($P = 0,15$). Não houve diferenças na CCS ($P = 0,14$), na ocorrência de novas mastites subclínicas, nas infecções subclínicas crônicas e de curas ($P = 0,18$), assim como de mastite clínica ($P = 0,80$) entre AC e AD. Sendo assim, em vacas mantidas em sistema baseado em pastagens, a AD trás benefícios quando os tetos se apresentam, na média, tetos ligeiramente sujos (ELT = 2) antes da antisepsia. Sugere-se novos estudos em rebanhos onde há maior desafio ambiental, com alta prevalência de tetos sujos.

Palavras-chave: *Pré-dipping; Higiene dos tetos; CCS; Mastite; Qualidade do leite;*

ABSTRACT

Double disinfection (DD) differs from conventional disinfection (CONV) as the teats are disinfected twice to better remove dirt from the teats. AD is recommended by field technicians, however, there are no studies that prove its superiority over CONV. Thus, we aimed to evaluate the effectiveness of DD on cleaning, bacterial count of the teats and new intramammary infections in cows raised in a pasture-based system. The experiment was carried out in a herd of dairy cattle at the Center of Agroveterinary Sciences (CAV) of UDESC in Lages/SC. Two groups of 8 cows received DD (one disinfection before and another after the forestripping) or CONV (only one immersion after the forestripping) in all the milkings. The experiment was carried out for 8 months and the cows that calved during the period were enrolled alternately in one of the groups. The commercial disinfectant used was based on hydrogen peroxide and lactic acid in both treatments. Fortnightly, before and after disinfection, the teat cleanliness score (TCS) and bacterial count of *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., coliforms, Gram-negative noncoliform, total Gram-negative and total bacterial count (TBC). With the same frequency, composite samples of milk were collected for Somatic Cell Count (SCC) and evaluated for teat hyperkeratosis scores and udder depth and udder clearance data. Meteorological information and cases of clinical mastitis were also recorded. Data from qualitative variables were subjected to analysis of variance with repeated measures over time and qualitative variables were analyzed using the chi-square test in the SAS® statistical program. Overall, the experimental period was characterized by low rainfall, resulting in slightly dirty teats before milking (TCS = 2.13

for DC and TCS = 2.16 for DD). The udders were generally above the hocks, not predisposing to dirty teats. We did not observe any difference between DD and CONV in reducing TCS ($P = 0.18$) and *Staphylococcus* spp. ($P = 0.52$), *Streptococcus* spp. ($P = 0.32$), coliforms ($P = 0.16$), Gram-negative noncoliform ($P = 0.52$) and TBC ($P = 0.15$). There were no differences in SCC ($P = 0.14$), new subclinical mastitis, chronic subclinical infections and cures predicted by SCC ($P = 0.18$) and clinical mastitis ($P = 0.80$) between CONV and DD. Therefore, in cows kept in a pasture-based system, DD does not bring benefits when teats are, on average, slightly dirty teats (TCS = 2) before disinfection. Further studies are suggested in herds where there is an environmental challenge and a high prevalence of dirty teats.

Keywords: Pre-dipping; Teat hygiene; SCC; Mastitis; Milk quality.

1. INTRODUÇÃO

A antisepsia dos tetos pré-ordena ou *pré-dipping* consiste em expor os tetos ao antisséptico por aproximadamente 30 segundos após a retirada dos primeiros jatos de leite com o intuito de reduzir a carga bacteriana dos tetos. Dessa forma, a antisepsia evita a contaminação microbiana do leite e a ascensão dos microrganismos ambientais para o interior da glândula mamária que podem provocar mastite (PANKEY, 1989; TOLEDO, 2021). Os principais antisséptico utilizados comercialmente são a base de ácido lático, clorexidina, clore e iodo (FITZPATRICK et al., 2019, 2021).

O grau de sujidade dos tetos antes da ordenha em vacas criadas em pastejo está relacionado com as condições ambientais as quais as vacas estão expostas, como chuva e alta umidade relativa do ar (NOGARA et al., 2022). Aspectos relacionados à vaca, como a conformação do úbere, também influenciam na sujidade dos tetos antes da ordenha, pois úberes muito próximos ao chão são mais predispostos à contaminação ambiental (CÓRDOVA et al., 2018). As irregularidades dos tetos devido a rachaduras e à hiperqueratose de ponta de teto em grau elevado dificulta a antisepsia além de predispor a quadros de mastite (PANTOJA et al., 2020). Visto isso, quando as condições ambientais e a conformação de úbere favorecem

tetos sujos antes da ordenha, a eficiência da antisepsia dos tetos pode ser prejudicada.

O uso de toalhas de tecidos com antisséptico nos protocolos de antisepsia pré-ordenha pode ser uma alternativa para melhor limpeza dos tetos sujos, devido fricção com os tetos (MAGNUSSON et al., 2006). No entanto, o emprego de toalhas de tecido individuais requer tempo para correta limpeza e sanitização após seu uso (SILVA, 2011). A antisepsia dupla dos tetos na pré-ordenha (AD) pode ser uma alternativa. Essa técnica, apesar de não está descrita na literatura, consiste em umedecer os tetos com antisséptico duas vezes, uma antes e outra após a retirada dos primeiros jatos de leite. Desta forma, a fricção da mão do ordenhador na manipulação dos tetos úmidos com antisséptico pode favorecer o desprendimento da sujeira. Já na segunda aplicação, o antisséptico age nos tetos por cerca de 30 segundos para a antisepsia e logo após eles são secos com papel toalha.

A partir de dados de campo, Durst (2012) no estado de Michigan nos Estados Unidos, relata que a antisepsia dupla nos tetos pode reduzir a incidência de infecções intramamárias e auxiliar no controle da Contagem de Células Somáticas (CCS) no leite. No Brasil, a técnica é utilizada em algumas propriedades e recomendada por técnicos a campo. No entanto, a superioridade na limpeza e antisepsia da AD em relação a antisepsia convencional (uma antisepsia) não foi testada. A redução de novas infecções intramamárias clínicas e subclínicas em decorrência da melhor antisepsia dos tetos também precisam ser avaliada. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da antisepsia dupla na pré-ordenha sobre a limpeza, contagem bacteriana dos tetos e novas infecções intramamárias em vacas criadas em pastejo em comparação com a antisepsia convencional.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado de novembro de 2021 a julho de 2022 no setor de bovinocultura de leite do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV/UDESC em Lages, Santa Catarina (latitude 27°47'06.6" Sul, longitude 50°18'17.7" Oeste e altitude de 950 metros acima do nível do mar). O projeto foi aprovado pelo comitê de ética de uso e experimentação animal da mesma instituição, sob número de protocolo 7342210222. O clima é do tipo Cfb

(mesotérmico úmido com verão ameno) de acordo com a classificação de Köppen (KÖPPEN; GEIGER, 1928). O sistema de produção é baseado em pastejo rotacionado com suplementação. A ordenha era realizada duas vezes ao dia, às 07h00 e às 15h00, em sala de ordenha com contenção espinha-de-peixe 2x4 com sistema de ordenha canalizado com 4 conjuntos de ordenha e extração automática de teteiras.

As vacas da raça Holandesa e mestiços Jersey x Holandês foram divididas em dois grupos sendo que um era submetido ao *pré-dipping* com antisepsia dupla (AD) e outro com antisepsia convencional (AC). Para inclusão no estudo, as vacas precisavam estar entre 7 e 215 dias em lactação e não apresentar mastite clínica no mês antecedente ao início experimento. Foi realizado a alocação não aleatória das vacas em um dos grupos que levou em conta a produção de leite, paridade, CCS do último mês, média geométrica da CCS dos três últimos meses, escore de hiperqueratose de ponta de tetos e características de morfologia de úbere (Tabela 1). Para as vacas que pariram em menos de três meses antes do início do experimento foram consideradas somente as medidas CCS mensais realizadas após o parto, não totalizando três observações.

Tabela 1 – Valores médios dos indicadores utilizados para a seleção não aleatória das vacas na formação dos grupos com antisepsia convencional (AC) e antisepsia dupla (AD).

Parâmetros	AC	AD
Número de vacas	8	8
Produção de leite (kg) ¹	23,8	21,9
Paridade ¹	2	2
Dias em lactação ¹	132	131
CCS ² – última coleta antes do início do experimento (CS/ml)	93	96
CCS ² – média geométrica das três últimas avaliações mensais antes do início o experimento (CS/ml)	68	104
Escore de hiperqueratose de ponta de teto médio dos 4 tetos ¹	2	1,5
Profundidade de úbere (cm) ¹	14,5	15
<i>Udder clearance</i> (cm) ¹	62	65,5

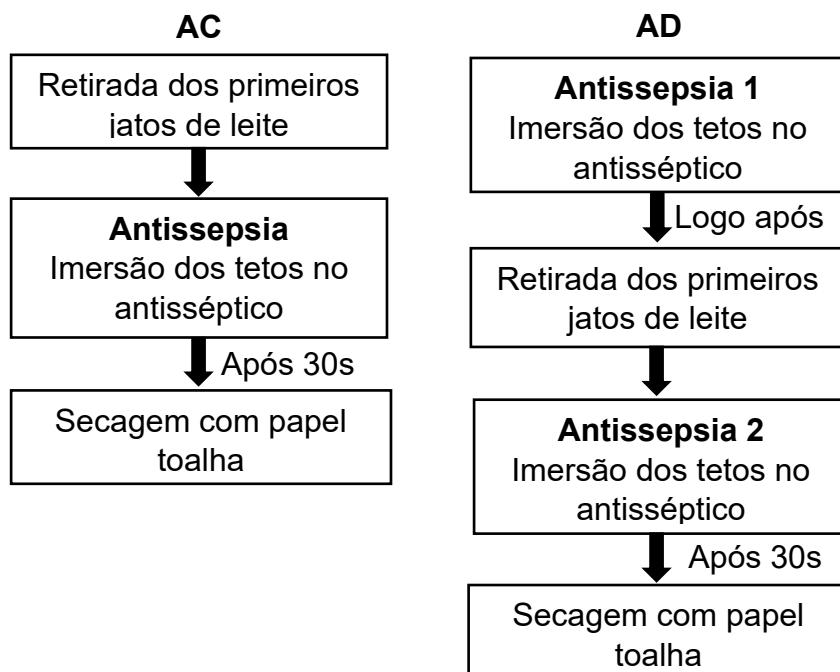
Legenda: ¹Média aritmética das vacas do mesmo grupo; ²Média geométrica das vacas do mesmo grupo.

Fonte: Elaborada pelos autores (2023).

Os animais foram desligados do estudo no momento da secagem. A primeira vaca que pariu após o início do experimento foi inclusa, sete dias após o parto, em um dos grupos por meio de sorteio. As vacas que pariram na sequência foram alocadas alternadamente a um dos tratamentos para garantir a homogeneização dos grupos. Ao longo do estudo foram incluídas 4 e 5 vacas nos grupos com antisepsia convencional (AC) e antisepsia dupla (AD), respectivamente. Foram secas 5 vacas do grupo com AC e 7 vacas do grupo com AD. O experimento encerrou com 7 e 6 vacas, respectivamente, nos tratamentos com AC e AD.

Os tratamentos consistiam em imergir os tetos antes da ordenha em espuma de antisséptico comercial a base de peróxido de hidrogênio e ácido lático (Peroxilac™, Weizur) uma ou duas vezes, respectivamente, para os grupos AC e AD (Figura 1). Os animais permaneceram no mesmo lote, sendo as vacas do grupo AD identificadas com uma pulseira verde no pé esquerdo para facilitar a identificação do ordenhador. Os grupos foram submetidos ao respectivo tratamento em todas as ordenhas, ou seja, duas vezes ao dia durante o período experimental. A antisepsia pós-ordenha foi realizada com antisséptico a base de iodo para ambos os grupos (Blocking™, Weizur).

