UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ROCIO ELIZABETH CONTERO CALLAY

Capacitação técnica em boas práticas de ordenha e ocorrência de patógenos causadores de mastites contagiosas em propriedades leiteiras do estado de São Paulo.

Pirassununga

2017

ROCIO ELIZABETH CONTERO CALLAY

Capacitação técnica em boas práticas de ordenha e ocorrência de patógenos causadores de mastites contagiosas em propriedades leiteiras do estado de São Paulo.

Versão corrigida da tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia de alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes.

Pirassununga

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

CC761c CONTERO-CALLAY, ROCIO ELIZABETH
Capacitação técnica em boas práticas de ordenha e
ocorrência de patógenos causadores de mastites
contagiosas em propriedades leiteiras do estado de
Sã / ROCIO ELIZABETH CONTERO-CALLAY ; orientador
Andrezza Maria Fernandes. -- Pirassununga, 2017.
107 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos, Universidade de São
Paulo.

1. BPO. 2. CBT. 3. CCS. 4. Staphylococcus spp..
5. Streptococcus spp.. I. Fernandes, Andrezza
Maria, orient. II. Título.

ROCIO ELIZABETH CONTERO CALLAY

Capacitação técnica em boas práticas de ordenha e ocorrência de patógenos causadores de mastites contagiosas em propriedades leiteiras do estado de São Paulo.

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Data de aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos,
Universidade de São Paulo – Orientadora

Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos,
Universidade de São Paulo.

Prof. Dra. Ana Maria Centola Vidal, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos,
Universidade de São Paulo.

Dra. Carolina Rodrigues da Fonseca. Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFTM - Campus
Uberaba)

Dra. Sarah Hwa In Lee

Pirassununga

2017

DEDICATÓRIA

A minha família, a Charles, Inti e Samay por
acompanharem meu caminho. Ao meu pai.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos recebidas. Obrigada Deus.

A minha orientadora Profa. Dra Andrezza Maria Fernandes pela confiança, paciência, apoio e profissionalismo na realização de este trabalho.

A Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Pirassununga. Aos professores da Pós-Graduação, pela oportunidade para fazer o doutorado.

A Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación, (Senescyt) pela concessão da bolsa (beca) e apoio para a realização deste doutorado.

A Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador (UPS), minha Universidade no Equador, em especial ao Padre Javier Herrán, reitor, pelo apoio e confiança.

Ao Dr. Henk Hogeveen, Professor Animal Health Management e Dra. Mariska Van der Voort, do Business Economics Group, na Wageningen University - Netherlands, pela atenção e ensinamentos valiosos no projeto.

Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho, Coordenadora do Programa de Pós-graduação, pelo apoio nos momentos difíceis.

A Silvia Seraphin de Godoy, técnica do Laboratório Multiusuário de Microbiologia, FZEA- USP - Pirassununga pelos ensinamentos e amizade, e a todos os colegas do laboratório, que me ajudaram a concluir este trabalho.

Ao Departamento de Relações Internacionais, FZEA – USP, por abrir as portas e pelo carinho com os colegas estrangeiros.

Ao Prof. Dr. César de Lima Gonçalves e Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa, disponibilizando ajuda quando precisei.

Aos produtores de leite das propriedades envolvidas na pesquisa, Luis Enrique Lisone (Kiko), João Baldin, Fernando Cerri, Thiago e Mariana, por abrirem as portas para o projeto.

À equipe do Laboratório de Qualidade do Leite e Sistemas de Informação Geográfica da UPS em Equador.

À Marissa França, João Gustavo R. Forti, Sofia Pacgnella, Patrycia Vaiciunnas, Thais Corrêa e Odacir Burjato Neto, meus colegas no desenvolvimento desta pesquisa. Nas coletas, processamento e conclusão do trabalho.

Aos meus irmãos e demais familiares, aos amigos e amigas, equatorianos, brasileiros, colombianos, peruanos, venezolanos, cubanos, argentinos, e estrangeiros no decorrer desta aventura, muito obrigada.

A meus amigos: Priscila, Ana Caroline, Geraldo, Luis Jaime, Jamile, Vanessa, Kiussey, Connie, Andrés, Lucy, Peko, Katinha, Su, Brenda, Heber, Palmer, Olivia, Gissele. Julio, Jeaninne, Anderson, Cris, Frazen, Laya. Obrigada pela amizade.

Sou abençoada por conhecê-los.

“O demônio tem medo da gente alegre”.

(Dom Bosco)

RESUMO

CONTERO-CALLAY, R. E. **Capacitação técnica em boas práticas de ordenha e ocorrência de patógenos causadores de mastites contagiosas em propriedades leiteiras do estado de São Paulo**. 2017. 103 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

A doença da inflamação da glândula mamária, também conhecida como mastite, tem como uma das características o aumento de células somáticas no leite de quartos afetados. Entre as bactérias predominantes causadoras de mastites, destacam-se *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Vários estudos sugerem que estes agentes são tipicamente transmitidos de uma vaca para outra durante o momento da ordenha. A aplicação de programas de boas práticas de ordenha (BPO) permitem o controle da mastite pela eliminação de infecções detectadas no rebanho, prevenção de riscos e adequadas condições produtivas e sanitárias. A interação contínua entre produtores e técnicos tem se confirmado como ferramenta importante nos programas de treinamento, favorecendo o compartilhamento de experiências. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da capacitação técnica em BPO na qualidade higiênica do leite, mediante o monitoramento das práticas de ordenha implementadas, análises de componentes químicos e microbiológicos, incluindo a identificação de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., em propriedades leiteiras do estado de São Paulo. Na fase final do estudo foi observado que 84% dos itens de BPO avaliados estavam sendo usados com capacitação técnica, incluindo modificações de infraestrutura e controle da qualidade da fonte de água. O sucesso da aplicação de programas de controle da qualidade requerem o comprometimento dos produtores de leite. Entre as BPO que não foram adotadas, destacam-se o uso de luvas durante a ordenha e sanitizante na limpeza dos equipamentos, práticas que poderiam diminuir a transmissão dos patógenos contagiosos entre os animais. Embora as análises microbiológicas e identificação dos patógenos dos diferentes pontos de coleta tenham apresentado resultados variáveis ao longo do estudo, elas constituíram uma ferramenta importante durante o processo de capacitação técnica.

Palavras-chave: BPO. CBT. CCS. *Staphylococcus* spp. *Streptococcus* spp.

ABSTRACT

CONTERO-CALLAY, R. E. **Training of good milking practices and occurrence of pathogens causing contagious mastitis in dairy farms from the State of Sao Paulo.** 2017. 103 p. Thesis (PhD) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The mammary gland disease, also known as mastitis, has as characteristic the increase of somatic cells in milk from affected udder. Among the predominant bacteria causing mastitis, *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp are highlighted. Several studies suggest that these agents are typically transmitted from one cow to another during the milking. The application of programs on good milking practices (GMP) allows the control of mastitis through the elimination of infections detected in the herd, prevention of risks and proper productive and sanitary conditions. The continuous interaction between farmers and trainers has been confirmed as an important tool on training programs, supporting sharing experiences. Therefore, the present study aimed to evaluate the influence of GMP training on hygienic quality of milk, by monitoring milking practices implemented, chemical and microbiological analyzes, including the identification of *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp. in dairy farms from Sao Paulo state. In the final phase of this study it was demonstrated that 84% of the BPO evaluated items were being used with training including infrastructure modifications and quality control of the water source. The success of the implementation of quality control programs requires the commitment of dairy farmers. The GMP not adopted included the use of gloves during milking and sanitizers on equipment cleaning, practices that could reduce the transmission of contagious pathogens among animals. Although the microbiological analyses of the pathogens in different points on the milking management were inconstant during the study, they constitute an important tool during the training process.

Keywords: GMP. TBC. SCC. *Staphylococcus* spp. *Streptococcus* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Pontos de coleta de amostras nas fazendas produtoras de leite, estado de São Paulo, 2014.	29
Figura 2 - Mapa de localização de estudo, municípios de Itirapina e Pirassununga - São Paulo..	30
Figura 3 - Procedimento de amostragem nos diferentes pontos de coleta nas fazendas produtoras de leite, estado de São Paulo, 2014.	38
Figura 4 – Modificações na infraestrutura das fazendas produtoras de leite, estado de São Paulo, 2014	46
Figura 5 - Reuniões de capacitação técnica, com proprietários e funcionários nas fazendas do estudo, estado de São Paulo, 2014.....	56
Figura 6 - Comparação das médias das contagens de células somáticas ($\times 1.000$ cél/mL) do leite de tanques de expansão e vacas nas 4 fazendas durante o estudo, estado de São Paulo, 2014.	60
Figura 7 - Médias dos logaritmos das contagens de <i>Staphylococcus</i> spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F01, estado de São Paulo, 2014.....	66
Figura 8 - Médias dos logaritmos das contagens de <i>Streptococcus</i> spp., em tanque de expansão e pontos do manejo da ordenha na fazenda F01, no estado de São Paulo, 2014.....	66
Figura 9 - Médias dos logaritmos das contagens de <i>Staphylococcus</i> spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F02, estado de São Paulo, 2014.....	68
Figura 10 - Médias dos logaritmos das contagens de <i>Streptococcus</i> spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F02, estado de São Paulo, 2014.....	69
Figura 11 - Médias dos logaritmos das contagens de <i>Staphylococcus</i> spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F03, estado de São Paulo, 2014.....	70
Figura 12 - Médias dos logaritmos das contagens de <i>Streptococcus</i> spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F03, estado de São Paulo, 2014.....	71
Figura 13 - Médias dos logaritmos das contagens de <i>Staphylococcus</i> spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F04, estado de São Paulo, 2014.....	72
Figura 14 - Médias dos logaritmos das contagens de <i>Streptococcus</i> spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F04, estado de São Paulo, 2014.....	73
Figura 15 - Fragmentos de 412 pb observados nos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp., a partir da reação de PCR, após eletroforese em gel de agarose 1,5%	76
Figura 16 - Fragmentos de 420 pb observados nos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp., a partir da reação de PCR, após eletroforese em gel de agarose 1,5%.	76
Figura 17 - Fragmentos de 438 pb observados nos isolados de <i>Streptococcus</i> spp., a partir da reação de PCR, após eletroforese em gel de agarose 1,5%	77
Figura 18 - Número de amostras nas quais foram identificadas espécies de <i>Staphylococcus</i> e <i>Streptococcus</i> por pontos de coleta, das fazendas produtoras de leite dentro do estudo, com uso dos genes <i>Tuf</i> , <i>sodA</i> e 16S <i>rDNA</i> , no estado de São Paulo, 2014.....	81
Figura 19 - Reconstrução filogenética pelo método UPGMA a partir de sequências parciais de nucleotídeos do gene <i>Tuf</i> obtidas das amostras <i>Staphylococcus</i> spp., isoladas no presente estudo e outras do <i>GeneBank</i> , 2014.....	84

Figura 20 - Reconstrução filogenética pelo método UPGMA a partir de sequências parciais de nucleotídeos do gene 16S <i>rDNA</i> obtidas das amostras <i>Staphylococcus</i> spp., isoladas no presente estudo e outras do <i>GeneBank</i>	86
Figura 21 – Reconstrução filogenética pelo método UPGMA a partir de sequências parciais de nucleotídeos do gene <i>sodA</i> obtidas das amostras <i>Streptococcus</i> spp., isoladas no presente estudo e outras do <i>GeneBank</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Infraestrutura das fazendas produtoras de leite, envolvidas no estudo, estado de São Paulo.	32
Tabela 2 - Perfil básico de proprietários e funcionários	33
Tabela 3 - Checklist das boas práticas de ordenha a avaliar	34
Tabela 4 - Descrição de primers utilizados na PCR para detecção de genes <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp.	42
Tabela 5 - Modificações na infraestrutura das fazendas na fase final do estudo.....	46
Tabela 6 - Avaliação das boas práticas de ordenha por fazenda, na fase antes do estudo.	47
Tabela 7 –Boas práticas de ordenha adotadas por fazenda, na fase final de estudo.....	53
Tabela 8 – <i>Checklist</i> das boas práticas de ordenha adotadas nas 4 fazendas envolvidas no estudo, estado de São Paulo, 2014.	54
Tabela 9 - Nível de comprometimento dos produtores de leite das fazendas envolvidas no estudo, durante aplicação das BPO e participação nas reuniões de capacitação técnica, 2014.	56
Tabela 10 - Parâmetros químicos e Contagem de Células Somáticas do leite no tanque de expansão das 4 fazendas do estudo, estado de São Paulo, 2014.	58
Tabela 11 – Análises estadístico dos parâmetros químicos e Contagem de Células Somáticas do leite no tanque de expansão nas 4 fazendas do estudo, estado de São Paulo, 2014.	59
Tabela 12 – Médias dos logaritmos das contagens de mesófilos e psicotróficos em leite do tanque de expansão e pontos de coleta do estudo, na fazenda F01, estado de São Paulo, 2014. ..	61
Tabela 13 – Médias dos logaritmos das contagens de mesófilos e psicotróficos em leite do tanque de expansão e pontos de coleta do estudo, na fazenda F02, estado de São Paulo, 2014. ..	62
Tabela 14 – Médias dos logaritmos das contagens de mesófilos e psicotróficos em leite do tanque de expansão e pontos de coleta do estudo, na fazenda F03, estado de São Paulo, 2014. ..	63
Tabela 15 – Médias dos logaritmos das contagens de mesófilos e psicotróficos em leite do tanque de expansão e pontos de coleta do estudo, na fazenda F04, estado de São Paulo, 2014. ..	64
Tabela 16 - Médias dos logaritmos das contagens de mesófilos e psicotróficos em leite do tanque de expansão e pontos de coleta nas 4 fazendas do estudo, estado de São Paulo, 2014.....	65
Tabela 17 - Ocorrência de SCN, SCP e <i>Streptococcus</i> spp., em amostras de leite de vacas individuais e tanques de expansão da fazenda F01, no estado de São Paulo, 2014.	67
Tabela 18 - Ocorrência de SCN, SCP e <i>Streptococcus</i> spp., em amostras de leite de vacas individuais e tanques de expansão da fazenda F02, no estado de São Paulo, 2014.	69
Tabela 19 - Ocorrência de SCN, SCP e <i>Streptococcus</i> spp., em amostras de leite de vacas individuais e tanques de expansão da fazenda F03, no estado de São Paulo, 2014.	71
Tabela 20 – Ocorrência de SCN, SCP e <i>Streptococcus</i> spp., em amostras de leite de vacas individuais e tanques de expansão da fazenda F04, no estado de São Paulo, 2014.	73
Tabela 21 –Espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas em amostras dos pontos de coleta, das 4 fazendas produtoras de leite dentro do estudo, estado de São Paulo, 2014.....	78
Tabela 22 - Espécies de <i>Streptococcus</i> spp. isoladas em amostras dos pontos de coleta, das 4 fazendas produtoras de leite dentro do estudo, estado de São Paulo, 2014.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
μ	microlitros
μM	micro mol
BHI	Brain Heart Infusion
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen
CBQL	Conselho Brasileiro da Qualidade do Leite
CBT	Contagem total de bactérias
CCS	Contagem de células somáticas
cm ²	centímetros quadrados
cm ³	centímetros cúbicos
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESD	Extrato seco desengordurado
F	<i>Foward</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IN 62	Instrução Normativa nº 62
MAPA	Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento
min	minutos
mL	Mililitro
Ng	Nanograma
NMP	Número mais provável
pb	Pares de bases