Figura 1 - Esquema de aplicação da AC (antisepsia convencional) e da AD (antisepsia dupla).



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Em todos as vacas, quinzenalmente, foi avaliado o escore de limpeza dos tetos (ELT) e do úbere (ELU) e realizadas coletas com suabes na superfície dos tetos para contagem bacteriana antes e após a aplicação dos tratamentos. Essas amostragens foram feitas durante a ordenha matutina, pois, segundo Fitzpatrick et al. (2019), nesta ordenha as vacas apresentam tetos mais sujos e consequentemente contagem bacterianas mais altas quando comparado com as demais ordenhas. Na ordenha vespertina foi avaliado o escore de hiperqueratose de ponta de teto de todas as vacas e realizado as medidas de profundidade de úbere (altura do úbere ao jarrete) e *udder clearance* (altura do úbere ao chão) nas vacas recém-paridas que iriam ingressar no experimento. Também foram coletadas, no mesmo dia, amostras compostas de leite de todos os quartos mamários para Contagem de Células Somáticas (CCS). Informações meteorológicas dos dias de coleta e do dia anterior a ela foram armazenados para avaliar as condições ambientais. Ao todo foram realizadas 18 coletas quinzenais, de 24/11/2021 a 22/07/2022.

2.1 Limpeza de úbere e tetos

O escore de limpeza de úbere (ELU) foi avaliado em 4 escores, de 1 a 4, onde 1 caracterizava um úbere limpo, 2 úbere ligeiramente sujo, 3 úbere moderadamente sujo e 4 úbere extremamente sujo, de acordo com os critérios estabelecidos por Cook e Reinemann (2007). O ELT foi avaliado esfregando uma toalha umedecida três vezes da base para o ápice do teto, semelhante ao realizado por Córdova et al. (2018). Para cada vaca foram utilizadas duas toalhas devidamente identificadas, uma antes da antisepsia no teto anterior esquerdo e outra após a antisepsia no teto posterior direito. Conforme descrito por Hovinen (2009), após a secagem das toalhas a temperatura ambiente, elas foram visualmente classificadas em 5 escores (de 0 a 4), onde os escores 0 e 4 correspondem, respectivamente, aos tetos limpos e extremamente sujos (Figura 2).

Figura 2 – Escores de Limpeza de Tetos (ELT).



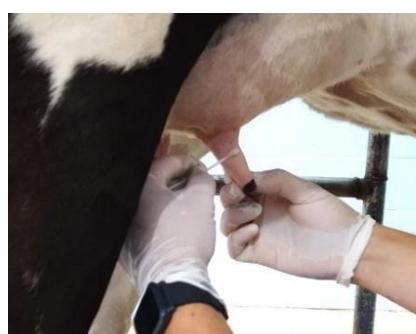
Legenda: Da esquerda para direita: ELT 0 (teto limpo), ELT 1 (teto quase limpo), ELT 2 (teto ligeiramente sujo), ELT 3 (teto sujo) e ELT 4 (teto extremamente sujo).

Fonte: Elaborado pelos autores.

2.2 Contagem bacteriana dos tetos

A contagem bacteriana dos tetos foi avaliada a partir de suabes coletados nos tetos anterior direito e posterior esquerdo. Os suabes umedecido com água peptonada tamponada (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) foram friccionados dorsoventralmente na face cranial e lateral externa dos tetos antes e após o protocolo de antisepsia pré-ordenha, respectivamente, em concordância com Córdova et al. (2018) (Figura 3). Após a coleta, os suabes foram condicionados em frascos com 4 ml com água peptonada tamponada (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), conforme descrito por Baumberger, Guarín e Ruegg (2016), e foram transportados entre 2°C e 8°C até o Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) do CAV/UDESC.

Figura 3 - Suabe sendo friccionado na face lateral externa do teto após o protocolo de antisepsia pré-ordenha.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

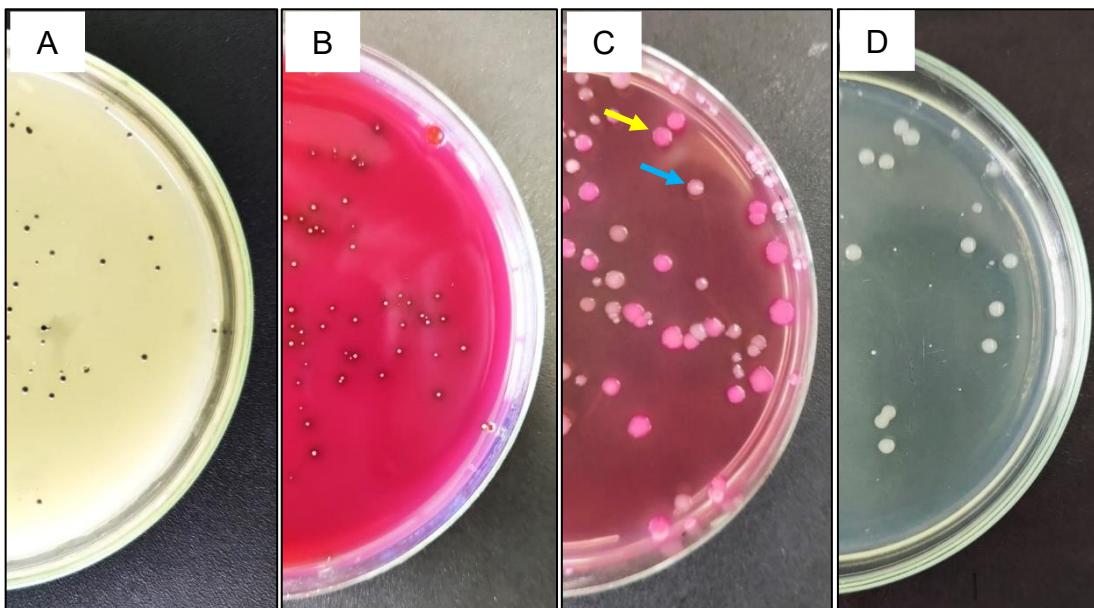
As contagens de coliformes, Gram-negativos não coliformes, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e Contagem Bacteriana Total (CBT) foram realizadas. O ágar MacConkey (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) foi utilizado para a contagem de coliformes (lactose positivas e de cor rosa) e de Gram-negativos não coliformes (colônias lactose negativas e incolores) (BAUMBERGER; GUARÍN; RUEGG, 2016). A contagem total de bactérias Gram-negativas correspondeu a soma dos coliformes e Gram-negativos não coliformes. A contagem de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. foram realizadas, respectivamente, em ágar Baird Parker (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) suplementado com 5% de Telurito Gema de ovo (Newprov, Pinhais, Brasil) e ágar Edwards Modificado (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) enriquecido com 5% de sangue bovino (FITZPATRICK et al., 2019, 2021; GLEESON et al., 2009). A CBT foi efetuada a partir do *Plate Count Agar - PCA* (Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil).

Antes de semear as amostras nos meios de cultura, foram realizadas diluições seriadas a partir das amostras contendo os suabes com o objetivo reduzir sucessivamente a carga bacteriana e permitir o crescimento de colônia isoladas. Para isso, após agitar os tubos com os suabes para o desprendimento da sujidade, 1 ml da solução homogeneizada foi transferida para um tubo com 9 ml de solução salina estéril, resultando na diluição 1:10 (10^1). Em seguida, 1 ml da solução com diluição 1:10 foi transferida para um novo tubo com 9 ml de solução salina estéril, resultando na diluição 1:100 (10^2). Esse procedimento foi repetido mais uma vez para atingir a diluição de 1:1000 (10^3). Para as amostras coletadas antes da antisepsia normalmente utilizou-se as diluições de 1:100 ou 1:1000, enquanto para as amostras coletadas após a antisepsia utilizava-se diluições menores, como 1:10 ou sem diluição.

A quantidade de inóculo semeada em cada placa foi determinada em um estudo piloto prévio. Desta forma, inoculou-se no ágar Baird Parker, Edwards modificado, MacConkey e PCA, respectivamente, 100 μ l, 100 μ l, 50 μ l e 10 μ l de uma das diluições de antes e outra de depois da antisepsia. O inóculo foi homogeneizado na placa com auxílio da alça de *Drigalski* e posteriormente as placas foram incubadas a 37°C ± 2°C por 24 horas (FITZPATRICK et al., 2021). Após a incubação, as colônias presentes na placa foram contadas. No caso do ágar MacConkey foi contabilizado separadamente os coliformes e Gram-negativos não coliformes. Caso a contagem não fosse possível por excesso ou ausência de colônias, uma nova tentativa foi realizada com outra diluição e as placas foram incubadas para contagem final após 24 horas (Figura 4).

Foi considerado ausência de crescimento para determinado grupo bacteriano se não houve crescimento na amostra sem diluição.

Figura 4 - Colônias bacterianas isoladas no CEDIMA, CAV/UDESC



Legenda: *Staphylococcus* spp. em ágar Baird Parker (A), *Streptococcus* spp. em ágar Edwards modificado (B), Gram-negativos em ágar MacConkey (C) com colônias de coliformes de cor rosa (seta amarela) e de Gram-negativos não coliformes de cor esbranquiçada (seta azul) e colônias para CBT em ágar PCA (D).

Fonte: Elaborada pelos autores (2023).

A contagem para cada grupo bacteriano foi padronizada em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro (ml). Para isso, o valor contato foi multiplicado pelo fator de diluição e pelo fator de correção (FC) para ml. O FC baseou-se na quantidade de inóculo utilizada e foi de 10, 10, 50 e 100 para os ágaros Baird Parker, Edwards modificado, MacConkey e PCA, respectivamente.

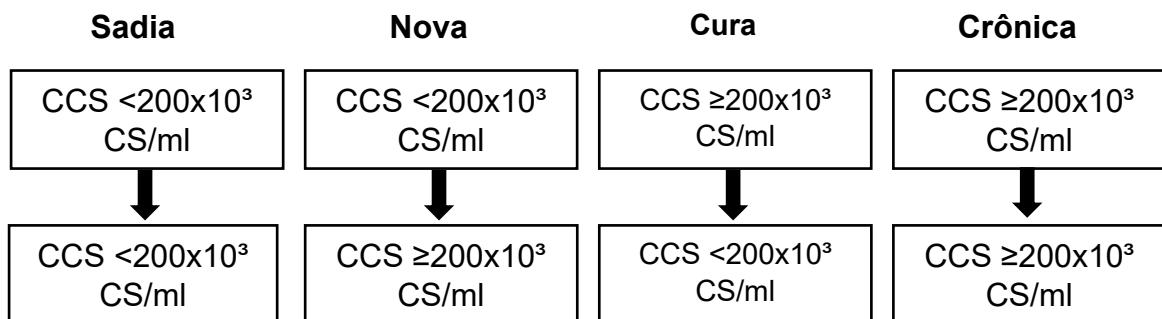
2.3 CCS e diagnóstico de mastite

O leite destinado à CCS foi coletado nos copos medidores durante a ordenha da manhã e da tarde para conter uma alíquota de leite representativa da produção total diária. O leite amostrado foi coletado em frasco-padrão com conservantes Brononata, constituído de natamicina e Bronopol. As amostras foram enviadas para

laboratório da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL) e analisadas por citometria de fluxo. O resultado para CCS foi expresso em células somáticas (CS) por mililitro (ml) de leite.

As novas infecções intramamárias subclínicas bem como as curas e as infecções crônicas foram determinados a partir da CCS. O ponto de corte foi 200×10^3 CS/ml, desta forma, em duas coletas subsequentes com intervalo de 15 dias, cada vaca foi classificada em: sadia, com nova infecção subclínica, curada ou com infecção subclínica crônica, conforme Schukken et al. (2003) (Figura 5).