PCR	Reação em cadeia da polimerase
R	<i>Reverse</i>
RBQL	Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite
rpm	Revoluções por minuto
t	Toneladas
TAE	Tris-acetate-EDTA- buffer
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
UV	Radiação ultravioleta
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Caraterização da mastite bovina	18
2.2	Patógenos causantes de mastites: <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp.....	20
2.3	Boas práticas de ordenha e programas de capacitação técnica	22
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	HIPÓTESE	28
5	MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1	Descrição dos sistemas de produção dentro do estudo	30
5.2	Determinação das boas práticas de ordenha avaliar através da capacitação técnica	33
5.3	Método usado na capacitação técnica e determinação do fator influente.....	35
5.4	Determinação da qualidade higiênica	36
5.5	Identificação genotípica	41
5.6	Análise dos dados	432
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
6.1	Capacitação técnica e manejo das BPO nos sistemas de produção dentro de estudo.....	44
6.2	Condição higiênica do manejo da ordenha nas fazendas do estudo	57
6.3	Identificação genotípica dos patotipos dos patógenos contagiosos	61
7	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS.....	89
	ANEXOS	97

1 INTRODUÇÃO

O leite se destaca como um alimento nutritivo completo, que contém proteínas, lipídios, vitaminas e minerais. Os benefícios biológicos são associados aos componentes químicos como as proteínas, reguladoras de múltiplas funções, mas principalmente associadas aos mecanismos de defesa do corpo. As gorduras têm benefício no sistema cardiovascular e os minerais, como cálcio e ferro, são importantes no desenvolvimento ósseo (MICINSKI et al., 2013; PEREIRA, 2014). Porém, o alto valor nutricional do leite e alta porcentagem de água (87%) predispõem à ocorrência de contaminação microbiológica por patógenos. As doenças transmitidas por alimentos, são alerta de preocupação dos órgãos responsáveis pela saúde pública, que recomendam observar controles de higiene em todas etapas da produção (CARLONI et al., 2016).

A inflamação da glândula mamária conhecida como mastite é causada principalmente por bactérias patogênicas e deficiências de higiene na ordenha. As perdas econômicas são significativas em todos os níveis da cadeia de produção do leite. Nas fazendas principalmente, são associadas com a redução do volume de leite por vaca, gastos com serviços veterinários, descarte de leite após o tratamento, abate prematuro do rebanho e perdas reprodutivas. Na indústria, as perdas estão associadas à perda das características sensoriais dos produtos (exemplo: queijo) e redução da vida de prateleira (exemplo: leite fluido) (BARBANO; MA; SANTOS, 2006; CHEN et al., 2010; TOLOSA et al., 2016).

A mastite contagiosa (causada por patógenos contagiosos) é caracterizada pelo aumento de células somáticas no leite dos quartos afetados. Entre as bactérias predominantes de mastites clínicas e subclínicas as *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., capazes de produzir toxinas que destroem os tecidos da glândula. Vários estudos sugerem que as bactérias são tipicamente transmitidas de uma vaca a outra durante o momento da ordenha (patógenos contagiosos) e outras existem no ambiente da vaca (patógenos ambientais). Porém, problemas sanitários (altas contagens de células somáticas) são decorrentes com higiene da fazenda, riscos à saúde do rebanho, resíduos de antibióticos e toxinas no leite.

Devido aos diferentes fatores que podem incidir na mastite, o controle das práticas de ordenha, através de procedimentos pré-estabelecidos como as boas práticas de ordenha (BPO),

são reportados como medidas efetivas na prevenção de riscos de contaminação do leite. Os procedimentos apropriados de ordenha são importantes para reduzir as mastites no rebanho, controlar a limpeza e higiene dos equipamentos e cuidar da saúde do pessoal. Entretanto, muitos produtores de leite não adotam as BPO, porque estas são consideradas como tarefas complexas, cujos benefícios não são vistos.

Os programas de treinamento para produtores e funcionários de ordenha permitem disseminar informação técnica para prevenir a qualidade microbiológica do leite cru. Além do impacto nas competências do produtor, os benefícios expandem-se na produtividade da fazenda. Os novos modelos educacionais sugerem programas que motivem o produtor, facilitando a comunicação, discussões em grupos, intercâmbio de experiências entre produtor e técnico além de aplicação de atividades demonstrativas nas fazendas. Desse modo, as soluções são propostas em acordo com a realidade da fazenda. Várias pesquisas estimam quais práticas de manejo têm maior custo-benefício na saúde da glândula mamária e sugerem maior atenção na desinfecção do teto (pós-dipping), uso de papel, luvas descartáveis nas mãos, controle na limpeza de teteiras e equipamentos de ordenha.

Neste sentido, a presente pesquisa tem como intuito avaliar a influência da capacitação técnica em BPO na qualidade higiênica do leite, mediante o monitoramento das práticas ordenha implementadas, análises de componentes químicos e microbiológicos, contagens de células somáticas, mesófilos, psicrotróficos e identificação de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em amostras coletadas em diferentes pontos da ordenha, em propriedades leiteiras do estado de São Paulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caraterização da mastite bovina

O leite e derivados lácteos têm um importante papel na alimentação humana. Seu consumo é frequentemente associado com uma dieta saudável e equilibrada. Fonte de nutrientes e energia necessária pelas propriedades de seus componentes como: proteínas de alta qualidade, caseína e aminoácidos essenciais; com gorduras que merecem uma atenção adicional, devido aos seus benefícios para a saúde no sistema cardiovascular e função imunológica; vitaminas lipossolúveis e minerais essenciais como cálcio, fósforo, entre outros. Portanto, é fundamental assegurar a integridade e qualidade intrínseca do leite e produtos lácteos para o consumo humano (MORE, 2009; PEREIRA, 2014; STÁDNÍK et al., 2015).

As células somáticas (leucócitos, predominantemente neutrófilos e células epiteliais) são um indicativo da qualidade do leite, refletida pela saúde da glândula mamária. Estudos indicam contagens de células somáticas menores que 100.000 cél/mL no leite dos quartos livres de patógenos (DALTON; ISRAELSEN; YOUNG, 2017; MORE, 2009). A mastite bovina é definida como inflamação da glândula mamária, ocorrendo em resposta à invasão por bactérias, bolores, leveduras e algas através do canal do teto. As células somáticas se elevam com o intuito de neutralizar as toxinas e regenerar o tecido do epitélio secretor (AWALE et al., 2012; FAGUNDES et al., 2011; GOLI et al., 2012).

De acordo com a etiopatologia, a mastite pode ser classificada como contagiosa ou ambiental. Os patógenos contagiosos são adaptados a sobreviver dentro da glândula mamária e, além de elevar as células somáticas do leite, podem ser transmitidos no momento da ordenha de uma vaca a outra (DUFOUR et al., 2012; FAGUNDES et al., 2011). Entre os principais as: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* spp., e *Streptococcus dysgalactiae*, sendo este último descrito mais comumente como contagioso, mas podendo ser também ambiental (SANTOS et al., 2007). Os patógenos ambientais geram uma resposta imune do hospedeiro e podem ser eliminados, mas quando o animal vive num ambiente contaminado ou existem condições irregulares de higiene e manejo dos animais, as bactérias podem adentrar no canal do teto. Entre os principais oportunistas ambientais estão a *Escherichia coli* e o *Streptococcus uberis*. Estudos prévios indicam um incremento na incidência de mastites

ambientais enquanto a incidência de mastites contagiosas diminui (AWALE et al., 2012; CERVINKOVA et al., 2013; GOLI et al., 2012; MATSUBARA et al., 2011).

Igualmente, pelos sinais do teto, como inchaço, vermelhidão e dor, a mastite pode ser descrita como clínica e subclínica. A manifestação sistêmica tem febre, depressão, tremores, perda de apetite e perda de peso. A mastite clínica é caracterizada pela apresentação de grumos no leite, endurecimento e coloração avermelhada da glândula mamária, febre, perda de apetite e morte do animal. Pelo contrário, a mastite subclínica é difícil de ser identificada e por esta razão pode causar perdas significativas na produção e qualidade do leite (AWALE et al., 2012; CERVINKOVA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2014; GOLI et al., 2012). O *Staphylococcus aureus* tem sido apontado como agente causador de ambos os tipos de mastite, clínica e subclínica, e o microrganismo mais frequentemente isolado dos casos de mastites (AWALE et al., 2012).

A mastite é a doença mais frequente e onerosa do rebanho de leite. As consequências econômicas têm um impacto na produção da fazenda, indústria e afeta as demandas de qualidade do consumidor. Várias pesquisas relatam a comparação entre os custos econômicos da mastite versus os benefícios da gestão na prevenção, cujas variações por metodologia e região dificultam a comparação (HALASA et al., 2007; MORE, 2009). De acordo com o impacto econômico da mastite clínica (ROLLIN; DHUYVETTER; OVERTON, 2015) ocorrendo nos primeiros 30 dias de lactação em fazendas dos Estados Unidos da América, estimaram que a maior parte dos prejuízos econômicos (71%) foram por custos após a incidência da mastite, como: abate prematuro do rebanho e perdas na taxa de reprodução, os quais seriam indiretos ou futuros e; os custos diretos calculados no momento da doença pelo diagnóstico, tratamento e serviços veterinários seriam os custos diretos os quais foram, economicamente mais baixos (29%) em comparação com os custos indiretos. A pesquisa referida por Rollin, Dhuyvetter e Overton (2015) ressaltou um modelo econômico com oportunidades perdidas pelos produtores, não sempre percebidas como custos da mastite.

Os efeitos da infecção da glândula mamária na reprodução são referidos à elevação da temperatura corporal (hipertermia), que aumentam a concentração de citocinas e moduladores da resposta imune, que podem afetar a função uterina, interrompendo a maturação do ovócito e o

desenvolvimento reprodutivo embrionário (AWALE et al., 2012; ROLLIN; DHUYVETTER; OVERTON, 2015).

Na indústria, os estudos têm focado nos parâmetros de composição, quando as células somáticas são elevadas e as enzimas associadas causaram degradação de proteínas e gorduras durante o armazenamento do produto refrigerado. A vida útil do leite pasteurizado é reduzida, por alteração do perfil sensorial. No caso dos queijos a situação é similar, a textura (dureza e flexibilidade) são alteradas quando as células somáticas atingem níveis superiores a 750.000 cél/mL (BARBANO; MA; SANTOS, 2006; CHEN et al., 2010).

2.2 Patógenos causadores de mastites: *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Staphylococcus spp. são bactérias esféricas, Gram positivas, não esporuladas, que, se observadas ao microscópio, apresentam-se em pares celulares como cachos de uva. São anaeróbias facultativas e catalase positivas. Os estafilococos estão presentes no ar, água, superfícies ambientais, homem, animais e multiplicam-se a temperatura ambiente, variando entre 7- 47,8°C (SILVA et al., 2010).

Na classificação, distinguem-se as cepas produtoras de coagulase, ou estafilococos coagulase positiva (SCP) e não produtoras de coagulase, chamadas estafilococos coagulase negativo (SCN) (MEHROTRA et al., 2000; XU et al., 2015). A mastite causada por *S. aureus* é de maior importância nos rebanhos cujo tratamento complexo é devido à elevada resistência aos antibióticos, sendo o reservatório primário da infecção, a glândula mamária e superfície do teto (FAGUNDES et al., 2012).

A ocorrência de estafilococos em alimentos, representa um risco potencial para a saúde pública pela produção de enterotoxinas que causam intoxicação alimentar. Por ser amplamente distribuída na natureza, sua transmissão aos alimentos ocorre frequentemente quando há falhas na higiene de manipuladores. Vários surtos têm sido reportados, inclusive no Brasil, por estafilococos coagulase positiva e coagulase negativa (ANDRADE et al., 2011; CERVINKOVA et al., 2013).

Os *Streptococcus* spp. são bactérias Gram positivas, não esporogênicas, anaeróbias facultativas, catalase e oxidase negativas. São imóveis e de forma ovoide, geralmente arranjados

em cadeia ou pares de células. Em seu metabolismo, produzem ácido láctico e multiplicam-se a temperatura ótima de 37°C (SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2010). Na etiologia da mastite dos ruminantes, os estreptococos são considerados o segundo grupo de microrganismos em importância, sendo precedidos pelo grupo dos estafilococos (CHARAYA et al., 2015; SANTOS et al., 2007).

As principais bactérias relacionadas com a mastite bovina são *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis* e *S. uberis*. Os fatores de virulência incluem proteínas de superfície, polissacarídeos capsulares, exotoxinas e enzimas que estão presentes nas diversas espécies de estreptococos. A identificação de *S. agalactiae* pelo fator de hemólise de tipo beta (hemólise total) é usado como critério decisivo. *S. dysgalactiae* é sempre alfa hemolítico (hemólise parcial) ou não hemolítico, enquanto que *S. uberis* apresenta hemólise do tipo alfa (SANTOS et al., 2007).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) como ferramenta de diagnóstico para a detecção de patógenos vem sendo frequentemente utilizada nos laboratórios. A técnica permite a amplificação de regiões espécie-específicas de DNA, que podem superar os problemas com a variabilidade fenotípica. Atualmente, a combinação de várias reações de PCR ao mesmo tempo, são úteis na detecção de agentes patogênicos com alta relação custo-benefício em menor tempo (CHARAYA et al., 2015; XU et al., 2015).

De acordo com pesquisas referentes à variabilidade genética a sequência da região 16S rRNA permite a diferenciação das espécies *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*. Estudos indicam que o gene *Tuf*, permite diferenciar o genoma bacteriano associado à formação da cadeia peptídica, demonstrou ser confiável e reprodutível na identificação de isolados de *S. aureus*, com uma alta similaridade de sequência (100%) com a estirpe de referência. No entanto, para isolados de SCN, a similaridade foi menor (92,1%) na identificação ao nível da espécie (CHARAYA et al., 2015; XU et al., 2015).

Para a identificação das espécies *S. agalactiae*, *S. bovis*, *S. dysgalactiae* e *S. mutans* entre outras espécies, Hoshino, Fujiwara e Kilian (2005) recomendaram o uso do gene *sodA*, que codifica uma subunidade dependente de manganês, a enzima superóxido dismutase. As análises

filogenéticas produzem uma árvore evolutiva semelhante à árvore construída com 16S rRNA (DING et al., 2015).

2.3 Boas práticas de ordenha e programas de capacitação técnica

O leite, como ponto de partida na cadeia de produção de produtos lácteos, é suscetível à contaminação por uma vasta gama de bactérias e outros patógenos que podem se multiplicar rapidamente a altas temperaturas do ambiente e pH próximo da neutralidade (KALUPAHANA; SILVA-FLETCHER, 2016).

O monitoramento e higienização dos ambientes de produção de alimentos são atividades essenciais para determinar os pontos de risco da qualidade. Em geral, todo programa de controle de qualidade requer estabelecer indicadores para avaliar a evolução e desempenho na produção, qualidade dos produtos e participação dos colaboradores. Cada indicador deve ter uma meta que fornecerá informação do sucesso ou fracasso determinado, em que a comunicação e cumprimento das metas serão fundamentais (ALMEIDA; DOMINGUES; SAMPAIO, 2014; TAKAHASHI et al., 2012).

Em nível mundial, as indústrias lácteas estabeleceram programas de pagamento por qualidade ou bonificações no pagamento por litro de leite, para estimular os produtores a obterem alimentos de qualidade e assegurar a inocuidade do leite para os consumidores (BOTARO; GAMEIRO; SANTOS, 2013; MORE, 2009). A ordenha deve ser realizada por pessoas treinadas em eliminar infecções detectadas no rebanho, manter boas condições sanitárias e percepção de riscos no rebanho. Os programas de treinamento favorecem a disseminação de informação técnica entre proprietários e funcionários da produção, promovendo o conhecimento, liderança e confiança dos produtores nas tarefas que realizam (ROJO-GIMENO et al., 2016; TOLOSA et al., 2016).

O impacto dos programas de treinamento em BPO refletem no aumento da produtividade e renda da fazenda. O manejo do rebanho com aplicação das BPO permite a prevenção de mastites por controle da limpeza em cada etapa durante a ordenha. Práticas que favorecem o aumento no desempenho dos animais e produtividade. No leite, é favorável para diminuir as contagens de células somáticas no tanque de expansão, além de prevenir a contaminação do leite

por produtos químicos e antibióticos (JANSEN et al., 2009; MATSUBARA et al., 2011; VALEEVA; LAM; HOGEVEEN, 2007; ZAREIE; ZAMANI; KARAMI, 2016).

Vários estudos investigaram quais práticas de manejo têm o maior efeito sobre a saúde do teto ou são mais comumente usadas. As pesquisas relatam que a adoção de certas práticas é influenciada pelo método de ordenha, tamanho do rebanho ou região. Em países como Canadá e outros em desenvolvimento como Brasil o descarte dos primeiros jatos, limpeza e secagem de tetos e uso de solução desinfetante na pós-ordenha são práticas geralmente usadas. Mas a pré-ordenha com solução desinfetante, uso de luvas durante a rotina e papel descartável para secagem dos tetos, são práticas menos comuns entre os produtores de leite. Com relação à secagem dos tetos, os métodos variam, podendo ser usado papel descartável ou toalhas individuais, e na pré-ordenha pode ser usada uma solução clorada ou iodada. A eliminação dos primeiros jatos antes da ordenha é uma prática cuja frequência de uso está aumentando em comparação a resultados de pesquisas prévias (BELAGE et al., 2017; KIVARIA. M.F.; NOORDHUIZEN; KAPAGA, 2004; MATSUBARA et al., 2011; REYES et al., 2017).

2.3.1 Fatores que influenciam na adoção das BPO

Embora os programas de capacitação técnica geralmente são positivos para melhorar o manejo das práticas de ordenha (DUFOR et al., 2012; REYES et al., 2017), vários estudos demonstraram uma baixa correlação entre o treinamento aos produtores no manejo das BPO com a redução do número total de bactérias (CBT) no leite (BELLI et al., 2013; CORTEZI, 2014; TOLOSA et al., 2016).

O ritmo de aprendizagem de adultos requer uma metodologia motivacional diferenciada, que enlace as expectativas de melhoria à mudanças na atitude e vontade do produtor. O desenvolvimento destas atividades abarca diversos fatores externos e internos do ser humano. Externos como o fator econômico, o nível educativo ou experiência dos produtores e fatores internos próprios do sujeito (psicológicos), como atitude, motivação e vontade, os quais têm a influência do ambiente social e cultural (BRUIJNIS et al., 2013; FIRETTI; RIBEIRO; FRANZOLIN NETO, 2011).

O fator econômico influencia na adoção das BPO, quando a produção do leite é de alta qualidade e representa para o produtor uma atividade competitiva e economicamente viável. O

estabelecimento dos programas *premium* são motivadores para os esforços dos produtores quando as punições são evitadas por redução da carga bacteriana e contagens de células somáticas (DUFOUR et al., 2012; HUIJPS et al., 2010). Várias pesquisas mostram uma relação positiva entre melhorar a saúde dos tetos e o número de ferramentas (da aplicação das BPO) quando o incentivo econômico está incluso. A adoção dos programas *premium* no Brasil, em cooperativas leiteiras, baseados nos limites segundo a normativa vigente, melhoraram os parâmetros de qualidade associados a reformas no manejo da ordenha (BOTARO; GAMEIRO; SANTOS, 2013; BRASIL, 2011).

Conhecer o nível de educação dos produtores, funcionários ou colaboradores na fazenda permite organizar os programas de treinamento para definir os objetivos e metas em cada etapa e nível de gestão dos responsáveis. Em função das tarefas que realiza, saber se tem a formação suficiente para o desenvolvimento de seu trabalho. Uma alta qualificação dos gestores da produção (alto nível de educação ou instrução) pode influenciar na integração dos processos (ALMEIDA; DOMINGUES; SAMPAIO, 2014; WALKER; PRITCHARD; FORSYTHE, 2003). Nos países em desenvolvimento, geralmente a produção de leite em fazendas de pequena e média escala tem funcionários com baixo nível de escolaridade (WINCK; THALER, 2012). Os programas de capacitação técnica são positivos, porque fortalecem os conhecimentos dos recursos humanos para realizar modificações durante o manejo da rotina da ordenha, porque todos participam ativamente como protagonistas das mudanças e melhoras (KILPATRICK, 2000; VALEEVA; LAM; HOGEVEEN, 2007). Os investimentos de capital, modificações de infraestrutura ou equipamentos requerem treinamento dos produtores. Os produtores com maior nível de educação estão cientes da importância da qualidade e apresentam melhores resultados na avaliação dos programas de controle de riscos. As pesquisas destacam que os produtores rurais que tinham elevado conhecimento técnico, possuíam parâmetros de qualidade do leite superiores, em comparação aos produtores com baixo conhecimento (VAARST et al., 2007; ZAREIE; ZAMANI; KARAMI, 2016). Outras pesquisas reportaram que os produtores que tinham um maior nível educação procuravam participar de mais cursos de treinamento (ANGELILLO et al., 2000).

Os anos de experiência na atividade, ou permanência contínua em programas de treinamento, são favoráveis para motivar aos produtores a realizar melhoras no trabalho. A

experiência do produtor favorece a detecção de doenças no gado e percepção de riscos; e ao veterinário ou técnico favorece o grau de confiança do produtor para aceitar as sugestões de orientação que ele possa receber (ALARCON et al., 2014; ALMEIDA; DOMINGUES; SAMPAIO, 2014; ANGELILLO et al., 2000).

A motivação dos produtores a respeito da implementação das BPO pode estar ligada a fatores pessoais, como o prestígio social (comum em caso de cooperativas leiteiras) ou outros, como o prazer de manter um rebanho saudável (FIRETTI; RIBEIRO; FRANZOLIN NETO, 2011; QUEVEDO-BLASCO; QUEVEDO-BLASCO; TÉLLEZ-TRANI, 2016; VALEEVA; LAM; HOGEVEEN, 2007). Dado que a motivação dos produtores pode ser devida a diferentes fatores, é improvável que uma abordagem única estimule a melhoria no manejo de mastite conforme o programa esperado. A motivação na indústria pode ser mensurada na otimização dos processos, produtividade ou renda (no caso de uma motivação econômica). A estratégia é o envolvimento e motivação de todos os funcionários para alcançar os objetivos na fazenda (ALMEIDA; DOMINGUES; SAMPAIO, 2014; VALEEVA; LAM; HOGEVEEN, 2007).

A atitude do produtor também é importante os produtores devem refletir sua percepção de riscos de mastite no gado com ações preventivas. Os níveis de conformidade dos produtores com os parâmetros de qualidade nem sempre são fáceis de se-determinar, mas eles devem enfrentar a adoção de práticas de controle de mastite com comprometimento e responsabilidade (FIRETTI; RIBEIRO; FRANZOLIN NETO, 2011; HUIJPS et al., 2010; SURKAR et al., 2014).

2.3.2 Métodos da capacitação técnica

A metodologia de capacitação técnica em grupo permite alocar os participantes num ambiente familiar para promover mais ação em função dos objetivos propostos. É aplicável como atividade inicial em diferentes programas de capacitação, para se obter um clima de descontração de grupos externos e como preparação para atividades subsequentes (FIRETTI; RIBEIRO; FRANZOLIN NETO, 2011) A interação contínua entre produtores e técnicos tem se confirmado como uma metodologia importante nos programas de extensão rural, favorecendo compartilhamento de experiências, problemas e procurando soluções nos próprios recursos. Neste sentido, os processos de formação e construção de aprendizagens na fazenda permitem que funcionários, proprietários e manipuladores de ordenha conheçam e se envolvam em todas as

atividades críticas da produção (KILPATRICK, 2000; SEMBADA et al., 2016; VAARST et al., 2007).

Mundialmente, os programas para melhorar a saúde dos tetos são implementados usando ferramentas e métodos de comunicação, para informar e persuadir os produtores de leite. Para melhorar a gestão, têm sido desenvolvidas várias ferramentas, como cartões instrutivos, planos de tratamentos (para doenças ou vacinas), *checklist* e *softwares*. As inovações através do uso de meios de comunicação (chamadas telefônicas, apresentações tipo *Power point*, internet) estimulam o contato entre consultores e produtores, levando a resultados superiores, com pessoal altamente instruído para o benefício das fazendas. Uma melhor comunicação entre técnicos e produtores pode ser a chave nos programas educacionais para que as medidas das BPO sejam implementadas (BRUIJNIS et al., 2013; JANSEN; RENES; LAM, 2010; VALEEEVA; LAM; HOGEVEEN, 2007).

Uma boa estratégia durante os programas de capacitação técnica é realizar várias sessões de acompanhamento com demonstrações práticas nos processos de adoção de conhecimento e destrezas. O envolvimento de diferentes profissionais formadores, facilitadores, apresentadores e convidados também é eficaz para motivar mudanças bem-sucedidas. Os métodos de intervenção devem valorizar as decisões locais, motivando os produtores a participar das atividades que aumentem a vontade de fazer mudanças (AZEVEDO et al., 2016; CHASE; ELY; HUTJENS, 2006; KILPATRICK, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da capacitação técnica em boas práticas de ordenha na qualidade higiênica do leite, mediante o monitoramento das práticas de ordenha implementadas, análises de componentes químicos e microbiológicos, contagens de células somáticas, mesófilos, psicrotróficos e identificação *Staphylococcus* spp., e *Streptococcus* spp. em amostras coletadas em diferentes pontos da ordenha, em propriedades leiteiras na região centro-Leste do estado de São Paulo.

3.2 Objetivos específicos

1. Analisar a implementação das boas práticas de ordenha nos sistemas de produção e os fatores que influenciam na capacitação técnica.
2. Avaliar a condição higiênica da obtenção e armazenamento do leite em diferentes pontos coleta: tanques de refrigeração, amostras compostas de vacas, teteiras, água, mãos de ordenhadores, por meio de análises microbiológicas (mesófilos, psicrotróficos, *Staphylococcus* spp., e *Streptococcus* spp. antes, durante e após a capacitação técnica.
3. Isolar e identificar *Staphylococcus* spp., e *Streptococcus* spp. nos diferentes pontos de coleta, antes, durante e após a capacitação técnica dos produtores nas propriedades do estudo.

4 HIPÓTESE

A capacitação técnica em boas práticas de ordenha com produtores de leite da região centro-leste do estado de São Paulo, melhora a condição higiênica e diminui a ocorrência de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. em diferentes pontos da ordenha e armazenamento do leite.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado entre os meses de fevereiro a dezembro de 2015. Neste período, foram realizadas 6 reuniões de capacitação técnica com coleta de amostras e 6 visitas técnicas específicas para avaliar a saúde do rebanho com uso de *Califórnia Mastitis Test* (CMT) em cada fazenda. As fazendas dentro do estudo assignaram o termo de compromisso (Anexo A) no qual foi concedida a utilização dos dados coletados para a pesquisa.

Para avaliar a capacitação técnica e os objetivos da pesquisa, o estudo foi dividido em três etapas: antes (I), durante (D) e final (F). A primeira etapa (I) teve como objetivo a caracterização ou diagnóstico das fazendas. Na etapa (D) foram realizadas as capacitações técnicas e coleta de amostras e na etapa (F) foi realizada a avaliação final da pesquisa nas fazendas.

Em cada visita foram coletadas 11 amostras por fazenda, em cinco pontos da ordenha e armazenamento do leite: tanque de expansão (1), vacas em lactação (5 vacas por fazenda), teteiras antes e depois da ordenha (2), mãos de ordenhadores, antes e depois da ordenha (2) e fonte de água (1), obtendo o total de 264 amostras analisadas no estudo (Figura 1).

Figura 1- Pontos de coleta de amostras, nas fazendas produtoras de leite, estado de São Paulo, 2014.

Fonte: VÁSQUEZ, F. et al. Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (departamento de Boyacá). **Revista de Medicina Veterinaria**, Bogotá, n. 14, p. 61-83, 2007.

5.1 Descrição dos sistemas de produção dentro do estudo

A pesquisa foi realizada em quatro propriedades produtoras de leite, da região centro-leste do estado de São Paulo, Brasil. As fazendas dentro do estudo foram identificadas como F01, F02, F03 e F04. As propriedades estavam localizadas nos municípios de Itirapina (F01, F02) e Pirassununga (F03, F04) (Figura 2).

Figura 2 - Mapa de localização de estudo, municípios de Itirapina e Pirassununga - São Paulo.

Fonte: SISTEMAS DE INFORMAÇÃO GEOGRÁFICA (SIG). **Mapas**. Universidad Politécnica Salesiana del Ecuador, 2017.

Para descrever os sistemas de produção dentro do estudo foram considerados três elementos: infraestrutura, parâmetros de produção e perfil básico de proprietários e funcionários envolvidos no manejo da ordenha.

Na infraestrutura, o tamanho das fazendas variou entre 2,5 a 120 hectares, e em todas as propriedades o Girolando era a raça predominante.

A fazenda F01 possuía uma sala de ordenha completa (área para ordenha e área de espera) e sistema de ordenha mecânica canalizada, as demais fazendas possuíam curral com piso batido ou concreto e ordenha mecânica tipo balde ao pé. Para armazenamento e refrigeração do leite, três fazendas possuíam tanque de expansão, mas na fazenda F04 era usado um latão para armazenar no freezer. As quatro fazendas eram abastecidas por fontes de água própria, poço artesiano nas fazendas F01, F03, F04 e nascente na fazenda F02. O sistema de lavagem comum dos equipamentos de ordenha era automático, exceto na fazenda F04, que tinha lavagem manual.