Figura 5 – Classificação da mastite subclínica a partir da CCS (CS/ml) de duas coletas subsequentes com intervalo de 15 dias.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Todos os quadros de mastite clínica diagnosticados pela alteração visual do leite no teste da caneca de fundo foram registrados com a identificação da vaca, do quarto mamário e do grau de gravidade, sendo 1 (leve), somente alteração no leite; 2 (moderado), alteração no leite e no úbere (dor, rubor, calor ou edema); 3 (grave), alterações no leite, no úbere e sinais sistêmicos, tais como febre, inapetência e desidratação (OLIVEIRA et al., 2015). Foi considerado um novo caso de mastite clínica quando intervalo entre casos no mesmo quarto mamário fosse maior que 14 dias (SANTOS; FONSECA, 2019).

2.4 Conformação de úbere e escore de hiperqueratose de ponta de teto

As características de conformação de úbere avaliadas foram a profundidade de úbere e o *udder clearance*, pois estão diretamente relacionadas a sujidade presente

nos tetos (CÓRDOVA et al., 2018). Conforme descrito por Heins et al. (2008), a profundidade de úbere foi caracterizada como a distância, em cm, do fundo do úbere com a articulação tibiotársica (jarrete). Já o *udder clearance* foi determinado segundo Knob et al. (2020) e refere-se a distância entre o fundo do úbere e o solo em cm. Essas avaliações foram feitas no momento da inclusão do animal no experimento.

O escore de hiperqueratose de ponta de teto foi avaliado em uma escala de 1 a 4 conforme Mein et al. (2001). O escore 1 caracterizava esfíncteres de tetos sem formação de anel, enquanto o escore 4 referia-se a ponta de tetos com expressiva formação de anel rugoso. A avaliação da extremidade de cada teto foi realizada quinzenalmente após a ordenha vespertina em todas as vacas do experimento.

2.5 Dados meteorológicos

Os dados de precipitação (mm), a temperatura média do ar ($^{\circ}\text{C}$) e a umidade relativa do ar média (%) foram registradas pela estação meteorológica da Empresa de Pesquisa e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) localizada à 200 metros da sala de ordenha. Quinzenalmente, foram registradas as informações meteorológicas do dia da coleta e do dia anterior a ela para representar as condições ambientais que podem interferir na limpeza dos tetos no momento da avaliação. Foi considerado a estação quente da primeira (24/11/2022) à oitava coleta (16/03/2023) e estação fria da nona (30/03/2023) à última coleta (21/07/2023).

2.6 Análise estatística

A partir dos dados meteorológicos foi estimada a média das precipitações, das temperaturas médias e das umidades relativas médias do dia da coleta e do dia anterior a coleta, resultando em uma única informação para cada variável meteorológica por coleta. Estes dados foram utilizados para análises estatísticas multivariadas. Foi elaborado um gráfico em planilha Excel (Microsoft, Redmond, WA) com os dados meteorológicos e as datas das coletas, visando a observação do comportamento destas variáveis.

Os dados de cada tipo de contagem de microrganismos (coliformes, Gram-negativos não coliformes, *Straphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e CBT) encontrados no suave de tetos, assim como do ELU, ELT, CCS e hiperqueratose foram submetidos a análise de variância com medidas repetidas no tempo, utilizando o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS®. Os dados foram previamente testados para normalidade de resíduos pelo procedimento UNIVARIATE do pacote estatístico SAS®, usando o teste de Kolmogorov-Smirnov com significância de 0,05. Foram consideradas diferenças significativas para valores de $P < 0,05$ e tendência para valores entre 0,05 e 0,10. Os dados de medidas de morfometria de úbere (profundidade de úbere e *udder clearance*) foram analisados em um modelo similar, porém sem medidas repetidas no tempo.

Visando obter normalidade dos resíduos, todas as contagens bacterianas dos tetos e a CCS foram transformadas em logaritmo na base 10. Para as variáveis de microbiologia de teto e ELT foram realizadas três procedimentos MIXED independentes: um para antes da antisepsia, um para após a antisepsia e outro para a redução entre eles. A redução foi calculada pela diferença entre os valores depois e antes da antisepsia, de modo que valores negativos indicam redução da contaminação ou da sujidade dos tetos. A redução de todas as classes de bactérias estudadas foi a diferença entre os valores de \log_{10} das contagens de depois da antisepsia e as de antes do tratamento.

O efeito dos tratamentos sobre a porcentagens de novas infecções subclínicas, cura, infecções crônicas e vacas sadias, assim como da presença de mastite clínica foi analisado pelo teste de Qui-quadrado, utilizando o procedimento FREQ do pacote estatístico SAS®.

Paralelamente às análises estatísticas univariada foi realizada análise multivariada pela técnica de análise fatorial, visando avaliar a relação das variáveis microbiológicas, meteorológicas e dos escores ELU e ELT entre si, sendo utilizados os valores das contagens bacterianas dos suabes de tetas logaritmadas de antes e após a antisepsia, independente dos tratamentos aplicados. A análise foi realizada utilizando o procedimento FACTOR do pacote estatístico SAS®, com a rotação da matriz Promax, sendo os dados previamente padronizados pelo procedimento STANDARD. Foram consideradas significativas as cargas fatoriais $\geq 0,4$.

3. RESULTADOS

Foram obtidas 277 observações de escore de limpeza de tetos (ELT) e úbere (ELU), sendo 141 e 136 observações nas vacas com antisepsia dupla e convencional, respectivamente. O ELU médio foi de 1,34 durante o experimento, com grande parte dos úberes com escores 1 (úbere limpo) e 2 (úbere ligeiramente sujo). O ELT antes da antisepsia (ELT_A) foi acima de 2 (tetos levemente sujos) (Tabela 2). Após a antisepsia, o ELT (ELT_D) foi de aproximadamente 1 (tetos quase limpos) para ambos os tratamentos ($P = 0,41$). A redução da limpeza média dos tetos foi de -1,11 a -1,25 para AC e AD, respectivamente, sendo que não houve diferença entre fazer a antisepsia dos tetos uma ou duas vezes ($P = 0,18$). A profundidade de úbere foi de $11,7 \pm 2,1$ cm para AD e $12,6 \pm 1,62$ cm para AC. Já nas vacas com AD, o *udder clearance* foi de $61,8 \pm 2,2$ cm, enquanto nas vacas com AC foi de $60,6 \pm 1,7$ cm. Não houve diferenças entre os tratamentos para profundidade de úbere ($P = 0,60$) e *udder clearance* ($P = 0,63$).

Tabela 2 - Valores médios ± erros-padrão da média e valores de P dos escores de limpeza de teto na antisepsia convencional (AC) e da antisepsia dupla (AD).

Escore de limpeza de teto	Tratamento		P
	AC	AD	
ELT_A ¹	$2,13 \pm 0,12$	$2,16 \pm 0,12$	0,84
ELT_D ²	$1,00 \pm 0,08$	$0,92 \pm 0,09$	0,41
Dif_ELT ³	$-1,11 \pm 0,08$	$-1,25 \pm 0,10$	0,18

Legenda: ¹Escore de limpeza de tetos antes da antisepsia; ²Escore de limpeza de tetos após a antisepsia; ³Diferença entre o escore de limpeza de tetos depois e antes da antisepsia.

Fonte: Elaborada pelos autores (2023).

O número de observações (n) para as contagens de coliformes, Gram-negativos não coliformes, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e contagem bacteriana total variaram de 236 a 274 (Tabela 3). A variação se deve à exclusão das contagens nulas antes da antisepsia e as observações com erros após a segunda incubação. As contagens médias de coliformes, Gram-negativos não coliformes antes da antisepsia (CCOL_A; CNCOL_A) foram acima de $3,0 \log_{10}$ UFC/ml (Tabela 3). A contagem de coliformes após a desinfecção tendeu a ser menor para a antisepsia dupla ($P = 0,08$), no entanto, não houve diferenças estatísticas na redução desse grupo bacteriano ($P = 0,16$). No geral, a redução média das bactérias Gram-negativas

foi entre -2,0 e -2,5 log₁₀ UFC/ml, sendo maior que os demais grupos bacterianos avaliados.

Tabela 3 - Valores médios ± erros-padrão da média das contagens bacterinas em logaritmo na base 10 da antisepsia convencional (AC) e da antisepsia dupla (AD).

Contagem Bacteriana	n	Tratamento		P
		AC	AD	
CCOL_A ¹	160	3,25±0,15	3,21±0,17	0,86
CCOL_D ²	160	1,10±0,19	0,67±0,22	0,08
Dif_CCOL ³	160	-2,14±0,21	-2,51±0,24	0,16
CNCOL_A ⁴	194	3,56±0,13	3,59±0,0,15	0,85
CNCOL_D ⁵	194	1,32±0,18	1,21±0,21	0,67
Dif_CNCOL ⁶	194	-2,22±0,15	-2,36±0,18	0,52
CSTE_A ⁷	254	3,23±0,17	3,34±0,15	0,56
CSTE_D ⁸	254	1,27±0,18	1,15±0,22	0,59
Dif_CSTE ⁹	254	-1,87±0,14	-2,06±0,17	0,32
CSTA_A ¹⁰	257	4,22±0,17	4,27±0,19	0,76
CSTA_D ¹¹	257	2,95±0,22	3,18±0,25	0,40
Dif_CSTA ¹²	257	-1,12±0,13	-1,23±0,15	0,52
CBT_A ¹³	269	4,70±0,13	4,90±0,14	0,18
CBT_D ¹⁴	269	3,72±0,10	3,75±0,12	0,79
Dif_CBT ¹⁵	269	-0,92±0,11	-1,12±0,13	0,15

Legenda: ¹Contagem de coliformes antes da antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ²Contagem de coliformes após a antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ³Diferença entre a contagem de coliformes de depois e antes da antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ⁴Contagem de Gram-negativos não coliformes antes da antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ⁵Contagem de Gram-negativos não coliformes após a antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ⁶Diferença entre a contagem de Gram-negativos não coliformes de depois e antes da antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ⁷Contagem de *Streptococcus* spp. antes da antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ⁸Contagem de *Streptococcus* spp. após a antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ⁹Diferença entre a contagem de *Streptococcus* spp. de depois e antes da antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ¹⁰Contagem de *Staphylococcus* spp. antes da antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ¹¹Contagem de *Staphylococcus* spp. após a antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ¹²Diferença entre a contagem de *Staphylococcus* spp. de depois e antes da antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ¹³Contagem bacteriana total antes da antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ¹⁴Contagem bacteriana total após a antisepsia (log₁₀ UFC/ml); ¹⁵Diferença entre a contagem bacteriana total de depois e antes da antisepsia (log₁₀ UFC/ml);

Fonte: Elaborada pelos autores (2023).

As contagens médias de *Streptococcus* spp. antes da antisepsia (CSTE_A) variaram de 3,1 a 3,5 log₁₀ UFC/ml (Tabela 3). Após a antisepsia, não houve diferença nas reduções da população de *Streptococcus* spp. (Dif_CSTE) entre a AD e AC ($P = 0,32$). A população média de *Staphylococcus* spp. antes da antisepsia (CSTA_A) foram acima de 4,0 log₁₀ UFC/ml, sendo maior que a população inicial de *Streptococcus* spp. (CSTE_A). Apesar desta contagem inicial mais elevada, não houve diferenças entre os tratamentos para *Staphylococcus* spp. ($P = 0,52$).