Diariamente todas as fazendas realizavam duas ordenhas e usavam a fonte de água para consumo humano, lavagem de utensílios e equipamentos de ordenha (Tabela 1).

Tabela 1- Infraestrutura das fazendas produtoras de leite envolvidas no estudo, estado de São Paulo, 2014.

Descrição	Fazendas			
	F01	F02	F03	F04
Área da propriedade (ha)	120	2,5	21	32,5
Raça dos animais	Girolando	Girolando	Girolando	Girolando
Sistema de ordenha	Mecânico fluxo fechado	Mecânico balde ao pé	Mecânico balde ao pé	Mecânico balde ao pé
Sala de ordenha	Sala de ordenha com piso de concreto	Curral - piso de concreto	Curral – chão batido	Curral - piso de concreto
Sala ou área de espera /com teto	Sim	Não	Não	Não
Refrigeração	Tanque	Tanque	Tanque	Freezer
Fonte de água	Poço artesiano	Nascente	Poço artesiano	Poço artesiano
Sistema de lavagem de equipamentos	Automático	Automático	Automático	Manual

Fonte: Própria autoria.

No período inicial deste estudo, as propriedades selecionadas apresentaram-se de forma heterogênea, ou seja, as características de rebanho, mão de obra, sistema de produção, sistema e manejo de ordenha eram muito distintos. O sistema de produção era semi-intensivo.

Em quanto à descrição dos parâmetros de produção, o número de vacas totais por fazenda foi entre 19 a 130, e as vacas em lactação foram entre 9 a 50. A média de produção do leite foi de 237 litros ao dia, com a produção em média de 14,7 litros por vaca por dia. A remuneração pelo litro de leite manteve-se em torno de R\$ 0,80 a 0,90 (1US= R\$ 2,35), sendo que todas as propriedades estavam vinculadas a laticínios que não possuem programa de bonificação por

parâmetros de composição química do leite (gordura, proteínas e sólidos totais) ou por índices de qualidade (CBT e CCS).

No perfil básico de proprietários e funcionários, a idade dos proprietários foi entre 21-43 anos. Ressalta-se o alto grau de escolaridade (superior) dos proprietários das fazendas F01, F02 e F04, com exceção do proprietário da fazenda F03 que tinha ensino médio completo. Em relação aos funcionários responsáveis pela ordenha, todos tinham um grau de ensino fundamental e maior experiência trabalhando na produção de leite que os proprietários (Tabela 2).

Tabela 2 - Perfil básico de proprietários e funcionários das fazendas produtoras de leite dentro do estudo, estado de São Paulo, 2014.

Descrição		Fazendas			
		F01	F02	F03	F04
Idade (anos)	Proprietário	35	43	40	21
	Funcionário	32	45	60	-
Educação (Grau de escolaridade)	Proprietário	Superior	Superior	Ensino médio	Superior
	Funcionário	Ensino fundamental	Ensino fundamental	Ensino fundamental	-
Experiência na produção de leite (anos)	Proprietário	3	<1	2	3
	Funcionário	4,5	4	>5	-
Capacitação técnica prévia	Proprietário	Sim	Sim	Sim	Sim
	Funcionário	Não	Não	Não	-

Fonte: Própria autoria.

5.2 Determinação das boas práticas de ordenha (BPO) por meio da capacitação técnica

Para avaliar o manejo das BPO com aplicação de capacitação técnica, um *checklist* amplo foi elaborado com base na guia para práticas leiteiras (Anexo 2). Estudos similares, advertem a importância de definir medidas de intervenção prévias a uma capacitação técnica, que sejam

sustentáveis com a economia da fazenda e responsáveis com a saúde humana, e que permitam maior eficiência no manejo da ordenha para prevenir as mastites e seus efeitos (HALASA et al., 2007; HUIJPS et al., 2010).

Porém, para definir as práticas de ordenha a serem avaliadas no presente estudo, foram definidos 22 itens, divididos em 3 controles: manejo de ordenha (10), higienização (7), registros e outros adicionais (5). No manejo de ordenha, foram definidos aqueles que são importantes na identificação da saúde dos tetos como: o teste dos grumos, uso de CMT e descarte dos primeiros jatos do leite, a desinfecção dos tetos com solução desinfetante na pré-ordenha e pós-ordenha, uso de papel descartável para secagem dos tetos; uso de luvas nas mãos do operador e higienização das mãos dos ordenhadores (AZEVEDO et al., 2016; DUFOUR et al., 2012; FAGUNDES et al., 2012).

A higienização estava associada com a frequência e limpeza dos equipamentos e utensílios com utilização de detergentes apropriados (ácido e alcalino), sanitizantes, uso de água quente e frequência de lavagem do tanque, assim como a colheita dos resíduos (orgânicos e inorgânicos) para garantir um ambiente seguro para o produtor com menor impacto ao ambiente (CORTEZI, 2014; FAO, 2011; VÁSQUEZ et al., 2007).

Quanto ao controle de registros, sua importância foi na conservação e gestão sanitária do rebanho, como a aplicação de vacinas, tratamentos dos animais doentes e no período da “vaca seca”, a fim de manter uma base de dados dos medicamentos e produtos usados. Neste bloco, também foi incluída a inspeção da qualidade da fonte de água por meio de análises laboratoriais e adicionado um item para registro das modificações na infraestrutura que melhoraram com a realização das BPO.

Em cada visita à fazenda, a realização ou não das práticas de ordenha foi registrada no *checklist* com uma resposta fechada (sim/não), conforme a descrição na Tabela 3.

Tabela 3 - *Checklist* das boas práticas de ordenha a avaliar nas fazendas produtoras de leite, estado de São Paulo, 2014.

Descrição		Realizada	
		Sim	Não
		%	%
(I)	Manejo da ordenha	Teste dos grumos	
		Uso de CMT	
		Lavagem dos tetos quando necessário	
		Descarte dos primeiros jatos de leite	
		Pré-dipping com solução desinfetante	
		Uso de luvas	
		Lavagem de mãos antes e depois da ordenha	
		Pós-dipping com solução desinfetante	
		A vaca permanece em pé (após-ordenha)	
		Uso de papel descartável para secado dos tetos	
(II)	Higienização	Prevenção da contaminação de teteiras	
		Uso de detergente básico	
		Uso de detergente ácido	
		Uso de sanitizante	
		Uso de água quente	
		Frequência de lavagem de equipamentos e/ou local de ordenha	
(III)	Registros e outros adicionais	Sistema de recollecção de resíduos	
		Registro de vacinas	
		Registro de vacas doentes	
		Tratamentos em vaca seca	
		Análises da qualidade (químico) da fonte de água	
		Registro de modificações na infraestrutura	

Fonte: Própria autoria.

5.3 Método usado na capacitação técnica

O treinamento foi realizado durante a primeira ordenha da manhã nas fazendas F01, F03 e F04, e apenas na fazenda F02 o treinamento foi realizado na segunda ordenha no período da tarde. O tempo destinado ao treinamento em cada fazenda foi de aproximadamente 3 horas.

O treinamento foi elaborado de tal forma que os participantes executassem as atividades a partir das normas de segurança, utilizando os testes prévios a ordenha para avaliar a saúde dos tetos (CMT e teste da caneca), realizando corretamente a limpeza dos tetos, pré-dipping e pós-dipping com os produtos e tempos adequados. A organização da capacitação foi realizada ao término da ordenha de todo o lote, juntamente com os funcionários e proprietários da fazenda afim de indicar as observações realizadas (CHASE; ELY; HUTJENS, 2006; DERKS et al., 2014; KILPATRICK, 2000).

Os treinamentos foram realizados em duas etapas, a primeira etapa consistiu numa discussão abordando tópicos relacionados aos efeitos da mastite no leite e no rebanho, limpeza das teteiras e tanque de expansão, o uso de CMT no diagnóstico, entre outros.

Na primeira etapa foram usados meios visuais (gráficos com cores e apresentações em *slides*), sendo que os resultados analíticos dos diferentes pontos de coleta foram apresentados com sugestões e recomendações. A segunda etapa consistiu em práticas demonstrativas, estabelecendo a importância de lavar as mãos antes e depois da ordenha (com *swabs* da superfície das mãos e teteiras), ressaltando as consequências diretas e indiretas para a saúde do rebanho e pessoas da fazenda (CHASE; ELY; HUTJENS, 2006; JANSEN; RENES; LAM, 2010; KILPATRICK, 2000; SURKAR et al., 2014).

Durante os treinamentos, a discussão foi realizada baseando-se nas atividades observadas durante o manejo da ordenha e os problemas apresentados na fazenda (exemplo: animais doentes). Neste momento, a discussão permitiu maior interação entre a equipe treinador e proprietários e funcionários da fazenda, na qual as dúvidas e experiências foram expostas e compartilhadas. Assim, a introdução dos tópicos da capacitação técnica era associada com rotinas próprias da fazenda, procurando elementos que motivassem o produtor (JANSEN; RENES; LAM, 2010; KESHAVARZ, 2013; KILPATRICK, 2000).

Para registro do cumprimento das recomendações dadas durante cada treinamento foi usado o *checklist* das boas práticas apresentado anteriormente (Tabela 3). Também foi registrada a presença dos proprietários e funcionários responsáveis da ordenha nas reuniões de capacitação técnica. A avaliação numérica de ambas informações definiu o nível de comprometimento de proprietários e funcionários na aplicação das BPO, o qual foi considerado um fator essencial para o sucesso nos programas de controle da qualidade das fazendas leiteiras (CROWTHER; HERD; MICHELS, 1993; FAGUNDES et al., 2011; SPEXOTO; OLIVEIRA; OLIVAL, 2005).

5.4 Determinação da qualidade higiênica

5.4.1 Coleta de amostras

Nas fazendas F01, F03 e F04 as amostras foram coletadas na primeira ordenha e apenas na fazenda F02 no período da tarde, da segunda ordenha. Em cada ponto da ordenha e

armazenamento do leite definido anteriormente, foram realizadas as análises microbiológicas para determinar a qualidade higiênica.

Para os parâmetros dos componentes químicos e CCS foram coletadas amostras de leite do tanque de expansão e das vacas individuais. Do tanque de expansão, após homogeneização por 5 minutos, foi coletada uma amostra do leite armazenado da ordenha realizada no momento, com auxílio de concha metálica, desinfetada com álcool 70%; e das vacas foi coletada uma amostra do volume total da ordenha individual. Em ambos casos foram usados frascos coletores estéreis de 40 mL contendo o conservante bronopol e transportados em recipientes isotérmicos com gelo reciclável (CASSOLI; MACHADO; COLDEBELLA, 2010; LINGATHURAI; VELLATHURAI, 2010; MATSUBARA et al., 2011).

As amostras para análises microbiológicas do tanque de expansão foram coletadas de forma similar ao anteriormente descrito, num volume de 500 mL em frasco de vidro esterilizado (SILVA et al., 2010).

Das vacas, foram coletadas amostras de leite compostas. Primeiramente foi realizada a imersão dos tetos em solução desinfetante iodada e realizada a secagem com papel descartável. Depois de uns segundos foram desinfetados novamente com álcool a 70%. Os três primeiros jatos foram descartados e aproximadamente 15 mL de cada teto foram coletados no coletor estéril (MARTINS et al., 2017).

Da superfície externa e interna das teteiras de ordenha e das mãos de ordenhadores foram coletadas amostras usando zaragatoas estéreis (*swabs*) armazenados em tubos contendo 10 mL de solução de água peptonada a 0,1% estéril (Himedia, Índia) (MATSUBARA et al., 2011).

A água foi avaliada mediante amostragem de um volume de 1 litro coletado em frasco estéril de vidro da fonte usada para a ordenha. Desta forma a coleta foi realizada da torneira, mangueira, tanque de armazenamento ou cisterna de água usada em cada propriedade (PERKINS et al., 2009).

As amostras destinadas às análises microbiológicas foram mantidas a temperatura de até 10°C e transportadas ao Laboratório Multiusuário de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP. Em todos os casos,

foram preparadas diluições de 10^{-1} até 10^{-5} em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% estéril, de acordo com a metodologia descrita em Silva et al. (2010) (Figura 3).

Figura 3 - Procedimento de amostragem nos diferentes pontos de coleta, nas fazendas produtoras de leite, estado de São Paulo, 2014.

(a) Coleta do leite do tanque de expansão; (b) Coleta do leite dos quartos de vacas individuais (c) Coleta de amostras da fonte água; (d) Coleta da superfície das teteiras; (e) Coleta das mãos de ordenhadores; (f) Coleta do leite por ordenha de vaca individual.

Fonte: Própria autoria.

5.4.2 Análises de componentes químicos do leite e células somáticas

As análises dos parâmetros de composição química do leite em termos de porcentagem, gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordurosos foram determinados eletronicamente por absorção infravermelha, e as contagens de células somáticas analisadas por citometria de fluxo, realizadas no laboratório da Clínica do Leite, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) (CASSOLI; MACHADO; COLDEBELLA, 2010; DUFOUR et al., 2012).

5.4.3 Teste de *Califórnia Mastites Test* (CMT)

Para analisar o estado de saúde da glândula mamária das vacas, e como parte do desenvolvimento da capacitação técnica foi realizado o teste de CMT em cada fazenda e com todas as vacas a disposição no momento da ordenha. Na metodologia, os tetos foram desinfetados com algodão embebido em álcool ao 70%, secagem dos tetos e descartados os três primeiros jatos. Foram coletados 2 mL de leite dos quartos na raquete de CMT e misturados com o reagente em quantidade similar. O princípio do método indica que o reagente (violeta de bromo cresol) quebra a membrana das células somáticas e a liberação do ácido nucleico forma um gel de viscosidade proporcional ao número de células somáticas (GURLER et al., 2015).

5.4.4 Contagem de microrganismos aeróbios, mesófilos e psicrotróficos

De acordo com metodologia recomendada foi usado o meio Agar Padrão para Contagem (PCA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) para contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos (SILVA et al., 2010). De cada diluição (10^{-1} até 10^{-5}) foram semeados 100 μ L em superfície e por duplicata. No caso dos mesófilos a incubação foi a 35°C por 48h. Para os psicrotróficos a incubação foi a 7°C por 10 dias (ÁLVAREZ et al., 2012; PINTO; MARTINS; VANETTI, 2006; SILVA et al., 2010). A contagem foi realizada com auxílio de contador de colônias manual (Phoenix, Araraquara, Brasil), selecionando placas com 25 a 250 colônias de bactérias. Para o cálculo de unidades formadoras de colônias (UFC), o resultado foi obtido utilizando a fórmula:

$$\text{UFC/mL} = c / d \times v$$

Sendo c o número de colônias na placa contada, d a diluição da placa contada e v o volume inoculado da diluição selecionada.

Para as amostras colhidas o resultado obtido para UFC foi convertido a partir da multiplicação por coeficientes obtidos da razão entre a área amostrada e o volume do diluente. Para conhecimento efetuou-se medição prévia do volumem interno das teteiras (cm³) e área das mãos dos ordenhadores (cm²) de cada propriedade (SILVA et al. 2010).

5.4.5 Contagem de *Staphylococcus* spp.

Foi utilizado o meio de ágar base Baird Parker (Kasvi, Brasil) seletivo, que continha telurito de potássio na composição. O meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C e, em seguida foi resfriado até $56 \pm 5^\circ\text{C}$ e adicionado de gema de ovo na proporção de 5%. De acordo com instruções do fabricante e outros estudos referentes, esta combinação permite a verificação de colônias pretas com halo para a identificação das bactérias estafilococos coagulase positiva (SCP) e coagulase negativa (SCN) (SOUZA et al., 2014; THEAN; SIEW; WAN, 2006).

A semeadura em placa foi por duplicata de 100 uL de amostra de leite, a qual foi espalhada na superfície com auxílio de alça de Digralski e incubada por 48 horas. Para as contagens foram selecionadas as placas com 25 a 250 colônias. Após a obtenção das colônias de microorganismos, para realizar a identificação SCP, foram isoladas 1-2 colônias em 1 ml de médio caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merk) em tubos *ependorf* previamente preparados e posteriormente incubados a 35°C por 12 h. As colônias foram confirmadas como positivas ao formar coágulo com soro de coelho (teste da coagulasse) (GROSCHUP; HAHN; TIMONEY, 1991).

5.4.6 Contagens de *Streptococcus* spp.

Foi usado o meio ágar Edward Modified (Himedia, Brasil) seletivo para o isolamento de estreptococos causadores de mastite bovina que pertencem ao grupo β hemolítico (SANTOS et al., 2007). Para a identificação dos patógenos, o meio continha esculina e violeta cristal (violeta de metila). A esculina é um glicosídeo cuja hidrólise forma esculetina e dextrose, que por reação com sais de ferro presentes no meio, enegrecem as colônias (KRÓL et al., 2015).

Depois de esterilizado em autoclave por 15 minutos e 121°C, o meio foi resfriado a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ e adicionado de sangue estéril de carneiro a 5% e colocado em placas de Petri. Posteriormente, foi realizada a semeadura de 100 μL de amostra por duplicata, espalhada com auxílio de uma alça de Digralski. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. A definição dos resultados foi por identificação das hemólises tipo β , selecionando placas com 20-200 colônias (SILVA et al., 2010).

5.5 Identificação molecular de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

As colônias isoladas de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., foram destinadas à extração de DNA bacteriano através da técnica de choque térmico, de acordo com os procedimentos descritos em pesquisas prévias (CHAPMAN et al., 2001). As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm/g por 10 minutos, para posterior descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* em 100 μL de água MilliQ. O *pellet* ressuspensionado foi incubado em banho-maria seco a 95°C durante 10 minutos e centrifugado. O DNA contido no sobrenadante foi quantificado em espectrofotômetro (Denovix, Delaware, USA) e armazenado a -20°C para posterior utilização.

A identificação genotípica foi efetuada pelo método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com *primers* específicos (Invitrogen, Califórnia, USA) para amplificação dos fragmentos correspondentes. A sequência e tamanhos dos *primers* utilizados, estão disponíveis na Tabela 4.

As amplificações foram conduzidas utilizando-se o kit GoTaq® Colorless Master Mix 2 (Promega, EUA), com 200 ng de DNA, 0,5 μM de cada oligonucleotídeo e água livre de nucleases (GE Healthcare, EUA) q.s.p. 25 μL . As reações foram padronizadas utilizando-se *primers* dos genes *Tuf* e 16S rDNA para *Staphylococcus* spp., e *sodA* para *Streptococcus* spp. Conduzidas em um volume de 50 μL contendo 2,5 μL de tampão de reação 10x, 2,5 mM de MgCl_2 , 50 mM de KCl, 200 μM de dNTP, 0,4 μM de cada primer, 2,5 U de Taq polimerase (Promega, Madison, WI, USA) e 500 ng de DNA em 10 mM Tris HCl (pH 8,3). As amplificações foram efetuadas em reações separadas, utilizando termociclador (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA) programado para um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto;

55°C por 45 segundos; 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos de reação esperados para estes *primers* são fragmentos de 412, 420 e 438 pares de bases (DURAN et al., 2012; HOSHINO; FUJIWARA; KILIAN, 2005; HWANG et al., 2011).

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, após coloração com SybrGold® (Thermo-Fisher, Invitrogen, EUA) e visualizados em transiluminador UV (BioAgency). Os tamanhos dos produtos foram avaliados pela comparação com o padrão de migração eletroforética de um marcador de tamanho molecular de 100 pb (GE Healthcare, EUA).

Tabela 4 - Descrição de *primers* utilizados na PCR para detecção de genes *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Microrganismo	Primer	Sequência (5' → 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>Staphylococcus</i> spp.	Tuf	F: GCCAGT TGAGGACGTATTCT R: CCATTTTCAGTACCTTCTGGTAA	412	Hwang et al. (2011)
<i>Staphylococcus</i> spp.	16S rDNA	F: CAGCTCGTGTCTGTGAGATGT R: AATCATTTGTCCACCTTCG	420	Duran et al. (2012)
<i>Streptococcus</i> spp.	sodA	F: TRCAYCATGAYAARCACCAT * R: ARRTARTAMGCRTGYTCCCARACRTC*	438	Hoshino; Fujiwara e Kilian (2005)

*: I, *inosine*; Y, C or T; R, A or G; K, G or T; M, A or C.

Pares de bases: pb

Fonte: Própria autoria

5.6 Sequenciamento nucleotídeo dos isolados de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Para confirmação das espécies isoladas, as amostras positivas foram purificadas utilizando ExoSAP-IT (USB - Affymetrix). Seguindo as recomendações do fabricante, 2 µL de ExoSAP-IT foram adicionados em 5 µL de produto de PCR, a reação de purificação foi levada ao termociclador a 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos, após essa etapa as amostras foram acondicionadas refrigeradas até o momento do sequenciamento.

Com auxílio de sequenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer 3130 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, EUA) a etapa de sequenciamento foi realizada no Laboratório de

Biologia Molecular e Celular, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, *campus* de Araraquara. As reações de sequenciamento foram conduzidas em volume total de 20 μL , sendo 1 μL de Big Dye Mix (contendo dNTPs, ddNTPs, AmpliTaq DNA polimerase, MgCl_2 e tampão Tris-HCl), 3,5 μL de tampão de sequenciamento 5X, 2 μL de primer 3,2 μM , 2 μL de amostra de DNA e 11,5 μL de água Milli Q autoclavada.

5.7 Análise filogenética dos isolados de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Realizou-se a busca de similaridade das sequências obtidas pelo programa BLAST versão 2.0. A edição e alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas obtidas para o gene de interesse foram realizados com o programa ClustalW versão 1.4 (THOMPSON et al., 1994), implementado no programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.2 (HALL, 1999), utilizando-se, para tanto, dos parâmetros em *default*. Posteriormente, realizaram-se as construções das árvores filogenéticas utilizando-se como padrão, com o programa MEGA7 (HOSHINO; FUJIWARA; KILIAN, 2005).

5.8 Análise dos dados

Os dados foram divididos em quantitativos: CCS, contagem de mesófilos, psicrotróficos, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., e qualitativos: descrição da aplicação das boas práticas de ordenha com capacitação técnica. As contagens microbiológicas obtidas como UFC/mL, UFC/cm² e UFC/cm³ foram transformados em logaritmos de base 10 para sua comparação.

Tanto os dados quantitativos quanto os qualitativos foram tabulados em Excel e comparados em três fases: antes (I), durante (D) e final (F) do estudo e analisados de forma descritiva. Em todos os casos os dados, foram analisados por fazenda individual e no conjunto das quatro fazendas.

A análise estatística dos dados para obtenção das médias, desvio-padrão e a análise de variância (ANOVA) foram realizados pelo pacote estatístico SAS versão 2004, sendo considerados significativos resultados que tiveram o nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Capacitação técnica e manejo das BPO nos sistemas de produção leiteira

As BPO são um guia para os produtores primários da cadeia, afim de que o leite seja produzido por animais saudáveis, de forma sustentável para a economia da fazenda, cuidando da inocuidade para o consumidor e das condições ambientais. A correta implementação das BPO permite uma adequada gestão do risco de contaminação do leite a curto e longo prazo de produção (FAO, 2011; PINHEIRO et al., 2005). No manejo dos rebanhos a FAO (2011) recomenda-se manter infraestruturas (instalações e equipamentos) adequadas para desenvolver o manejo das rotinas de ordenha e respectivos controles, com instalações que protejam aos animais das condições climáticas adversas como a alta umidade ou calor e suas consequências (BARKEMA et al., 2015; FAO, 2011; TOLOSA et al., 2016)

Em seguida são analisadas as modificações realizadas na infraestrutura e no manejo das BPO das fazendas de estudo.

6.1.1 Modificações na infraestrutura durante a capacitação técnica

Em países com ambiente tropical, a sala de espera, anexa à sala de ordenha é, uma área estressante para as vacas em lactação. As referências prévias advertem da espera das vacas confinadas na sala, durante 15 a 60 minutos duas vezes por dia, portanto, o estresse térmico pode ocorrer embora não se têm informação da relação do estresse por calor com a ocorrência das mastites clínica ou subclínica (CORTEZI, 2014; FAO, 2011; PINHEIRO et al., 2005). Mesmo com a importância da área, muitos produtores não consideram sua adequação. Assim, de acordo com Cortezi (2014) trabalhando com fazendas no Sudeste do Estado de São Paulo, apenas 7 das 10 fazendas tinham sala de espera.

No presente estudo, na fase antes, apenas uma fazenda (F01) tinha sala de espera. Mas durante a pesquisa apresentaram modificações, assim, a fazenda F02, adaptou uma cobertura de tela tipo sombrite para diminuir a incidência do sol no rebanho. A fazenda F03 dividiu a sala ordenha que tinha (muito ampla) em duas áreas, deixando um espaço como área de espera, ambas

com cobertura. A fazenda F04, na fase final do estudo, estava por começar a adequação da sala de ordenha com piso de concreto. Assim, na fase final tínhamos 3 fazendas com sala de espera.

Outro elemento básico na infraestrutura recomendado dentro das BPO, é o tanque de expansão, que permite o armazenamento do leite a 4°C até a coleta. A construção com materiais apropriados (não contaminantes para o leite) e termômetro de verificação, permitem que o equipamento trabalhe apropriadamente. Além da construção ser localizada em áreas protegidas dos animais ou pó, deve ser restrita ao acesso público e facilitar a entrada para o tanque coletor de leite (FAO, 2011).

Neste sentido, na fase de antes (I) apenas a fazenda F04 colocava o leite em freezer para resfriamento. Durante o estudo o proprietário focou na implementação do tanque de expansão, dentro de uma área com piso impermeável, instalações básicas adequadas, teto e portas de acesso. As outras fazendas já dispunham do tanque, anteriormente.

Outro ponto da avaliação da infraestrutura foi o sistema de lavagem das teteiras. Na fase de antes (I), a fazenda F04 tinha um sistema manual, enquanto as outras fazendas tinham instalado um sistema de lavagem automática. A contaminação bacteriana (de tipo ambiental) é geralmente devida à manutenção inadequada e falhas na higienização dos equipamentos de ordenha (FAGUNDES et al., 2012). O uso de sistemas automáticos de limpeza é favorável para equipamentos cujo tamanho ou desenho são complexos de limpar manualmente, como no caso das teteiras. A dificuldade de limpeza aumenta quando as borrachas estão velhas.

Hovinen, Aisla e Pyorala (2005), trabalhando com 9 rebanhos leiteiros com sistema de lavagem automática, demonstraram uma vantagem significativa (85,5 versus 79,9%) comparando-se o sistema de lavagem automática de teteiras com o de lavagem manual com escovas. A eficácia da limpeza foi associada com o posicionamento correto, forma e estrutura dos tetos. A forma refere-se ao fato que se deve procurar teteiras que melhor se adaptem ao manejo da fazenda e a forma dos tetos do rebanho.

A água utilizada nas propriedades leiteiras detém grande importância, sendo fundamental para as atividades relacionadas no manejo de ordenha, além de servir como bebida para os animais. A água não tratada pode veicular agentes causadores de mastites, principalmente *S. aureus*, interferindo diretamente na sanidade animal e qualidade do leite. Nas propriedades

envolvidas, a fonte de água utilizada era proveniente de poço artesiano (F01, F03 e F04) e nascente (F02). As nascentes são águas superficiais que podem ser captadas sem nenhum tipo de proteção, e as provenientes de poço artesianos são oriundas da perfuração de aquíferos. Jucimara et al. (2011) reportou que na região do Meio Oeste Catarinense, as fontes de água utilizadas nas propriedades, eram provenientes de nascentes (73%) e poços artesianos (27%). As recomendações de limpeza dadas em torno das fontes de água foram especialmente para as fazendas F01 e F04, as quais apresentaram contagens microbiológicas elevadas. Foi então recomendada a limpeza dos arredores da caixa de água que estavam cobertos de ervas e internamente foi adicionado cloro. As modificações e melhoras de infraestrutura são apresentadas na Tabela 5 e Figura 4.

Tabela 5 - Modificações na infraestrutura, na fase final, das 4 fazendas dentro de estudo.

Descrição	Fazendas			
	F01	F02	F03	F04
Sala ou área de espera /com teto	Sim	Sim	Sim	Não
Refrigeração	Tanque	Tanque	Tanque	Tanque
Sistema de lavagem de teteiras	Automático	Automático	Automático	Automático

Fonte: Própria autoria.

Figura 4 – Modificações na infraestrutura das fazendas

(a)

(b)

(c)

(d)

(a) Área de espera dentro da sala de ordenha; (b) área de espera com sombrite; (c) área para o tanque de expansão e lavagem; (d) sistema de lavagem automático.

Fonte: Própria autoria.

6.1.2 Avaliação das boas práticas de ordenha com capacitação

Na fase de antes do presente estudo, quatorze itens (64%) dos 22 itens definidos para serem avaliados com capacitação técnica estavam sendo cumpridos. (Tabela 6)

Tabela 6 - Avaliação das boas práticas de ordenha por fazenda, na fase antes do estudo.

Descrição		n ⁽¹⁾	Fazendas				Práticas realizadas	
			F01	F02	F03	F04	n	%
(I)	Ordenha	10	6	6	5	7	24/40	60.0
(II)	Higienização	7	5	5	5	3	18/28	64.3
(III)	Registros e outros adicionais	5	4	4	3	3	14/20	70.0
Total itens		22	15	15	13	13	56/88	63.6

(1) número de práticas a avaliar.