A contagem bacterina total antes da antisepsia (CBT_A) apresentou valores médios superiores a $4,5 \log_{10}$ UFC/ml (Tabela 3). A contagem bacteriana total após a antisepsia (CBT_D) e a redução da contagem bacteriana total (Dif_CBT) não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos ($P = 0,79$ para CBT_D e $P = 15$ para Dif_CBT).

O escore de hiperqueratose de ponta de teto (EH) médio foi de $1,77 \pm 0,12$ e $1,86 \pm 0,12$ para a antisepsia dupla e convencional, respectivamente. Não se observou diferenças para EH entre a AD e a AC ($P = 0,20$).

Foram obtidas 282 observações para contagem de células somática (CCS), sendo 146 para AD e 136 para AC. A CCS média, em \log_{10} células somáticas/ml, foi de $5,21 \pm 0,14$ para a antisepsia convencional e de $5,36 \pm 0,14$ para a antisepsia dupla, sem diferença entre os tratamentos ($P = 0,14$).

A porcentagem de vacas sadias, com novas mastites subclínicas, curadas e com infecções crônicas estão apresentadas na Tabela 4. As novas infecções subclínicas foram de 5,67% e 6,38% para a antisepsia convencional e dupla, respectivamente. A dinâmica das mastites subclínicas baseadas na CCS não apresentou diferenças entre a AD e a AC, segundo o teste Qui-quadrado ($P = 0,18$).

Tabela 4 - Porcentagem de novas mastites subclínicas, curas, infecções subclínicas crônicas e de vacas sadias na antisepsia dupla (AD) e convencional (AC).

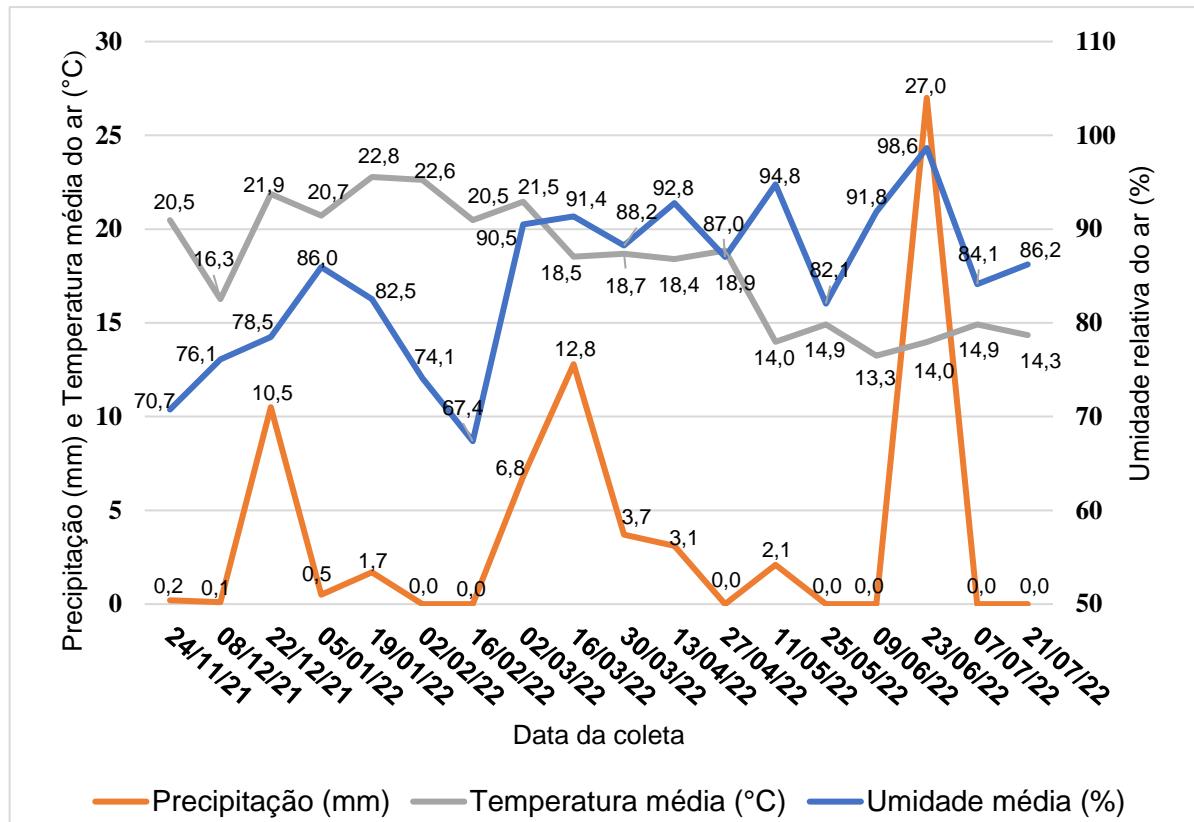
Tratamento	n	Cura (%)	Crônica (%)	Nova Infecção (%)	Sadia (%)	Total (%)
AD	146	3,55	16,67	5,67	25,89	51,77
AC	136	4,26	9,93	6,38	27,66	48,23

Fonte: Elaborada pelos autores (2023).

Durante os oito meses de experimentos foram diagnosticados 20 casos de mastite clínica, sendo 12 no grupo com antisepsia dupla e 8 no grupo com antisepsia convencional. Os 20 casos foram diagnosticados em 11 vacas, desta forma, alguns animais tiveram mais de um caso de mastite clínica durante o experimento. 90% dos quadros de mastite clínica (18 dos 20 casos) foram leves (grau 1), ou seja, somente com alteração visual no leite. Não houve diferenças nos casos de mastite clínica entre a antisepsia dupla e convencional ($P = 0,80$).

A precipitação média foi baixa durante o período experimental, com somente 3 coletas com precipitação média acima de 10mm (Figura 6). Durante a estação quente, a temperatura média do ar permaneceu amena, com pico de 22,8°C em janeiro. Já durante a estação fria, as temperaturas médias caíram e permaneceram em torno de 13 a 15°C de maio a julho. A umidade relativa do ar média aumentou com a avanço do experimento e chegada do inverno (Figura 6).

Figura 6 - Gráfico da precipitação (mm), da temperatura do ar média ($^{\circ}\text{C}$) e da umidade relativa do ar média (%) resultantes da média do dia anterior a coleta e no dia da coleta durante o experimento.



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Na análise factorial, quatro fatores foram gerados a partir das informações meteorológicas, das contagens bacterianas e os escores de limpeza de tetos (ELT) de antes e depois a antisepsia e dos escores de limpeza de úbere (Tabela 5). Esses fatores explicam 64,67% da variabilidade total. No fator 1, a alta contagem bacteriana total depois da antisepsia (CBT_D) teve relação com a alta contagem de Gram-negativos, de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. depois da antisepsia. O

mesmo pode ser observado no fator 2 para a contagem de todos os grupos bacterianos antes da antisepsia (Tabela 5).

Tabela 5 - Cargas fatoriais, comunalidades e porcentagem da variância de cada variável na avaliação da inter-relação das contagens bacterianas e os escores de limpeza de tetos de antes e após a antisepsia e as informações meteorológicas.

Variável	Fatores				Comunalidade
	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	
Precipitação (mm)*	0,36082	-0,21618	-0,09230	0,70281	0,69
Umidade (%)*	-0,05053	-0,03809	0,27262	0,86162	0,77
Temperatura (°C)*	0,41279	-0,14104	-0,64368	-0,26908	0,63
CBT_A ¹	0,20962	0,60094	-0,18169	-0,01634	0,53
CBT_D ²	0,64883	0,07246	0,04064	0,28057	0,56
CGNEG_A ³	0,00063	0,69931	0,05519	-0,29767	0,55
CGNEG_D ⁴	0,62473	0,30566	0,10753	-0,15909	0,60
CSTA_A ⁵	0,36018	0,50773	-0,19251	0,28381	0,69
CSTA_D ⁶	0,69207	0,07406	-0,09932	0,36986	0,73
CSTE_A ⁷	0,07214	0,84010	0,19566	-0,02105	0,76
CSTE_D ⁸	0,73909	0,11101	0,08828	-0,00221	0,60
ELT_A ⁹	0,14200	0,14853	0,75379	-0,02091	0,60
ELT_D ¹⁰	0,02594	-0,06800	0,84774	0,14255	0,73
ELU ¹¹	0,56215	-0,24434	0,57440	-0,20439	0,64

Legenda: *Referem-se a média do dia anterior à coleta e do dia da coleta; ¹Contagem Bacterina Total antes da antisepsia (\log_{10} UFC/ml); ²Contagem Bacterina Total após a antisepsia (\log_{10} UFC/ml); ³Contagem total de Gram-negativos (soma de coliformes e Gram-negativos não coliformes) antes da antisepsia (\log_{10} UFC/ml); ⁴Contagem total de Gram-negativos após a antisepsia (\log_{10} UFC/ml); ⁵Contagem de *Staphylococcus* spp. antes da antisepsia (\log_{10} UFC/ml); ⁶Contagem de *Staphylococcus* spp. após a antisepsia (\log_{10} UFC/ml); ⁷Contagem de *Streptococcus* spp. antes da antisepsia (\log_{10} UFC/ml); ⁸Contagem de *Streptococcus* spp. após a antisepsia (\log_{10} UFC/ml); ⁹Escore de limpeza de tetos antes da antisepsia; ¹⁰Escore de limpeza de tetos após a antisepsia; ¹¹Escore de limpeza de úbere.

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

No fator 3 (Tabela 5), observou-se a relação da baixa temperatura média do ar (estação fria) com o alto escore de limpeza de tetos antes (ELT_A) e depois (ELT_D) da antisepsia e a alto escore de limpeza de úbere (ELU). Desta forma, pode-se inferir que à antisepsia pré-ordenha pode não ser eficiente em eliminar todas as sujidades dos tetos na estação fria. Observou-se também a alta relação entre a precipitação e alta umidade relativa do ar (fator 4) (Tabela 5).

4. DISCUSSÃO

O baixo escore de limpeza de tetos (ELT) antes da antisepsia (Tabela 2), com média próxima a 2 (tetos ligeiramente sujos), pode estar relacionada à baixa pluviosidade média observada nos dias da coleta e no dia anterior a estas (Figura 6). Esta baixa sujidade nos tetos antes da antisepsia pode ter apresentado um baixo desafio aos protocolos de antisepsia pré-ordenha. Como a profundidade de úbere e o *udder clearance* não diferiu entre os tratamentos, sendo úberes mais rasos do que os encontrado por Parizotto Filho et al. (2017), diminui-se a possibilidade de alterações na sujidade dos tetos por influência de morfologia de úbere. Pelo fato de as vacas possuírem, na média, úberes distantes do chão há a menor chances de sujar os tetos e, assim, corrobora para o baixo ELT antes da antisepsia observado no nosso estudo.

A baixa detecção de bactérias Gram-negativas encontrada nos suabes coletados antes da antisepsia também foi observado por Fitzpatrick et al. (2019). A redução bacteriana dos tetos acima de 2 log UFC/ml observada em ambos os tratamentos para as bactérias Gram-negativas é relevante, pois os coliformes são importantes causadores de mastite ambiental, principalmente quando há acúmulo de esterco nos animais e nas instalações (BARTLETT et al., 1992). Por outro lado, estudos que compararam a eficácia de antissépticos também observaram a efetiva redução de coliformes, até mesmo quando os tetos foram lavados somente com água e secados com papel toalha (BAUMBERGER; GUARÍN; RUEGG, 2016; FITZPATRICK et al., 2019, 2021; GLEESON et al., 2009).