No manejo de ordenha todos os proprietários e funcionários de ordenha estimavam visualmente a presença de alterações nos tetos. Em seguida, o teste da caneca era realizado para identificar anormalidades na secreção láctea, como sangue, pus entre outras irregularidades características de mastites clínica. Esta atividade era realizada no chão.

O teste de CMT para o diagnóstico e controle de mastite subclínica não era usado na fase de antes (I). Todos os produtores tinham conhecimento da existência do teste, mas não realizavam dentro da rotina. A capacitação técnica mostrou que o CMT tem a vantagem de ser uma análise de baixo custo, que permite examinar a condição sanitária dos tetos, junto com o rebanho (AWALE et al., 2012; GURLER et al., 2015). Durante o período de estudo foi realizado treinamento aos responsáveis pela ordenha em cada fazenda, e interpretada a sensibilidade pela viscosidade, em vacas com mastites subclínica, verificando o aumento das células somáticas e demonstrando a importância de seu uso. Na fase final do estudo, os mesmos proprietários insistiam em usar o teste nos casos suspeitos. Foi elaborada uma ficha para registro do teste de CMT e entregue em cada fazenda. Com esta informação os proprietários organizavam ao rebanho antes da ordenha.

Na fase de antes do estudo, alguns produtores, porém não todos, observaram a importância de lavar os tetos antes da ordenha. Mesmo se eles estavam muito sujos, os proprietários consideravam apenas fazer uma limpeza com papel descartável. Na explicação da capacitação técnica foi passada a informação da importância de limpar bem os tetos para evitar a transmissão de patógenos. No final da pesquisa, as fazendas F01 e F04 tinham uma melhor

predisposição de lavá-los, mas não foi assim para a fazenda F03, que teve resistência em adotar essa prática. Estes resultados são similares ao reportado por Cortezi (2014), trabalhando em fazendas da região de São Paulo, onde apenas 5 de 10 produtores usavam o pré-dipping e lavavam os tetos antes da ordenha.

O descarte dos primeiros jatos era uma prática que também estava sendo realizada em todas as fazendas desde fase inicial até fase final do estudo. Durante a capacitação técnica, foi explicado aos produtores que esta prática é associada com a redução das contagens de CCS, estimulação da lactação e visualização da saúde dos tetos. O incremento de células somáticas no tanque, por não descartar os jatos, corresponde a 27% (DUFOUR et al., 2012; REYES et al., 2017). De acordo com trabalhos prévios, esta prática é mais frequente em fazendas com ordenha automática do que em fazendas com ordenha manual e a cada ano essa prática vem aumentando nas fazendas. Na Colômbia, 61,9% dos produtores realizam o descarte dos jatos durante a preparação de ordenha e no Canadá 82% dos participantes reportaram a mesma informação (BELAGE et al., 2017; REYES et al., 2017).

Na fase antes, a solução iodada para desinfecção dos tetos na pré-ordenha era usada por todos os produtores exceto na Fazenda F03 que apenas usava o produto após a ordenha. Na capacitação técnica, foi explicado que o uso de desinfetantes no pré-dipping garante que as bactérias sejam removidas, com diminuição da incidência e prevalência de infecções mamárias, especialmente daquelas causadas por *S. aureus*. Durante o estudo, a fazenda F03 incorporou na rotina uma diluição clorada (150 ppm) para desinfecção dos tetos no pré-dipping (AMARAL et al., 2004). A pesquisa de Cortezi (2014) reportou um resultado similar ao encontrado neste estudo, quatro de 10 produtores não usavam iodo no pré-dipping. No Canadá, 33,8% dos 1373 produtores de leite, reportaram não usar desinfetante na pré-ordenha, e os resultados foram significativamente associados ao tamanho do rebanho, sala de ordenha e região ou área do país, de modo que quanto menor a infraestrutura e menor o número de vacas, menor era a frequência de uso (BELAGE et al., 2017).

As novas infecções mamárias dos animais podem ser minimizadas com o uso de luvas durante a ordenha (AZEVEDO et al., 2016; DUFOUR et al., 2012). Uma das falhas observadas na higiene pessoal dos ordenhadores durante a pesquisa foi que eles não tinham o hábito de usar luvas. Segundo Awale et al. (2012), a transmissão de bactérias de animais clinicamente

infectados pode ser evitada. As bactérias se aderem fortemente à pele das mãos, por isso o uso das luvas é importante porque as bactérias não podem aderir-se em luvas de borracha ou de plástico, enquanto que são fortemente aderidas à pele das mãos. No presente estudo nenhuma fazenda adotou esta prática, ainda que foram feitas atividades demonstrativas. No entanto, os proprietários começaram a lavar as mãos com maior frequência no início e após ordenha para cuidar tanto de sua saúde pessoal quanto do rebanho (NICKERSON, 2014). Fagundes et al. (2012) afirmaram que as mãos dos ordenhadores são fonte de contaminação, e que o uso de sabonete pode reduzir a transmissão de bactérias. Cortezi (2014) reportou que depois da capacitação dos ordenhadores, eles adotaram a prática de lavar as mãos com sabonete e com maior frequência.

O esfíncter do teto demora para fechar ao término da ordenha, por isso deve-se manter as vacas em pé, visa a prevenção da mastite subclínica. Hovinen, Aisla, Pyorala, (2005), estimaram visualmente uma redução entre 10-50% do efeito do iodo na desinfecção dos tetos entre as vacas que estavam inquietas durante o pós-dipping. Nas fazendas do estudo as vacas eram mantidas em pé depois da ordenha, com ração suficiente, cumprindo um tempo requerido antes de sair no campo.

A imersão dos tetos em solução desinfetante no pós-dipping era adotada pelas 4 fazendas durante todo o estudo. De acordo com Belage et al. (2017) o desinfetante no pós-dipping é usado pela grande maioria dos produtores de leite (95-97%) e não está associado com o sistema de ordenha, tamanho do rebanho ou células somáticas do tanque de expansão. Este é considerado essencial para evitar a ocorrência de mastites entre os animais (DUFOUR et al., 2012; FAGUNDES et al., 2012; MARTINS et al., 2017).

O papel descartável na limpeza e secagem dos tetos estava sendo usado por todos os produtores nas fazendas envolvidas depois de deixar 30 segundos de contato com o desinfetante. Os resíduos remanescentes eram removidos com papel descartável de serviço único, examinando os tetos para garantir que estivessem limpos antes de colocar as teteiras. Durante a ordenha, se não era realizado o processo descrito, as superfícies dos tetos tornavam-se contaminados com bactérias causadoras de mastite. Embora o uso de papel descartável seja frequentemente adotado na limpeza dos tetos, outros métodos também são reportados (ÁLVAREZ et al., 2012; BELAGE et al., 2017; NICKERSON, 2014). Durante a capacitação técnica, a importância desses processos

foi ressaltada para ser mantida no futuro. Na fase final do estudo, o proprietário da fazenda F04 usava papel exclusivo para o quarto afetado.

A proteção das superfícies das teteiras durante a ordenha das vacas pode ser realizada através da secagem dos tetos antes de colocar as teteiras e deixando para o final da ordenha os animais suspeitos de estar doentes. As superfícies das teteiras podem ser contaminadas com bactérias causadoras de mastites, tanto da vaca anterior (que pode ter mastite) como da próxima vaca. Fagundes et al. (2012) reportaram a importância desta prática para evitar contaminação por enterobactérias. No presente estudo, os resultados demonstraram que todas as fazendas realizam esta prática.

Entre os itens relativos ao controle da limpeza, o detergente alcalino para remoção das gorduras era usado nas 4 fazendas na fase I da pesquisa (VÁSQUEZ et al., 2007). O detergente ácido eficiente para remoção dos resíduos minerais depositados nos equipamentos (FAO, 2011) não era utilizado por nenhum dos proprietários, mas sua adoção ocorreu nas fazendas F01 e F04 durante o estudo. Outra prática a referir, foi o uso de água quente na limpeza de teteiras e equipamentos que se adotou nas fazendas F01, F03 e F04. Mas o uso de sanitizante, para remoção específica de contaminações bacterianas dentro da rotina de limpeza dos equipamentos não foi adotado em nenhuma fazenda (REINEMANN et al., 2003; FAO, 2011).

A função dos detergentes alcalinos é diminuir a tensão superficial dos compostos para suspensão e eliminação de proteínas e gorduras. A alcalinidade da solução é de 250-500 ppm (expresso como Na_2O) para teteiras de ordenha e de 400 ppm para tanques de expansão. A eficácia na limpeza melhora quando a temperatura é aumentada ($>43^\circ\text{C}$), mas é afetada pela dureza da água. Os sanitizantes são passados pelas superfícies interna e externa dos equipamentos da ordenha depois dos detergentes, para eliminar os microrganismos que resistiram aos processos de limpeza prévios. Muitos produtores não usam sanitizantes porque os detergentes já incluíam cloro (detergente alcalino clorado). O conteúdo dos compostos clorados varia de 75 a 200 ppm de NaOCl (hipoclorito de sódio) (REINEMANN et al., 2003; LEITE-JUNIOR et al., 2011).

No armazenamento e eliminação de resíduos, todos os produtores tinham organizado coletores de lixo no curral, na sala de ordenha e em áreas anexas para manter o ambiente e acessos externos limpos. Os resíduos orgânicos se eliminavam com água nos pisos de cimento ou

por recolhimento manual no curral. Na capacitação técnica, foi explicado que a prática aumenta a probabilidade de transmissão de patógenos quando as áreas estão contaminadas (CORTEZI, 2014; FAO, 2011; VÁSQUEZ et al., 2007).

Quanto ao item de dispor de registros de aplicação de vacinas ou tratamento das vacas, as 4 fazendas possuíam informação desde ao iniciar da pesquisa. Apenas foram dadas as recomendações para proteger os documentos da umidade e do tempo (VAARST et al., 2007). Atualmente é obrigatório para os produtores de leite disporem de documentação em caso de venda ou questionamentos por parte dos órgãos competentes. Esta informação foi usada para considerar o uso dos medicamentos nos futuros tratamentos das vacas, verificando as datas de validade e doses aplicadas. O manejo de registros permitiu a análise e desenvolvimento do processo de aprendizagem na fazenda, discussão, atendimento aos tópicos e dúvidas levantadas sobre a melhoria das fazendas participantes (VAARST et al., 2007).

No começo deste estudo, apenas uma fazenda (F01) tinha realizado a análise laboratorial da fonte, enquanto que as demais fazendas não conheciam a qualidade de água que possuíam. No manejo das BPO, várias pesquisas advertiram a importância do controle da água para ter informação da composição química, pH e dureza. Em todas as fazendas era usada a mesma fonte na limpeza dos equipamentos de ordenha e preparação de alimentos. Já que a dureza da água pode ter uma influência significativa na eficácia dos agentes de limpeza, em vez de aumentar o volume dos produtos, a recomendação mais econômica é tratar a água antes de usar na fazenda (REINEMANN et al., 2003; PERKINS et al., 2009).

Baseado nas análises microbiológicas dos pontos de coleta, foram dadas as recomendações para a aplicação das BPO nas fazendas, através da capacitação técnica. A avaliação na fase final do estudo das BPO adotadas, mostraram que as fazendas F01, F03 e F04 acolheram as sugestões em uma porcentagem mais elevada (>82%) do que a fazenda F02 (73%). Na fase antes da pesquisa, entre 13-15 práticas do *checklist* estavam sendo cumpridas no conjunto das fazendas.

Na fase final do estudo, a ordem decrescente das boas práticas adotadas por fazenda foi fazenda F03 e F04 (20 itens), fazenda F03 (18 itens) e fazenda F02 (16 itens), informação apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Boas práticas de ordenha adotadas por fazenda, na fase final de estudo.

Descrição	n ⁽¹⁾	Fazendas				Práticas realizadas	
		F01	F02	F03	F04	n	%
(I) Ordenha	10	9	6	8	9	32/40	80.0
(II) Higienização	7	6	4	5	6	21/28	77.0
(III) Registros e outros adicionais	5	5	4	5	5	19/20	95.0
Total itens	22	20	16	18	20	74/88	84.0

(1) n: Número de itens

Fonte: Própria autoria.

As BPO são uma guia para os produtores de leite, abrangendo aspectos-chave da gestão de fazendas leiteiras, incluindo: saúde animal, higiene do leite, nutrição animal, bem-estar animal, meio ambiente e gestão sócio econômica. Os produtores devem ser capazes de combinar rentabilidade com a responsabilidade de proteger a saúde humana. Embora sejam ferramentas úteis com resultados positivos em pesquisas, nem sempre são adotadas completamente por parte dos produtores (FAO, 2011; JANSEN; RENES; LAM, 2010). Para muitos produtores, a implementação de programas de qualidade é associada a um aumento nos custos de produção (HALASA et al., 2007).

Portanto a literatura em trabalhos prévios adverte sobre a importância de definir medidas de intervenção, prévias a uma capacitação técnica (BELAGE et al., 2017; FAO, 2011; HUIJPS et al., 2010). No trabalho de Huijps et al. (2010), foi demonstrado que das 18 medidas avaliadas no manejo de práticas de ordenha 4 tinham melhor eficácia na prevenção da saúde da glândula mamária.

As análises do conjunto das 4 fazendas mostraram ainda que algumas práticas essenciais da ordenha foram cumpridas no início da capacitação técnica, tais como: uso de papel descartável, desinfecção dos tetos no pós-dipping com solução iodada, uso de detergentes alcalinos na limpeza; outras práticas, porém não eram realizadas e eram necessárias, como o uso de luvas descartáveis e água quente na limpeza de equipamentos.

Da aplicação das boas práticas propostas, na fase final do estudo, em média 19/22 (84%) eram realizadas nas fazendas. Entre as práticas que não foram adotadas em nenhuma fazenda, o uso das luvas e sanitizante. O uso de detergente ácido na limpeza foi adotado por duas fazendas (F01 e F04). O cloro foi usado para limpar as cisternas e caixas de água nas fazendas F01, F03, F04. (Tabela 8).

Tabela 8 – *Checklist* das boas práticas de ordenha adotadas nas 4 fazendas produtoras de leite dentro do estudo, estado de São Paulo, 2014.

Descrição		Realizada	
		Sim	Não
		%	%
(I)	Teste da caneca	100	0
	Uso de CMT	75	25
	Lavagem dos tetos quando necessário	88	13
	Descarte dos primeiros jatos de leite	100	0
	Pré-dipping com solução desinfetante	75	25
	Uso de luvas	0	100
	Lavagem de mãos antes e depois da ordenha	75	25
	Pós-dipping solução desinfetante	100	0
	A vaca permanece em pé (após-ordenha)	100	0
	Uso de papel descartável para secar os tetos	100	0
(II)	Prevenção da contaminação de teteiras	100	0
	Uso de detergente básico	100	0
	Uso de detergente ácido	50	50
	Higienização Uso de sanitizante	0	100
	Uso de água quente	100	0
	Frequência de lavagem de equipamentos e/ou local de o	100	0
	Sistema de coleta de resíduos	100	0
(III)	Registro de vacinas	100	0
	Registros e Registro de vacas doentes	100	0
	outros Tratamentos em vaca seca	100	0
	adicionais Análises de qualidade da fonte de água	75	25
	Registro de modificações na infraestrutura	100	0
Total		84	16

Fonte: Própria autoria

6.1.3 Fatores influenciando na capacitação técnica

No total foram realizadas seis reuniões específicas de capacitação técnica em cada fazenda, em que, além da entrega dos resultados, as recomendações foram apresentadas para todos os presentes (Figura 5). A presença do proprietário e do funcionário foi registrada em cada reunião. Esta informação juntamente com os resultados da aplicação de BPO permitiram quantificar as porcentagens do nível de comprometimento dos produtores de leite.