A contagem de *Staphylococcus* spp. antes da antisepsia (CSTA_A) foi superior a contagem de *Streptococcus* spp. (CSTE_A) (Tabela 3), concordando com a maioria dos estudos que avaliaram contagem bacteriana dos tetos (BAUMBERGER; GUARÍN; RUEGG, 2016; FITZPATRICK et al., 2019; GLEESON; FLYNN; O'BRIEN, 2018). No entanto, independentemente do tratamento, a redução de *Streptococcus* spp. (Dif_STE) foi superior à de *Staphylococcus* spp. (Dif_STA) (Tabela 3). Há mais de 100 anos, os *Streptococcus* spp, em especial o *Streptococcus agalactiae*, foram os primeiros microrganismos atrelados à mastite e eliminá-los da superfície dos tetos é essencial para evitar a sua ascensão na glândula mamária (RUEGG, 2017). Desta forma, a antisepsia dos tetos deve ser empregada, porém, a antisepsia dupla não

se faz necessária quando os tetos possuem baixos escores de limpeza de tetos (ELT) antes da antisepsia (tetos poucos sujos).

A maior contagem bacteriana total de antes da antisepsia (CBT_A) se deve, como referido no próprio nome, a contagem total de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que crescem à 37°C em meio de cultura não seletivo (ATLAS; SNYDER, 2014). A redução da CBT (Dif_CBT) numericamente foi maior para a antisepsia dupla (AD), comprovando uma redução biológica, porém sem diferenças estatísticas. A não diferença observada entre os dois tratamentos se deve ao baixo número de observações e a grande variabilidade dos dados. Com novos estudos que comprovem a superioridade da AD em melhor reduzir a CBT dos tetos, possivelmente, esta técnica poderá contribuir na diminuição da Contagem Padrão em Placas (CPP) do leite e auxiliar o produtor a se adequar as normativas brasileiras de qualidade do leite (BRASIL, 2018).

O escore de hiperqueratose de ponta de teto (EH) acima de 3 aumenta o risco de um novo caso de mastite subclínica diagnosticado através contagem de células somáticas (CCS) (CARDOZO et al., 2015). A similaridade do EH observada entre os grupos dos tratamentos era esperada para excluir a influência desta variável sobre a CCS. A similaridade entre a antisepsia dupla e convencional para CCS e a dinâmica de mastites subclínicas (novas infecções, curas e infecções crônicas) (Tabela 4) e clínicas, concorda com a não diferença observada no escore de limpeza de tetos (ELT) e nas contagens bacterianas. Em vacas em sistema de produção baseado em pastagens, Morton et al. (2014) não observaram vantagens no uso da antisepsia dos tetos pré-ordenha em prevenir no mínimo 50% de mastites clínicas do início da lactação e atrelou o resultado a alta quantidade de tetos limpos antes da antisepsia e a baixa precipitação, sendo condições semelhantes ao nosso estudo. Desta forma, recomenda-se nossos novos trabalhos em rebanhos com maior desafio ambiental, onde o ELT médio antes da antisepsia seja entre 3 e 4 (tetos sujos e extremamente sujos). Além disso, sugere-se estudos em rebanhos maiores, com centenas de vacas em lactação, e com novas técnicas de avaliação de mastite, como cultura microbiológica, para avaliação efetiva das infecções intramamária ao empregar a antisepsia dupla e convencional.

A relação positiva entre as contagens de antes da antisepsia para total de Gram-negativos (CGNEG_A), *Staphylococcus* spp. (CSTA_A), *Streptococcus* spp. (CSTE_A) e contagem bacterina total (CBT_A) (fator 2 da análise fatorial; Tabela 5)

indicam que quando um grupo bacteriano está aumentando na superfície dos tetos os outros também estão. Tal fato remete aos diversos ambientes às quais as vacas criadas a pasto estão expostas que contaminam os tetos com uma variedade de gêneros bacterianos. Córdova et al. (2018) observaram que alta CBT da superfície dos tetos está atrelada às condições de ambiência e reforçam os cuidados com a higienização das instalações para evitar tetos com CBT elevada antes da antisepsia.

A relação entre a elevada contagem de todos os grupos bacterianos após a antisepsia (CGNED_D, CSTA_D, CSTE_D e CBT_D) (fator 1 da análise fatorial; Tabela 5) indica que, independentemente do protocolo de antisepsia pré-ordenha utilizado, deve-se atentar para realizá-lo de forma correta e minuciosa para a efetiva redução de todos os grupos bacterianos nos tetos. Molhar os tetos completamente no antisséptico, aguardar o tempo de ação e realizar a secagem corretamente é fundamental em todo o protocolo de antisepsia pré-ordenha (GONÇALVES; TOMAZI; DOS SANTOS, 2017).

A estação fria apresentou uma relação positiva com úberes e tetos mais sujos (fator 3 da análise fatorial; Tabela 5) que pode ser explicada pela maior nebulosidade e menor insolação nesta época do ano que favorece maior umidade do ambiente (MONTEIRO, 2001). Nogara et al. (2022) observaram maior Contagem Padrão em Placa (CPP) no leite de vacas criadas em pastejo durante o inverno no sul do Brasil e atrelaram o resultado à maior sujidade dos tetos decorrente da alta umidade durante esta estação. A relação entre a maior sujidade dos tetos antes e depois da antisepsia na estação fria demonstra que, independentemente dos tratamentos, a antisepsia dos tetos pré-ordenha é menos eficiente. Desta forma, manter os tetos limpos durante o inverno é um desafio para vacas criadas em sistema de pastejo na região sul do Brasil.

5. CONCLUSÃO

Em vacas mantidas em sistema baseado em pastagem, com escore de limpeza de tetos (ELT) médio próximo a 2 (tetos ligeiramente sujos), a antisepsia dupla dos tetos na pré-ordenha não melhora a limpeza e contaminação bacteriana dos tetos, não reduzindo as taxas de mastite clínica e subclínica, em relação à antisepsia convencional. Desta forma, em nosso estudo observamos que a antisepsia dupla não

trás benefícios em condições ambientais que favoreçam a presença de tetos poucos sujos antes da ordenha.

6. REFERÊNCIAS

- ATLAS, R. M.; SNYDER, J. W. **Handbook of media for clinical and public health microbiology**. Nova York: CRC Press. 2014. Disponível em: <<https://www.routledgehandbooks.com/doi/10.1201/b16753>>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- BARTLETT, P. C.; MILLER, G. Y.; LANCE, S. E.; HEIDER, L. E. Managerial Determinants of Intramammary Coliform and Environmental Streptococci Infections in Ohio Dairy Herds. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 5, p. 1241–1252, 1992.
- BAUMBERGER, C.; GUARÍN, J. F.; RUEGG, P. L. Effect of 2 different premilking teat sanitation routines on reduction of bacterial counts on teat skin of cows on commercial dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2915–2929, 2016.
- BRASIL. **Instrução Normativa Nº 76, de 26 de novembro de 2018**. Aprova os Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Brasília, DF: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2018. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2021/07/IN-76_18_atualizada.pdf>. Acesso em: 8 jan. 2023.
- CARDOZO, L. L.; THALER NETO, A.; SOUZA, G. N.; PICININ, L. C. A.; FELIPUS, N. C.; RECHE, N. L. M.; SCHMIDT, F. A.; WERNCKE, D.; SIMON, E. E. Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 11, p. 7675–7685, 2015.
- COOK, N. B.; REINEMANN, D. A Tool Box for Assessing Cow, Udder and Teat Hygiene. **NCM Annual Meeting Paper**, v. 46, p. 1-6, 2007.
- CÓRDOVA, H. A.; CARDOZO, L. L.; ALESSIO, D. R. M.; THALER NETO, A. Influência da profundidade do úbere na limpeza dos tetos e na saúde da glândula mamária em ordenha robótica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1443–1452, 2018.
- DURST, P. **Double-dipping teats?** 2012. Disponível em: <https://www.canr.msu.edu/news/double-dipping_teats>. Acesso em: 05 mar. 2023.
- FITZPATRICK, S. R.; GARVEY, M.; FLYNN, J.; JORDAN, K.; GLEESON, D. L. Are some teat disinfectant formulations more effective against specific bacteria isolated on teat skin than others? **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 61, n. 1, p. 1–5, 2019.

FITZPATRICK, S. R.; GARVEY, M.; FLYNN, J.; O'BRIEN, B.; GLEESON, D. The effect of disinfectant ingredients on teat skin bacteria associated with mastitis in Irish dairy herds. **Irish Veterinary Journal**, v. 74, n. 1, p. 1–12, 2021.

GLEESON, D.; O'BRIEN, B.; FLYNN, J.; O'CALLAGHAN, E.; GALLI, F. Effect of pre-milking teat preparation procedures on the microbial count on teats prior to clusters application. **Irish Veterinary Journal**, v. 62, n. 7, p. 461–467, 2009.

GLEESON, D.; FLYNN, J.; O'BRIEN, B. O. Effect of pre-milking teat disinfection on new mastitis infection rates of dairy cows. **Irish Veterinary Journal**, v. 71, n. 1, p. 1–8, 2018.

GONÇALVES, J. L.; TOMAZI, T.; DOS SANTOS, M. V. Rotina de ordenha eficiente para produção de leite de alta qualidade. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 15, n. 2, p. 9–14, 2017.

HEINS, B. J.; HANSEN, L. B.; SEYKORA, A. J.; JOHNSON, D. G.; LINN, J. G.; ROMANO, J. E.; HAZEL, A. R. Crossbreds of Jersey × Holstein compared with pure holsteins for production, fertility, and body and udder measurements during first lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, p. 1270–1278, 2008.

HOVINEN, M. **Udder health of dairy cows in automatic milking**. 2009. Dissertation (Master in Veterinary Medicine) – University of Helsinki, Helsinki, 2009. Disponível em: <<https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/19051/udderhea.pdf?sequence=2>>. Acesso em: 10 fev. 2023.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928.

KNOB, D. A.; SCHOLZ, A. M.; ALESSIO, D. R. M.; MENDES, B. B. P.; PERAZZOLI, L.; KAPPES, R.; THALER NETO, A. Reproductive and productive performance, udder health, and conformation traits of purebred Holstein, F1, and R1 crossbred Holstein × Simmental cows. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, p. 1639–1647, 2020.

MAGNUSSON, M.; CHRISTIANSSON, A.; SVENSSON, B.; KOLSTRUP, C. Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 10, p. 3866–3875, 2006.

MEIN, G. A.; NEIJENHUIS, F.; MORGAN, W. F.; REINEMANN, D. J.; HILLERTON, J. E.; BAINES, J. R.; OHNSTAD, I.; RASMUSSEN, M. D.; TIMMS, L.; BRITT, J. S.; FARNSWORTH, R.; COOK, N.; HEMLING, T. Evaluation of Bovine Teat Condition in Commercial Dairy Herds: 1. Non-Infectious Factors. In: AABP-NMC International Symposium on Mastitis and Milk Quality, Vancouver, BC, Canada. **National Mastitis Council**. Madison: 2001, p. 347-351.

MONTEIRO, M. A. Caracterização climática do estado de Santa Catarina: uma abordagem dos principais sistemas atmosféricos que atuam durante o ano. **Geosul**, v. 16, n. 31, p. 69–78, 2001.

MORTON, J. M.; PENRY, J. F.; MALMO, J.; MEIN, G. A. Premilking teat disinfection: Is it worthwhile in pasture-grazed dairy herds? **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 12, p. 7525–7537, 2014.

NOGARA, K. F.; KAELLE, G. C. B.; TAVARES, Q. G.; MARCON, T. R.; GOPINGER, E.; ZOPOLLATTO, M.; DEBORTOLI, E. C. Influência das estações do ano sobre a qualidade microbiológica do leite de fazendas leiteiras da região norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, 2022.

OLIVEIRA, V. M.; MENDONÇA, L. C.; MIRANDA, J. E. C.; DINIZ, F. H.; REIS, É. S.; GUIMARÃES, A. S.; MAGALHÃES, V. M. A. **Como identificar a vaca com mastite em sua propriedade**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2015.

PANKEY, J. W. Premilking Udder Hygiene. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 5, p. 1308-1312, 1989.

PARIZOTTO FILHO, R.; THALER NETO, A.; FRANÇA, M.; CAMERA, M. Características de tipo e condição corporal em vacas holandês e mestiças holandês x Jersey. **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n. 2, p. 55–65, 2017.

PANTOJA, J. C. F.; CORREIA, L. B. N.; ROSSI, R. S.; LATOSINSKI, G. S. Association between teat-end hyperkeratosis and mastitis in dairy cows: A systematic review. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 2, p. 1843–1854, 2020.

RUEGG, P. L. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10381–10397, 2017.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Controle da Mastite e Qualidade do Leite: Desafios e Soluções**. 1. ed. Pirassununga: Edição dos Autores, 2019.

SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v. 34, n. 4, p. 579–596, 2003.

SILVA, J. L. V. **Contribuição para um manual de boas práticas de manejo da ordenha para a produção de leite de elevada qualidade nos Açores - Estudo de Alguns Pontos Críticos de Controlo**. 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar), Universidade dos Açores, Andra do Heroísmo, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.uac.pt/bitstream/10400.3/1360/1/DissertMaestradoJoseLuisValenteSilva2012.pdf>>. Acesso em: 15 jan 2023.

TOLEDO, I. Milking Management Program: Proper Milking Procedures to Optimize Milking Efficiency and Milk Quality. **EDIS UF IFAS Extension**, v. 2021, n. 5, p. 1-5, 2021.

CAPÍTULO III

**EFFECT OF TWO DIFFERENT DOUBLE PREMILKING TEAT DISINFECTION
PROTOCOLS ON BACTERIAL COUNT ON TEAT SKIN OF COWS AND
MILKERS' GLOVES IN A FREE-STALL-HOUSED DAIRY HERD***

*Capítulo redigido nas normas da revista Preventive Veterinary Medicine.

EFFECT OF TWO DIFFERENT DOUBLE PREMILKING TEAT DISINFECTION PROTOCOLS ON BACTERIAL COUNT ON TEAT SKIN OF COWS AND MILKERS' GLOVES IN A FREE-STALL-HOUSED DAIRY HERD

ABSTRACT

We aimed to evaluate the effect of double premilking teat disinfection (DD) using one or two different disinfectants on the cleanliness and bacterial counts of cow teats and milker gloves. The design was a 3×3 Latin square (three groups and three treatments) with conventional teat disinfection (CONV, disinfectant application based on lactic acid after forestripping), double teat disinfection using the same disinfectant (DD1D, disinfectant application based on lactic acid before and after forestripping), and double teat disinfection using two different disinfectants (DD2D, disinfectant application based on lactic acid before and chlorine-based disinfectant after forestripping). Each group was randomly assigned to one of the treatments for all milking for six days. Subsequently, the treatments were rotated between the groups. All groups were assigned to all treatments for 18 days. The samples were collected on the last day. We evaluated the udder cleanliness score (UCS) and teat cleanliness score (TCS) before and after the treatment. We evaluated the counts of Gram-negative bacteria (coliforms and noncoliforms), *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., and total bacterial count (TBC) in the teats of cows and TBC in the milker gloves before and after treatment. Teats prepared using DD tended to be cleaner than those prepared using CONV. The reduction in *Staphylococcus* spp. was greater in the DD treatment and tended to be higher in the DD2D treatment. The TBC reduction was greater in the DD treatments. The TBC on the milker gloves was lower before and after DD treatment. DD can be an alternative for reducing some bacterial populations in cow teats and preventing the transmission of microorganisms between cows by the hands of milkers.

Keywords: Gram-negative bacteria; *Staphylococcus* spp.; *Streptococcus* spp.; Teat hygiene; Total bacterial count; Udder cleanliness score.

1. INTRODUCTION

Premilking teat soiling can be a challenge for some farms, especially for those with poor environmental conditions. In confinement systems, the soiling of udders and teats is related to the facilities' hygiene, humidity, temperature of the bed (Eckelkamp et al., 2016, Kappes et al., 2020), and alley floor dirtiness (Magnusson et al., 2008). Greater soiling of teats is related to a higher somatic cell count (SCC) in milk (Kappes et al., 2020). Schreiner and Ruegg (2003) reported an association between udder hygiene and subclinical mastitis rate. Cows with a dirty udder had a higher risk of intramammary infection than those with a clean udder. Cross-transmission of microorganisms among cows by milker hands during premilking management is also a challenge in increasing milk SCC. However, wearing gloves during milking is recommended to reduce milk SCC (Bach et al., 2008; Dufour et al. 2011). Disinfection of milker gloves during the premilking routine, along with disinfection of the teats, can also contribute to reducing the bacterial load in milk (Islam et al., 2009).

Premilking teat disinfection aims to remove dirtiness and reduce the load of bacteria on the teat skin before milking, ensure high-quality milk, and prevent intramammary infections caused mainly by environmental agents (Pankey, 1989; Yanuartono et al., 2020). This management has been performed since the late 1980 (Pankey and Drechsler, 1993), and has been recommended as an effective method to reduce teat bacterial contamination.

Different methods and products of premilking teat disinfection have been studied. Fitzpatrick et al. (2019, 2021) evaluated the effectiveness of several premilking teat disinfectants. All products proved to be effective in reducing bacterial loads on teat skin. Magnusson et al. (2006) claim that the use of a moist washable towel followed by drying with a paper towel reduces the presence of anaerobic bacterial spores on the milk. The reduction could be due to greater friction in the teat during cleaning, physically removing the bacteria and spores.

Double premilking disinfection is used on some farms and is recommended by technicians. The premilking disinfectant was applied twice, once before and once after forestripping. The first is used to moisten the teat so that with the removal of a few strips of milk, the dirt is released. The second is used to properly disinfect the teat before drying with a paper towel. However, no studies have evaluated the efficacy of double premilking disinfection compared to conventional disinfection (once). We

hypothesize that double premilking teat disinfection is more effective in reducing the soiling and bacterial count on the teat skin of cows and milker gloves than conventional disinfection. In addition, double premilking teat disinfection with two different disinfectants can be more effective in reducing the bacterial count on the teats. We aimed to evaluate the effect of double premilking teat disinfection on the cleanliness and bacterial count on the cows' teat and milker gloves compared to the conventional method (once). We also compared two different double-premilking teat disinfection protocols, one using the same disinfectant in both applications and the other with two different disinfectants.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Experiment design

All animal procedures in this study were approved by the Ethics Committee of the Universidade do Estado de Santa Catarina (protocol n. 398240423). The experiment was conducted in October 2022 in a commercial dairy farm in Treze Tílias, Santa Catarina State, Brazil (latitude 27°00'43.9" ", longitude 51°23'18.4" ", and altitude 796 m above sea level). The herd consisted of 115 Holstein cows housed in free-stalls with tunnel ventilation. The bed was a mattress associated with sawdust treated with 6–8% quicklime. The cows were milked three times a day in a 2x6 parallel milking parlors. Three groups of cows were formed based on milk yield and parity: group 1 - high-yielding multiparous (mean of 43.7 kg milk/cow/day), group 2 - low-yielding multiparous (mean of 30 .5 kg milk/cow/day) and group 3 - primiparous (mean of 38.7 kg milk/cow/day).

We used a 3×3 Latin square design (three groups and three treatments). The groups were the same as those previously established on the farm, with groups 1, 2, and 3 containing 49, 34, and 32 cows, respectively. The treatments were conventional disinfection (CONV) as a control, double-teat disinfection using the same disinfectant (DD1D), and double-teat disinfection using two disinfectants (DD2D). In CONV, after forestripping, we applied the disinfectant based on lactic acid and dried for 30s with a paper towel. For DD1D, we used a lactic acid base disinfectant, followed by forestripping, and the same disinfectant. After 30s the teats were dried using a paper

towel. DD2D was similar to DD1D, differing only in the type of the second disinfectant (chlorine-based). Initially, each group was randomly assigned to one treatment. All cows in the group received the same treatment before every milking for 6 days. On the seventh day, the group was assigned to another treatment for six days. This rotation was carried out once more for an equal period, with the three groups receiving the three treatments for 18 days (three periods of six days).

The commercial lactic acid disinfectant (Keno Pure, Cid Lines) was diluted to 40% and applied by immersion as a foam. A chlorine-based disinfectant (Effervescent Plus Chlorine Tablets, Weizur) was applied by immersion in a liquid solution at a concentration of 1500 ppm. A new solution was prepared before milking. Postmilking disinfection was the same for all treatments and the teats were immersed in an iodine-based disinfectant (Blocking™, Weizur).

On the last day of each repetition (sixth, twelfth, and eighteenth day of the experiment), we collected samples during the second milking of the collection day (00:30 pm). Udder cleanliness score (UCS) and teat cleanliness score (TCS) were evaluated before (PRE) and after (POST) treatment. We collected samples from the teats of cows and milker gloves using sterile swabs, PRE, and POST for microbiological counts.

2.2 Udder and teat cleanliness score

UCS was performed using a scale from 1 (clean) to 4 (very dirty), according to Cook and Reinemann (2007). The TCS was evaluated using a moist towel identified by the number of cows, as proposed by Hovinen (2009). Before treatment, a moist towel was scrubbed thrice from the base to the apex of the left front teat. After the treatment, the same procedure was performed on the right rear teat (Córdova et al., 2018). The towels were dried at room temperature and classified into five scores, ranging from 0 (clean teats) to 4 (extremely dirty) (Hovinen, 2009). The towel evaluation was performed by the same trained person, disregarding the treatment applied in each group during the evaluation.

2.3 Teat bacterial count

Microbiological samples were collected from the right front and left rear teats randomly from the last cow on each side of the milking parlor. Before treatment, we scrubbed a moistened swab with buffered peptone water (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) on the cranial surfaces of both teats. After treatment, the same procedure was repeated on the external side of the same teats, as described by Córdova et al. (2018). After sample collection, we conditioned the swabs in 4 ml tubes with buffered peptone water (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) (Baumberger et al., 2016). The samples were refrigerated and sent to the “Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal” (CEDIMA) of the “Universidade do Estado de Santa Catarina” (UDESC), Lages, Santa Catarina, Brazil.

In the laboratory, the samples were vigorously vortexed. Serial dilutions were performed to identify and enumerate the colonies. We transferred 1 ml of the tube with the swab to another tube with 9 ml of sterile saline solution (final dilution 1:10), then pipetted 1 ml of the 1:10 dilution into another tube (final dilution 1:100), similar to the 1:1000 dilution. Usually, PRE samples needed higher dilutions (1:100 and 1:1000), while POST samples needed lower dilutions (1:10) or were undiluted.

Baird Parker agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) enriched with Tellurite Egg Yolk (Newprov, Pinhais, Brazil) and modified Edwards agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) with 5% sterile bovine blood were used to enumerate *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp., respectively (Gleeson et al. 2009; Fitzpatrick et al. 2019, 2021). MacConkey agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) was used to enumerate coliform (lactose-fermenting in red or pink color) and Gram-negative noncoliform bacteria (colorless colonies) as described by Baumberger et al. (2016). Plate Count Agar (Kasvi, São José dos Pinhais, Brazil) was used to determine the total bacterial count (TBC).