Os resultados permitem visualizar diferenças entre as fazendas, sendo que a fazenda F04 foi a que apresentou a maior porcentagem 93%, seguido das fazendas F01 e F03 com 88% e 82% respectivamente. No caso da fazenda F02 o resultado foi de 65%. A fazenda F04, além do proprietário assistir as reuniões de capacitação técnica, também foi a que realizou maiores modificações de infraestrutura e manejo das BPO. Na fazenda F01, o proprietário tinha uma boa disposição em melhorar a qualidade da produção, mas na fase antes e na última fase de capacitação, teve que trocar o funcionário responsável pela ordenha. Deste modo, o processo de capacitação iniciado no período de estudo, foi alterado duas vezes durante o estudo. A instabilidade laboral dos funcionários pode afetar negativamente os programas de capacitação técnica já que os processos de treinamento são perdidos.

Na fazenda F03, a presença do proprietário foi permanente, porém o funcionário que ajudava na ordenha não participava continuamente das reuniões de capacitação técnica. O proprietário da fazenda F02 não se apresentou a nenhuma reunião de capacitação técnica e apenas o funcionário responsável pela ordenha recebia a informação. Esta situação pode explicar por que não se apresentaram modificações no manejo das BPO e destaca a importância de manter os proprietários e funcionários de ordenha trabalhado juntos como estratégia para alcançar os objetivos durante os programas de capacitação técnica.

Embora qualquer etapa da cadeia de produção possa ter o risco de contaminação, os produtores de leite são responsáveis diretos por atingir a qualidade do leite cru. O comprometimento com a qualidade é vital em qualquer sistema preventivo bem-sucedido. Se os proprietários das fazendas não estiverem comprometidos e motivados para influenciar o engajamento dos trabalhadores e funcionários, os objetivos das BPO não estarão entre as prioridades das funções cotidianas (ALMEIDA; DOMINGUES; SAMPAIO, 2014; FIRETTI;

RIBEIRO; FRANZOLIN NETO, 2011). Os resultados do nível de comprometimento estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Nível de comprometimento dos produtores de leite das fazendas envolvidas no estudo, durante a aplicação das BPO e, participação nas reuniões de capacitação técnica, 2014.

Fazenda	Descrição	Número de referências totais	n	Comprometimento (%)
F01	Presença em reuniões			
	Proprietário	6	6.00	
	Funcionário	6	4.00	
	Número de práticas avaliadas segundo o checklist	22	20.00	
	Total	34	30.00	88.2
F02	Presença em reuniões			
	Proprietário	6	0.00	
	Funcionário	6	6.00	
	Número de práticas avaliadas segundo o checklist	22	16.00	
	Total	34	22.00	65.0
F03	Presença em reuniões			
	Proprietário	6	6.00	
	Funcionário	6	4.00	
	Número de práticas avaliadas segundo o checklist	22	18.00	
	Total	34	28.00	82.0
F04	Presença em reuniões			
	Proprietário	6	6.00	
	Funcionário	-	-	
	Número de práticas avaliadas segundo o checklist	22	20.00	
	Total	28	26.00	93.0

Número de observações: n

Fonte: Própria autoria

Figura 5 – Reuniões de capacitação técnica, com proprietários e funcionários nas fazendas do estudo, estado de São Paulo, 2014.

(a)

(b)

(a) Reunião com proprietário e funcionários de ordenha b) Uso de meios visuais (*Power Point*, durante as recomendações e capacitação técnica.

Fonte: Própria autoria.

6.2 Condição higiênica da obtenção e armazenamento do leite nas fazendas do estudo

6.2.1 Componentes químicos do leite e BPO.

Considerando os parâmetros de químicos do leite exigidos pela legislação, as porcentagens de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST) e extrato seco desengordurado (ESD) do leite coletado dos tanques de expansão das fazendas F01, F02 e F03 se mantiveram dentro dos índices estabelecidos, durante o estudo (BRASIL, 2011. Apenas na primeira fase a

fazenda F04 manteve o teor de gordura de 2,08% e ESD 10,7 % abaixo da legislação, porém, durante o estudo foram alcançados valores adequados.

A legislação brasileira estabelece um limite máximo de 400.000 cél /mL para CCS, embora os limites legais em nível internacional sejam geralmente mais baixos (BOTARO; GAMEIRO; SANTOS, 2013; BRASIL, 2011). Considerando este limite, a fazenda F01 apresentava na primeira coleta este índice dentro do limite estabelecido, porém, aumentou durante o estudo, finalizando com 609.000 cél/mL. Nesta fazenda, as boas práticas de ordenha e o diagnóstico de mastite faziam parte do manejo do rebanho por parte do proprietário durante o estudo. Porém, as recomendações feitas para os animais com mastite subclínica não eram aplicadas. Dessa forma, acredita-se que este fato tenha impedido a redução da CCS.

As fazendas F02 e F03 apresentaram CCS dentro dos padrões estabelecidos pela legislação. Apenas na última fase houve elevação para 491.000 cél/mL na fazenda F03. Nesta propriedade, as recomendações para controle da mastite subclínica eram adotadas.

A fazenda F04 apresentou uma diminuição da CCS ao longo do estudo. Apenas na fase final houve aumento, excedendo os limites estabelecidos. A causa pode ser atribuída à aquisição de rebanho sem conhecimento certo da saúde do úbere. Assim apesar da alta taxa de adoção das recomendações de boas práticas de ordenha por parte do proprietário, a CCS foi alterada na fase final (Tabela 10).

Tabela 10 - Parâmetros químicos e Contagem de Células Somáticas do leite no tanque de expansão das 4 fazendas do estudo, estado de São Paulo, 2014.

Fazenda	Fase	Parâmetros de químicos e CCS do leite					
		Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	ST (%)	ESD (%)	CCS (1000 cél/mL)
F01	I	3,40	3,24	4,3	11,95	8,55	339
	D	3,34	3,32	4,39	12,09	8,75	654
	F	3,11	3,12	4,54	11,79	8,68	609
F02	I	3,35	2,97	4,45	11,71	8,36	202
	D	3,49	3,20	4,41	12,11	8,62	246
	F	3,36	3,03	4,69	12,06	8,70	159
F03	I	3,71	3,59	4,38	12,69	8,98	368
	D	3,50	3,11	4,57	12,16	8,66	183
	F	3,27	3,19	4,53	11,91	8,64	491
F04	I	2,08	3,14	4,58	10,73	8,65	573
	D	3,32	3,10	4,61	11,99	8,67	194
	F	3,81	2,97	4,51	12,28	8,47	1583

ST: sólidos totais; ESD: extrato seco desengordurado; CCS: contagem de células somáticas.

Fase de estudo: I= antes; D= durante; F= final.

Número de amostras = 6 por fazenda

Fonte: Própria autoria.

No conjunto das 4 fazendas, as análises estatísticas das médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância demonstraram que os parâmetros de composição e células somáticas não apresentaram uma variação significativa durante o desenvolvimento do estudo (Tabela 11).

Durante o estudo, as CCS do se mantiveram dentro do estabelecido, e apenas na fase final a média geral foi de 711.000 cél/mL superior à permitida (BRASIL, 2011). Estes resultados podem ser explicados porque, na fase final do estudo as vacas estavam terminando a etapa de lactação, e o aumento das CCS tinha sido fisiológico. Mas também, na fase final a fazenda F01, F03 e F04 compraram animais que incorporaram a ordenha, assim os resultados das CCS que estavam diminuído gradualmente, foram modificados.

Tabela 11 – Análises estadístico dos parâmetros químicos e Contagem de Células Somáticas do leite no tanque de expansão nas 4 fazendas do estudo, estado de São Paulo, 2014.

Parâmetros	n	Fases						<i>P valor</i>
		I		D		F		
		Média	DS	Média	DS	Média	DS	
Gordura (%)	24	3,14	0,721	3,41	0,235	3,38	0,3000	0,3875
Proteína (%)	24	3,24	0,262	3,18	0,118	3,08	0,096	0,295
Lactose (%)	24	4,43	0,119	4,49	0,133	4,57	0,083	0,304
ST (%)	24	11,77	0,809	12,09	0,247	12,01	0,211	0,340
ESD (%)	24	8,64	0,260	8,68	0,124	8,62	0,105	0,770
CCS (x1.000 cél/mL)		371	153	319	225	711	612	0,094

ST: sólidos totais; ESD: extrato seco desengordurado; CCS: contagem de células somáticas.

Fase de estudo: I= antes; D= durante; F= final

DS: Desvio padrão

P <5% significância

n: número de amostras

Fonte: Própria autoria

Na Figura 6 estão apresentadas as médias das contagens de células somáticas do leite do tanque de expansão, e do leite das vacas selecionadas durante o estudo. As CCS foram mantidas na fase I e D < 400.000 cél/mL e na fase final, foram aumentadas > 700.000 cél /mL. O aumento pode ser explicado por compra de novas vacas em lactação por parte dos proprietários, na fase final. A Figura 6 era utilizada fundamentalmente durante as reuniões de capacitação técnica para demonstrar aos produtores, que as CCS do tanque de expansão podem ser modificadas por leite de vacas doentes, embora 1 ou 2 vacas do lote, tivessem as CCS altas (> 500.000 cél/mL), isso pudesse modificar as CCS do tanque de expansão. Embora resultados superiores (917.000 cél /mL) foram reportados como valor médio do leite do tanque de expansão em 10 propriedades, localizadas no Sudeste do Estado de São Paulo por trabalhos anteriores (CORTEZI, 2014).

Figura 6 - Comparação das médias das contagens de células somáticas (x 1.000 cél/mL) do leite de tanques de expansão e vacas nas 4 fazendas durante o estudo, estado de São Paulo, 2014.

Fase de estudo: I= antes; D= durante; F= final

CCS: contagem de células somáticas

Fonte: Própria autoria

6.3 Contagem de microrganismos em pontos da ordenha e armazenamento do leite

6.3.1 Contagem de mesófilos e psicrotróficos

Em cada fazenda foram contados mesófilos e psicrotróficos nos diferentes pontos de coleta e, para sua comparação, as contagens foram transformadas em log de base 10. Os resultados foram variáveis em todos os pontos de coleta e fazendas. Embora, os produtores adotaram o não, as recomendações dadas em cada reunião de capacitação técnica, outros fatores como as condições do clima podem ter influenciado, especialmente na fase D do estudo, onde as chuvas foram abundantes. Na fazenda F01 apenas as contagens de mesófilos do tanque de expansão diminuíram na fase final em 6,2%. Em relação à contagem de psicrotróficos, os outros pontos de coleta apresentaram variações e aumento no final da fase estudo. As reduções foram observadas no leite do tanque de expansão e as amostras da fonte de água. Na fase antes o leite do tanque apresentava valores acima de 6,78 log UFC/mL e na fase final do estudo foi de 4,48 log UFC/mL. No caso da água na fase I, as contagens foram de 4,48 log UFC/mL e na fase final foi de 1,0 log UFC/mL (Tabela 12).

Tabela 12 – Médias dos logaritmos das contagens de mesófilos e psicrotróficos em leite do tanque de expansão e pontos de coleta do estudo, na fazenda F01, estado de São Paulo, 2014.

Microrganismos	Fase	Pontos de coleta					
		Tanque	Água	MA	MD	TA	TD
		log UFC/mL		log UFC/cm ²		log UFC/cm ³	
Mesófilos	I	6,48	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	D	5,32	2,98	3,09	3,76	3,95	3,71
	F	6,09	1,00	4,21	4,19	5,19	4,31
Psicrotróficos	I	6,78	4,48	1,00	1,00	1,00	1,00
	D	5,27	1,43	1,56	2,02	2,03	1,88
	F	4,48	1,00	1,96	2,23	2,60	2,40

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.

Fase de estudo: I= antes; D= durante; F= final

Fonte: Própria autoria

Na fazenda F02, o leite do tanque de expansão manteve as médias das contagens de mesófilos iniciais similares as contagens da fase final (6,8 log UFC/mL), sem alteração. Nas amostras da fonte de água os valores diminuíram de 4,11 para 3,40 log UFC/mL, verificando-se melhoras na qualidade da fonte de água. Nos outros pontos de coleta, mãos e teteiras as contagens de mesófilos e psicrotróficos permaneceram crescentes até a última fase do estudo. Na fazenda F02, o proprietário da fazenda não participou das reuniões de capacitação técnica, portanto, o funcionário, não se-comprometia com as melhoras e recomendações dadas das BPO (Tabela 13).

Tabela 13 – Médias dos logaritmos das contagens de mesófilos e psicrotróficos em leite do tanque de expansão e pontos de coleta do estudo, na fazenda F02, estado de São Paulo, 2014.

Microrganismos	Fase	Pontos de coleta					
		Tanque	Água	MA	MD	TA	TD
		log UFC/mL		log UFC/cm ²		log UFC/cm ³	
Mesófilos	I	6,78	4,11	1,00	-	1,00	-
	D	5,91	3,67	3,13	3,72	4,37	3,90
	F	6,78	3,40	4,54	3,82	4,77	5,77
Psicrotróficos	I	6,15	3,30	1,00	-	1,00	-
	D	5,29	1,00	2,14	1,07	1,39	1,80
	F	4,48	1,90	2,39	2,14	2,55	2,55

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.

Fase de estudo: I= antes; D= durante; F= final

Fonte: Própria autoria

Na fazenda F03, as médias das contagens de mesófilos do tanque de expansão se mantiveram acima de 5 log UFC/mL. Os outros pontos de coleta, como a fonte de água e mãos antes da ordenha, apresentaram reduções. O proprietário lavava as mãos antes da ordenha, de acordo com as recomendações dadas e os arredores da fonte de água (poço artesiano) foram limpos. No entanto, as contagens de mesófilos das teteiras na fase final apresentaram-se mais elevadas antes da ordenha (5,23 log UFC/mL) do que após a ordenha (3,48 log UFC/mL). Para as contagens de psicotróficos, houve um aumento no tanque de expansão de 1 log UFC/mL (fase inicial) para 3,06 log UFC/mL (fase final) durante o estudo (Tabela 14).

Tabela 14 – Médias dos logaritmos das contagens de mesófilos e psicotróficos em leite do tanque de expansão e pontos de coleta do estudo, na fazenda F03, estado de São Paulo, 2014.