We used 1:100 and 1:10 dilutions for PRE and POST samples, respectively (previously tested in a pilot study). We plated two inoculums of 100 µL onto the Baird Parker and modified Edwards plates, one inoculum of 50 µL, and one inoculum of 10 µL onto MacConkey and PCA plates. The plates were incubated at 37 ± 1°C for 24 h, as recommended by Fitzpatrick et al. (2021), after which the colonies were counted. For all bacterial counts, when colonies in an inoculum could not be individualized or did not grow, a new incubation was carried out using lower or higher dilutions. After

incubation, the final colony count was obtained. Colony-forming units (CFU) per ml were calculated by multiplying the number of colonies, the dilution factor, and the correction factor by ml (Baumberger et al., 2016). The correction factors for the Baird Parker, modified Edwards, MacConkey, and PCA were 10, 10, 20, and 100, respectively.

2.4 Gloves bacterial count

We collected swabs from the PRE and POST milker gloves of the last cow on each side of the milking parlor. A moist swab with buffered peptone water was rubbed onto the gloves of the milkers (palm and fingers). Swabs were conditioned in 4 ml tubes with buffered peptone water and sent under refrigeration to the laboratory. The samples were vigorously shaken and serially diluted to 1:1000. One inoculum (10 µL) was plated on a PCA plate and incubated. We used dilutions of 1:100 for both the PRE and POST samples. We performed the same procedure as that described for the teat swabs.

2.5 Statistical Analysis

Analysis of variance was performed using the GLM procedure of the SAS® statistical package after testing the data for normality of residuals with the UNIVARIATE procedure, with a significance level of $P < 0.05$, using the Shapiro-Wilk test. The effects of the treatments were tested using orthogonal contrasts. We compared CONV vs. double disinfection (DD) and DD1D vs. DD2D.

To obtain the normality of the residues, the bacterial count was transformed into a logarithm of base 10. The variables of teat bacterial count and TCS were analyzed for PRE and POST treatment, as well as the reduction of these values in the logarithm of base 10. The variable milker glove bacterial count was evaluated using PRE and POST. Negative values indicated a reduction in the contamination of teats and TCS. Statistical differences were defined at the 5% level, and a tendency was determined at the 10% level.

To evaluate the relationship between bacterial counts, we performed a factor analysis using PROC FACTOR with Promax rotation of the SAS® statistical package. The data were previously standardized using PROC STANDARD. Factor loads ≥ 0.40 were considered significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

A total of 340 evaluations of UCS and TCS were performed, with 108 for CONV, 102 for DD1D, and 130 for DD2D. The UCS values for CONV, DD1D, and DD2D were 1.67, 1.54, and 1.0, respectively, with no significant difference between CONV and DD ($P = 0.28$). The mean TCS PRE was higher than three for all treatments (Table 1), indicating that the teats were dirty. Córdova et al. (2018) evaluating TCS in cows housed in a free stall, observed teats slightly dirty (TCS = 2.48) before the premilking routine. Schreiner and Ruegg (2003) observed that only 22% of cows were classified as having a dirty udder (scores 3 and 4). Sawdust on the surface of the free-stall bed is likely to have a large influence on the TCS (Schreiner and Ruegg, 2003). The high TCS in our study was important for challenging the treatments used.

Cows from DD had cleaner POST teats compared to those from CONV ($P = 0.04$) (Table 1). The reduction in TCS tended to be higher for DD than for CONV ($P = 0.09$), with no difference between DD1D and DD2D. This confirms our hypothesis that with the removal of the first stirps of milk with moist teats, dirt is released more easily, allowing the teats to clean.

We evaluated a total of 60 samples, 20 for each treatment for *Streptococcus* spp. and TBC from the teats and milker gloves. For *Staphylococcus* spp., coliforms, and Gram-negative noncoliform bacteria, we evaluated 59, 49, and 52 samples, respectively, as we did not consider samples from cows with no counts before treatment. Null counts of coliforms and Gram-negatives noncoliform were also observed by Fitzpatrick et al. (2021). Lower Gram-negative bacterial counts before disinfection have been reported in other studies and are linked to low bed contamination by these microorganisms (Gleeson et al. 2009; Baumberger et al., 2016).

Table 1 - Mean values and residual standard deviations (RSD) of teat cleanliness score (TCS) and P values for the contrasts between double disinfection (DD) and conventional (CONV) and between double disinfection with 1 disinfectant (DD1D) and with two disinfectants (DD2D) (n = 340).

Variable	Treatment			RSD	Contrasts (P value)	
	CONV	DD1D	DD2D		DD x CONV	DD1D x DD2D
TCS_PRE ¹	3.35	3.28	3.42	0.64	0.99	0.14
TCS_POST ²	1.13	0.98	0.96	0.66	0.04	0.92
Dif_TCS ³	-2.22	-2.32	-2.44	0.80	0.09	0.27

¹Teat cleanliness score before treatment; ²Teat cleanliness score after treatment; ³Difference between teat cleanliness scores after and before treatment.

Coliform and Gram-negative noncoliform counts PRE did not differ between treatments (Table 2). Coliform count POST tended to be lower for CONV than for DD (P = 0.07). However, the reduction in coliforms and Gram-negative noncoliform did not differ between the treatments. The greater Coliforms and Gram-negative noncoliform counts reduction (more than 2.00 log₁₀ CFU/ml) compared with other bacterial groups indicate good premilking disinfection efficacy in reducing these groups of microorganisms in both CONV and DD treatment. Baumberger et al. (2016) also observed a greater reduction in POST treatment for Gram-negative bacteria than in the number of *Streptococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. (P < 0.01).

We did not observe differences between treatments in the *Streptococcus* spp. count PRE and POST, but the mean values for all treatments were high. High counts of *Streptococcus* spp. before premilking procedures have also been observed in other farms (Baumberger et al., 2016). This could be related to the high *Streptococcus* spp. count on sand, sawdust, and organic non-manure bedding, which continually increases teat contamination (Rowe et al., 2019; Zdanowicz et al., 2004). The reduction of *Streptococcus* spp. on the teats was similar between CONV and DD (P = 0.31), being higher than -1.6 log₁₀ CFU/ml (Table 2). However, the reduction was only 36%, which is lower than the 55% reported by Baumberger et al. (2016). The authors claimed that the reduction may vary depending on farm conditions, additional management practices, and initial teat contamination.

Table 2 - Mean values and residual standard deviations (RSD) of bacterial count on the teats and P values for the contrasts between double disinfection (DD) and conventional disinfection (CONV) and between double disinfection with one disinfectant (DD1D) and with two disinfectants (DD2D).

Variable*	n	Treatment			RSD	Contrasts (P value)	
		CONV	DD1D	DD2D		DD x CONV	DD1D x DD2D
COLC_PRE ¹	49	2.66	2.93	3.07	0.87	0.12	0.62
COLC_POST ²	49	0.25	0.79	0.63	0.99	0.07	0.54
Dif_COLC ³	49	-2.42	-2.14	-2.45	1.25	0.73	0.41
GNNCOLC_PRE ⁴	52	2.68	3.11	2.98	0.89	0.27	0.91
GNNCOLC_POST ⁵	52	0.41	0.50	0.63	1.16	0.78	0.98
Dif_GNNCOLC ⁶	52	-2.27	-2.61	-2.35	1.23	0.59	0.92
STEC_PRE ⁷	60	5.14	5.06	4.91	0.75	0.75	0.44
STEC_POST ⁸	60	3.46	2.98	3.21	0.78	0.16	0.49
Dif_STEC ⁹	60	-1.68	-2.08	-1.70	0.86	0.31	0.19
STAC_PRE ¹⁰	59	4.48	4.50	4.83	0.63	0.19	0.21
STAC_POST ¹¹	59	3.48	3.39	3.30	0.47	0.28	0.43
Dif_STAC ¹²	59	-0.99	-1.12	-1.53	0.63	0.04	0.07
TBC_PRE ¹³	60	4.72	5.13	5.10	0.53	0.01	0.74
TBC_POST ¹⁴	60	3.87	3.69	3.77	0.56	0.29	0.77
Dif_TBC ¹⁵	60	-0.85	-1.43	-1.33	0.68	0.01	0.65

*All values are expressed as colony-forming units (CFU) per ml in logarithm base 10. ¹Coliforms count before treatment; ²Coliforms count after treatment; ³Difference between coliforms count before and after treatment; ⁴Gram-negative noncoliform count before treatment; ⁵Gram-negative noncoliform count after treatment; ⁶Difference between Gram-negative noncoliform before and after treatment; ⁷*Streptococcus* spp. count before treatment; ⁸*Streptococcus* spp. count after treatment; ⁹Difference between *Streptococcus* spp. count before and after treatment; ¹⁰*Staphylococcus* spp. count before treatment; ¹¹*Staphylococcus* spp. count after treatment; ¹²Difference between *Staphylococcus* spp. before and after treatment; ¹³Total bacterial count before treatment; ¹⁴Total bacterial count after treatment; ¹⁵Difference between total bacterial count before and after treatment.

DD treatment reduced the number of *Staphylococcus* spp. on the teats more effectively than CONV treatment ($P = 0.04$) (Table 2). With DD, the teats were exposed for longer to the disinfectant, reducing these microorganisms more effectively. Therefore, it is expected that a reduction in the number of intramammary infections, mainly by coagulase-negative staphylococci, is commonly linked to mastitis cases (Pyorala and Taponen, 2009; El-Jakke et al., 2013; Acosta et al., 2016). Further researches are necessary to evaluate the effect of each treatment on new intramammary infections and SCC over longer periods.

The reduction in *Staphylococcus* spp. tended to be greater in teats prepared using DD2D than in those prepared using DD1D ($P = 0.07$; 31% vs. 24% reduction, respectively) (Table 2). The combination of two different disinfectants (lactic acid and

chlorine-based disinfectants) has a broad spectrum of action against a higher number of microorganisms. Fitzpatrick et al. (2021) found that iodine associated with lactic acid in single disinfection was the most effective in reducing *Staphylococcus* spp. on the teats when compared to 8 other active principles. Fitzpatrick et al. (2019) found similar reductions comparing the same disinfectant, however, reductions greater than 70%.

TBC PRE was lower ($P = 0.01$) in the cows submitted to the CONV treatment compared to DD, 4.72 and 5.00 \log_{10} CFU/ml, respectively (Table 2). However, TBC reduction was higher in the DD treatments ($P = 0.01$), with no difference between DD1D and DD2D ($P = 0.65$). The greater reduction in TBC in the DD treatment was associated with a reduction in all other groups of bacteria. This practice can ensure a higher microbiological quality of milk.

The TBC on the milker gloves was lower in the DD treatment for both PRE and POST ($P < 0.05$) than in CONV (Table 3). There was no difference in TBC on the milker gloves between DD1D and DD2D ($P = 0.29$ PRE and $P = 0.24$ POST). The lower TBC on the milker gloves in the DD treatments was due to continuous contact with the disinfectant, while the first stirps of milk were removed. In CONV, the disinfectant was applied after forestripping. Bach et al. (2008) and Dufour et al. (2011) showed an association between wearing gloves and lower SCC on the bulk tank milk. With the lower adherence of contagious bacteria to gloves, the transmission of these microorganisms decreases among the cows by the milkers' hands, reducing intramammary infections (Plozza et al., 2011). The combination of wearing gloves and DD can be an alternative to reduce the transmission of contagious microorganisms such as *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*.

Table 3 - Mean values and residual standard deviations (RSD) of the total bacterial count (TBC) on the milker gloves and P values for the contrasts between double disinfection (DD) and conventional disinfection (CONV) and between double disinfection with one disinfectant (DD1D) and with two disinfectants (DD2D) ($n = 60$).

Variable*	Treatment			RSD	Contrasts (P value)	
	CONV	DD1D	DD2D		DD x CONV	DD1D x DD2D
TBCGloves_PRE ¹	4.69	4.21	4.09	0.51	<0.01	0.29
TBCGloves_POST ²	4.40	4.09	3.90	0.57	0.01	0.24

*All values are in colony-forming units (CFU) per ml in logarithm base 10. ¹Total bacterial count of gloves before disinfection; ²Total bacterial count of gloves after disinfection.

Factor analysis regarding the variables from bacteria counts in the PRE and POST treatments expressed 62.40% of the total variance in the first three factors (Table 4). Higher communalities indicated the importance of the variables in this study. The first factor shows that cows with higher coliform and Gram-negative noncoliform counts in POST also had higher *Streptococcus* spp. counts in PRE and POST. This means that premilking disinfection was not effective in reducing the *Streptococcus* spp. count. In factor 2, there was a positive relationship between TBC, Coliforms, Gram-negative noncoliforms, and *Staphylococcus* spp. count PRE. Factor 3 showed a positive relationship between TBC and *Staphylococcus* spp. count in POST. These results corroborate the effect of treatment in the univariate analysis (Table 2). As *Staphylococcus* spp. was the bacterial group that reduced the least on the teats POST (ranging from -0.99 to -1.53 log₁₀ CFU/ml; Table 2) and they are accounted in the TBC, the positive relationship between *Staphylococcus* spp. and TBC POST is easily understood.

Table 4 – Factor loads, communalities, and variance percentage of each variable regarding the evaluation of the inter-relation of the bacterial count before and after treatment.

Variables	Factors			Communality
	Factor 1	Factor 2	Factor 3	
COLC_PRE ¹	0.02787	0.41395	0.28437	0,31
COLC_POST ²	0.87939	-0.00854	-0.02562	0,76
GNNCOLC_PRE ³	0.01993	0.54658	0.15311	0,36
GNNCOLC_POST ⁴	0.80800	0.04625	-0.04868	0,66
STEC_PRE ⁵	0.54551	0.33520	-0.18404	0,49
STEC_POST ⁶	0.69682	-0.14521	0.37115	0,70
STAC_PRE ⁷	0.16730	0.70105	0.09423	0,65
STAC_POST ⁸	0.11054	0.13242	0.74519	0,68
TBC_PRE ⁹	-0.09452	0.92172	-0.06236	0,78
TBC_POST ¹⁰	-0.13937	0.03941	0.94490	0,85

¹Coliforms count before treatment; ²Coliforms count after treatment; ³Gram-negative noncoliform count before treatment; ⁴Gram-negative noncoliform count after treatment; ⁵*Streptococcus* spp. count before treatment; ⁶*Streptococcus* spp. count after treatment; ⁷*Staphylococcus* spp. count before treatment; ⁸*Staphylococcus* spp. count after treatment; ⁹Total bacterial count before treatment; ¹⁰Total bacterial count after treatment.

4. CONCLUSION

Double teat disinfection (DD) was more effective in cleaning the teat skin of cows and milker gloves than CONV. DD showed a greater reduction in the *Staphylococcus* spp. count and total bacterial count on the teat skin of cows. DD can be an alternative to reduce some bacterial populations on the cows' teats and prevent the transmission of microorganisms between cows by the hands of milkers. This was the first study to evaluate the efficacy of double-teat disinfection in the reduction of teat bacterial counts. More studies are needed to evaluate different active principle associations and assess the relationship between double disinfection protocols and the occurrence of clinical and subclinical mastitis caused by environmental and contagious microorganisms.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the farmer Arno Thaler (Leitaria Tirolesa – Treze Tílias, SC, Brazil) for cooperating with this study. This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES), Finance Code 001, and Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC/2021TR813).

6. DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

7. REFERENCES

- Acosta, A.C., Silva, L.B.G., Medeiros, E.S., Pinheiro-Junior, J.W., Mota, R.A., 2016. Mastite em ruminantes no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 36 (7), 565–573. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700001>.

Bach, A., Valls, N., Solans, A., Torrent, T., 2008. Associations between nondietary factors and dairy herd performance. *J. Dairy Sci.* 91 (8), 3259–3267. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1030>.

Baumberger, C., Guarín, J. F., Ruegg, P. L., 2016. Effect of 2 different premilking teat sanitation routines on reduction of bacterial counts on teat skin of cows on commercial dairy farms. *J. Dairy Sci.* 99 (4), 2915–2929. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10003>.

Cook, N. B., Reinemann, D., 2007. A tool box for assessing cow, udder and teat hygiene. https://www.researchgate.net/publication/237580204_A_Tool_Box_for_Assessing_Cow_Udder_and_Teat_Hygiene (accessed 22 June 2023).

Córdova, H., Cardozo, L.L., Alessio, D.R.M., Thaler Neto, A., 2018. Influência da profundidade do úbere na limpeza dos tetos e na saúde da glândula mamária em ordenha robótica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70 (5), 1443–1452. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9427>

Dufour, S., Fréchette, A., Barkema, H.W., Mussell, A., Scholl, D.T., 2011. Invited review: Effect of udder health management practices on herd somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 94 (2), 553–579. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3715>.

Eckelkamp, E.A., Taraba, J.L., Akers, K.A., Harmon, R.J., Bewley, J.M., 2016. Understanding compost bedded pack barns: Interactions among environmental factors, bedding characteristics, and udder health. *Livest. Sci.* 190 (8), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.05.017>.

El-Jakee, J. K., Aref, N.E., Gomaa, A., El-Hariri, M.D., Galal, H.M., Omar, S.A., Samir, A., 2013. Emerging of coagulase negative staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 1 (2), 74–78. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.05.006>.

Fitzpatrick, S.R, Garvey, M., Flynn, J., Jordan, K., Gleeson, D., 2019. Are some teat disinfectant formulations more effective against specific bacteria isolated on teat skin

than others? *Acta. Vet. Scand.* 61 (1), 1-5. <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0455-3>.

Fitzpatrick, S.R., Garvey, M., Flynn, J., O'Brien, B., Gleeson, D., 2021. The effect of disinfectant ingredients on teat skin bacteria associated with mastitis in Irish dairy herds. *Ir. Vet. J.* 74 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13620-020-00179-7>.

Gleeson, D., O'Brien, B., Flynn, J., O'Callaghan, E., Galli, F., 2009. Effect of pre-milking teat preparation procedures on the microbial count on teats prior to clusters application. *Ir. Vet. J.* 62 (7), 461–467. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-62-7-461>.

Hovinen, M., 2009. Udder health of dairy cows in automatic milking. <https://helda.helsinki.fi/handle/10138/19051> (accessed 10 February 2023).

Islam, M.A., Islam, M.N., Khan, M.A.S., Rashid, M.H., Obaidullah, S.M., 2009. Effect of different hygienic condition during milking on bacterial count of cows' milk. *Bang. J. Anim. Sci.* 38 (1&2), 108-114.

Kappes, R., Knob, D.A., Thaler Neto, A., Alessio, D.R.M., Rodrigues, W.B., Scholz, A.M., Bonotto, R., 2020. Cow's functional traits and physiological status and their relation with milk yield and milk quality in a compost bedded pack barn system. *R. Bras. Zootec.* 49 (1), 1-13. <https://doi.org/10.37496/rbz4920190213>.

Magnusson, M., Christiansson, A., Svensson, B., Kolstrup, C., 2006. Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk. *J. Dairy Sci.* 89 (10), 3866–3875. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72429-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72429-8).

Magnusson, M., Herlin, A.H., Ventorp, M., 2008. Short Communication: effect of alley floor cleanliness on free-stall and udder hygiene. *J. Dairy Sci.* 91 (10), 3927-3930. <http://doi.org/10.3168/jds.2007-0652>.

Pankey, J. W., 1989. Premilking Udder Hygiene. *J. Dairy Sci.* 72 (5), 1308-1312, 1989. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79238-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79238-9).

Pankey, J. W., Drechsler, P. A., 1993. Evolution of udder hygiene: premilking teat sanitation. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 9 (3), 519–530. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30618-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30618-6).

Pyorala, S., Taponen, S., 2019. Coagulase-negative staphylococci: emerging mastitis pathogens, *Vet. Microbiol.* 134 (1-2), 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.015>.

Plozza, K, Lievaart, J.J., Potts, G, Barkema, H.W., 2011. Subclinical mastitis and associated risk factors on dairy farms in New South Wales. *Aust. Vet. J.* 89 (1-2), 41-46. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2010.00649.x>.

Rowe, S.M., Godden, S.M., Royster, E., Timmerman, J., Crooker, B.A., Boyle, M., 2019. Cross-sectional study of the relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, and intramammary infection in late-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102 (12), 11384-11400. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17074>.

Schreiner, D.A., Ruegg, P.L., 2003. Relationship Between Udder and Leg Hygiene Scores and Subclinical Mastitis. *J. Dairy Sci.* 86 (11), 3460-3465. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73950-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73950-2).

Yanuartono, Y., Nururrozi, A., Indarjulianto, S., Purnamaningsih, H., Ramandani, D., 2020. The Benefits of Teat Dipping as Prevention of Mastitis. *J. Livest. Sci. Prod.* 4 (1), 231–249. <https://doi.org/10.31002/jalspro.v4i1.2796>.

Zdanowicz, M., Shelford, J.A.; Tucker, C.B., Weary, D.M., Keyserlingk, M.A.G., 2004. Bacterial Populations on Teat Ends of Dairy Cows Housed in Free Stalls and Bedded with Either Sand or Sawdust. *J. Dairy Sci.* 87 (2), 1694-1701. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73322-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73322-6).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do nosso trabalho indicam que a antisepsia dupla dos tetos na pré-ordenha (AD) não trás benefícios em vacas criadas em pastejo com presença de tetos ligeiramente sujos antes da antisepsia (experimento 1), por não proporcionar melhor limpeza e menor contagens bacterianas quando comparado com a antisepsia convencional (AC). Do mesmo modo, a AD não é superior à AC em reduzir a CCS e as mastite subclínicas e clínicas quando há pouca sujidade nos tetos. Estudos que avaliem a eficácia da AD em situações com maior desafio ambiental, com a presença de vacas com tetos mais sujos antes da ordenha, são necessários para verificar se a antisepsia dupla pode melhorar a limpeza e carga microbiana dos principais agentes de mastite nestas condições.

Com vacas confinadas (experimento 2), a antisepsia dupla (AD) é mais eficaz na limpeza dos tetos na pré-ordenha e isso, possivelmente, se deve à presença de tetos mais sujos antes da antisepsia quando comparado com o experimento 1. A AD também reduz mais eficientemente a população de *Staphylococcus* spp. e a contagem bacteriana total dos tetos antes da ordenha de vacas confinadas e proporciona menor transmissão de microrganismos entre vacas pelas luvas dos ordenhadores. Desta forma, precisa-se de estudos que avaliem se existe superioridade da AD em melhorar a CPP do leite e em evitar quadros de mastite de origem ambiental e contagiosa em vacas confinadas. A antisepsia dupla com dois antissépticos (AD2A) tende a ser mais efetiva na redução de *Staphylococcus* spp. quando comparado com a antisepsia dupla com um antisséptico (AD1A). Assim, o melhor protocolo de antisepsia dupla precisa ser mais bem esclarecido.

Ambos os experimentos foram desenvolvidos em condições ambientais reais de vacas criadas em sistema de pastagens e confinadas. Desta forma, houve limitações como a falta de tetos sujos por questões climáticas no experimento com vacas em pastejo e a restrição de tempo para a avaliação das infecções intramamárias no experimento com vacas confinadas.

Apesar da necessidade de mais estudos que avaliem o custo-benefício da AD, a sua recomendação possivelmente estará atrelada às condições ambientais em que as vacas são criadas e, consequentemente, ao grau de sujidade presente nos tetos antes da antisepsia.