Microrganismos	Fase	Pontos de coleta					
		Tanque	Água	MA	MD	TA	TD
		log UFC/mL		log UFC/cm ²		log UFC/cm ³	
Mesófilos	I	5,59	6,48	3,34	2,79	1,00	3,51
	D	5,69	3,35	3,14	2,44	1,61	1,77
	F	5,83	4,26	1,89	3,67	5,23	3,48
Psicotróficos	I	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	D	2,1	1,18	0,96	1,1	1,4	1,29
	F	3,06	2,35	1,00	0,48	2,78	2,40

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.

Fase de estudo: I= antes; D= durante; F= final

Fonte: Própria autoria

Na fazenda F04, as médias das contagens de mesófilos e psicotróficos dos pontos de coleta como fonte de água, mãos e teteiras foram reduzidos gradualmente durante o estudo. O proprietário desta fazenda adotou as recomendações da capacitação técnica e participou de todas as reuniões. No caso das médias das contagens de mesófilos para o leite do tanque de expansão, (>6 log UFC/mL) foram superiores as contagens reportados por Pinto, Martins, e Vanetti (2006), de 5,26 log UFC/mL, e similares para as contagens de psicotróficos (4,70 log UFC/mL), estes pesquisadores reportaram valores do tanque coletivo de uma indústria de laticínios localizada na Zona da Mata Mineira (Tabela 15).

Tabela 15 – Médias dos logaritmos das contagens de mesófilos e psicrotróficos em leite do tanque de expansão e pontos de coleta do estudo, na fazenda F04, estado de São Paulo, 2014.

Microrganismos	Fase	Pontos de coleta					
		Tanque	Água	MA	MD	TA	TD
		log UFC/mL		log UFC/cm ²		log UFC/cm ³	
Mesófilos	I	6,28	1,00	4,54	2,89	3,33	3,71
	D	6,17	3,00	3,12	3,67	5,84	5,84
	F	6,76	1,00	1,00	2,06	1,00	1,00
Psicrotróficos	I	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	D	2,59	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	F	4,92	1,00	1,49	1,45	1,00	1,00

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.

Fase de estudo: I= antes; D= durante; F= final.

Fonte: Própria autoria.

Para enfatizar o efeito da aplicação das BPO nas populações microbiológicas de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos nas 4 fazendas, foi ressaltada a importância de manter a limpeza, com uso de detergentes adequados, seguindo as concentrações recomendadas por os fabricantes, lavado com água quente das teteiras, e lavado frequente das mãos dos ordenhadores.

As reduções nas populações microbiológicas na fase final do estudo para as 4 fazendas foram, para a fonte de água, mãos antes da ordenha e teteiras antes da ordenha. A participação dos proprietários e funcionários nas reuniões de capacitação técnica, foram fundamentais para a execução e aplicação das recomendações. Porém, os resultados da presente pesquisa em relação a populações de mesófilos no tanque de expansão são similares aos reportados por Kalupaha e Silva-Fletcher (2016), com médias entre 6,41-7,48 log UFC/mL depois do programa de capacitação técnica para veterinários em Siri Lanka. No entanto, Matsubar et al. (2011) reportam valores abaixo de 4,8 log UFC/mL depois de aplicação de um programa de BPO em 4 fazendas em Pernambuco, onde as práticas indicadas foram simples, eficientes e de fácil incorporação na rotina da ordenha. Eles também reportaram contagem de mesófilos de 2,96 log UFC/mL nas teteiras, após a higienização recomendada no programa de capacitação técnica para produtores de leite.

No caso do ponto das amostras da fonte de água, as reduções foram significativas nas contagens de psicotróficos ($P < 0,05$). Segundo Barbano, Ma e Santos (2006), a importância de manter uma baixa população bacteriana de psicotróficos ($4 \log \text{UFC/mL}$) tem um efeito positivo com a estabilidade das enzimas protease e lipase dos produtos lácteos, as quais alteram o tempo de vida de prateleira do leite fluido (Tabela 16).

Tabela 16 - Médias dos logaritmos das contagens de mesófilos e psicotróficos em leite do tanque de expansão e pontos de coleta nas 4 fazendas do estudo, estado de São Paulo, 2014.

Microrganismos	Fase	Pontos de coleta					
		Tanque	Água	MA	MD	TA	TD
		$\log \text{UFC/mL}$		$\log \text{UFC/cm}^2$		$\log \text{UFC/cm}^3$	
Mesófilos	I	6,11	4,52	2,17	1,65	1,00	2,00
	D	5,65	3,33	3,12	3,09	2,88	2,79
	F	6,13	3,23	3,13	3,84	5,11	4,26
	<i>P valor</i>	0,32	0,99	0,37	0,07	0,06	0,73
Psicotróficos	I	3,73	2,45	1,00	1,00	1,00	1,00
	D	3,69	1,19	1,41	1,32	1,55	1,56
	F	3,77	1,90	1,59	1,33	2,68	2,44
	<i>P valor</i>	0,75	0,03*	0,20	0,05	0,06	0,15

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.

Fase de estudo: I= antes; D= durante; F= final

* $P < 0,05$ significância

Fonte: Própria autoria.

6.3.2 Contagem de *Staphylococcus* spp., e *Streptococcus* spp.

As populações de *Staphylococcus* spp. na Fazenda 01 durante o estudo, indica que, mãos antes e depois da ordenha, foram reduzidos a valores $< 2,7 \log \text{UFC/cm}^2$ na fase final. O funcionário lavava as mãos ao fim da ordenha do lote, mas com menor atenção que ao início da ordenha, devido a que ele realizava outras atividades com o rebanho, como levar as vacas até pastagens. No caso das teteiras, as populações *Staphylococcus* spp, foram mantidas entorno de $4 \log \text{UFC/cm}^3$ até fase final, a explicação pode ser, por contaminação no momento da limpeza da sala de ordenha, quando o funcionário, usava água da mangueira com força no chão, até contaminar as teteiras, situação que foi determinada durante a última visita técnica (Figura 7).

Figura 7 - Médias dos logaritmos das contagens de *Staphylococcus* spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F01, estado de São Paulo, 2014.

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.

Fase de estudo: I= antes; D= durante; F= final

Fonte: Própria autoria

De forma semelhante, as populações de *Streptococcus* spp. para tanque de expansão, mãos antes e depois da ordenha e teteiras antes da ordenha apresentavam-se elevados (6,8 log UFC/mL, 6,8 e 4,9 log UFC/cm²; 6,8 log UFC/cm³) e foram reduzidos na fase final (5,9 log UFC/mL; 2,6 e 2,9 log UFC/cm²; 2,8 log UFC/cm³). Para as teteiras depois da ordenha, as contagens foram de 4 log UFC/cm³, talvez pelas as mesmas razões explicadas para as *Staphylococcus* spp., no momento da limpeza da sala de ordenha (Figura 8).

Durante a capacitação das BPO, foram dadas recomendações da lavagem das mãos dos funcionários antes e depois da ordenha. Quanto às teteiras, a recomendação foi o melhoramento dos procedimentos de limpeza, incluindo na rotina de uso da água quente e sanitizante.

Figura 8 - Médias dos logaritmos das contagens de *Streptococcus* spp., em tanque de expansão e pontos do manejo da ordenha na fazenda F01, no estado de São Paulo, 2014.

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.

Fase de estudo: I= antes; D= durante; F= final

Fonte: Própria autoria

Na fazenda F01, as contagens de células somáticas do leite do tanque de expansão foram comparadas com o número de vacas que apresentaram populações de *Staphylococcus* coagulase negativas (SCN), *Staphylococcus* positivas (SCP), e *Streptococcus* spp. Nesta fazenda, 20% das vacas avaliadas durante o estudo, apresentaram populações de SCP, a maior porcentagem em comparação com as outras fazendas envolvidas. As SCP foram isoladas na fase (I) de estudo e o proprietário manteve as vacas até o fim de lactação, para aplicar o tratamento recomendado (Tabela 17).

Estes resultados indicam o alto risco de mastite clínica no rebanho e baixa qualidade de leite no parâmetro das contagens de células somáticas (CCS >500.000 cél/mL) que aumentavam no tanque de expansão durante o desenvolvimento do estudo, embora o proprietário da fazenda F01 tenha adotado outras recomendações de BPO e comparecido as reuniões de capacitação técnica.

Tabela 17 - Ocorrência de SCN, SCP e *Streptococcus* spp., em amostras de leite de vacas individuais e tanques de expansão da fazenda F01, no estado de São Paulo, 2014.

Fase	Número de animais totais avaliados	Microrganismos				
		SCN		SCP		<i>Streptococcus</i> spp.
		Número de animais	log UFC/mL	Número de animais	Número de animais	log UFC/mL
I	5	0	0,0	2	2	4,8
D	20	5	4,6	8	0	0,0
F	5	2	4,5	2	0	0,0

Fase de estudo: I= antes; D= durante; F= final

Fonte: Própria autoria

Na fazenda F02, as populações de *Staphylococcus* spp. no leite do tanque de expansão mantiveram-se maiores a 6 log UFC/mL na fase I e final do estudo, e nos outros pontos de coleta, apresentaram populações < 5,4 log UFC/ ml, a razão pode ser, que as vacas em lactação tinham populações aumentadas de *Staphylococcus* spp em comparação com os outros pontos de coleta (Figura 9).

Figura 9 - Médias dos logaritmos das contagens de *Staphylococcus* spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F02, estado de São Paulo, 2014.

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.

Fase de estudo I= antes; D= durante; F= final.

Fonte: Própria autoria

Igualmente, com respeito as populações de *Streptococcus* spp, no leite do tanque de expansão foram elevadas (6,7 log UFC/mL) na fase de antes e final do estudo. Com exceção das populações na fonte água que foram reduzidas de 4,5 log UFC/mL, na fase I, até 0,0 log/ml na fase final, os outros pontos de coleta não apresentaram variações das populações de *Streptococcus* spp. A razão pode ser que, o proprietário não acompanhava nas reuniões de capacitação técnica para motivar a aplicação das recomendações de BPO (Figura 10).

Figura 10 - Médias dos logaritmos das contagens de *Streptococcus* spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F02, estado de São Paulo, 2014.

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.

Fase de estudo I= antes; D= durante; F= final.

Fonte: Própria autoria

Na fazenda F02, 26% das vacas examinadas durante a ordenha apresentaram populações de SCN. Nenhum animal foi detectado com populações de SCP, durante o estudo. Apenas uma vaca foi detectada positiva para *Streptococcus* spp., na fase final. As contagens de células somáticas do leite do tanque de expansão sempre se mantiveram dentro dos valores da legislação (Tabela 18) (BRASIL, 2011).

Tabela 18 - Ocorrência de SCN, SCP e *Streptococcus* spp., em amostras de leite de vacas individuais e tanques de expansão da fazenda F02, no estado de São Paulo, 2014.

Fase	Número de animais totais avaliados	Microrganismos				
		SCN		SCP		<i>Streptococcus</i> spp.
		Número de animais	log UFC/mL	Número de animais	Número de animais	log UFC/mL
I	5	2	0	0	0	4,8
D	20	2	4,6	0	0	0
F	5	4	4,5	0	1	0

Fase de estudo I= antes; D= durante; F= final.

Fonte: Própria autoria.

Na fazenda F03 as populações de *Staphylococcus* spp., do leite do tanque de expansão se mantiveram em 4,8 log UFC/mL na fase final do estudo, embora na fase I não foram detectadas. Nos outros pontos de coleta, as populações *Staphylococcus* spp foram também entorno deste valor tanto na fase I como na fase final. Durante o processo de capacitação técnica, o proprietário da fazenda adotou a lavagem das mãos antes da ordenha, mas, não concordou com o uso das luvas para realizar a ordenha (Figura 11).

Figura 11 - Médias dos logaritmos das contagens de *Staphylococcus* spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F03, estado de São Paulo, 2014.

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.

Fase de estudo I= antes; D= durante; F= final.

Fonte: Própria autoria.

As populações de *Streptococcus* spp., apresentaram-se de forma similar as populações de *Staphylococcus* spp no tanque de expansão, (5,5 log UFC/mL) sem variação durante o estudo.

Nos outros pontos de coleta, as populações de *Streptococcus* spp. foram menores ao valor do tanque de expansão, o que indica que o rebanho tinha populações de *Streptococcus* spp. (Figura 12).

Figura 12 - Médias dos logaritmos das contagens de *Streptococcus* spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F03, estado de São Paulo, 2014.

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.

Fase de estudo I= antes; D= durante; F= final.

Fonte: Própria autoria

Com base nos resultados obtidos da avaliação microbiológica do leite de vacas individuais da fazenda F03, observaram-se populações de SCP em 16,7% dos animais. Também foram determinadas vacas positivas para as populações SCN e *Streptococcus* spp. durante o estudo, o que pode ter influenciado no aumento das contagens de células somáticas do leite do tanque de armazenamento, devido a que, entre as populações de *Streptococcus* spp, poderiam encontrar-se espécies do grupo B (causadoras de mastites), como reportaram pesquisas prévias em fazendas leiteiras da região de São Paulo (AWALE et al., 2012; FAGUNDES et al., 2012) (Tabela 19).

Tabela 19 - Ocorrência de SCN, SCP e *Streptococcus* spp., em amostras de leite de vacas individuais e tanques de expansão da fazenda F03, no estado de São Paulo, 2014.

Fase	Número de animais totais avaliados	Microrganismos				
		SCN		SCP	<i>Streptococcus</i> spp.	
		Número de animais	log UFC/mL	Número de animais	Número de animais	log UFC/mL
I	5	0	0,0	1	0	4,8
D	20	13	4,6	3	8	0,0
F	5	4	4,5	1	5	0,0

Fase de estudo I= antes; D= durante; F= final.

Fonte: Própria autoria.

Na fazenda F04, as populações de *Staphylococcus* spp. isoladas na fase I, foram reduzidas gradualmente em todos os pontos de coleta. O proprietário participou das reuniões de capacitação técnica e aplicava as recomendações de limpeza dos equipamentos de ordenha, de tratamentos das vacas e, controle da saúde do rebanho (Figura 13).

Figura 13 - Médias dos logaritmos das contagens de *Staphylococcus* spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F04, estado de São Paulo, 2014.

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.

Fase de estudo I= antes; D= durante; F= final.

Fonte: Própria autoria.

Resultados similares as populações de *Staphylococcus* spp foram obtidos para as populações de *Streptococcus* spp., que foram reduzidos no tanque de expansão (Figura 14).

Figura 14 - Médias dos logaritmos das contagens de *Streptococcus* spp., em amostras de leite do tanque de expansão e pontos de coleta na fazenda F04, estado de São Paulo, 2014.

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.

Fase de estudo I= antes; D= durante; F= final.

Fonte: Própria autoria.

Devido às altas populações *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp isoladas nas teteiras na fase I, a recomendação foi comprar um sistema de lavagem automático que melhorara a limpeza. Nesta fazenda o proprietário era o único responsável pela ordenha e tinha preocupação de outras atividades também, o que interferiu nas populações de *Streptococcus* spp. das mãos depois da ordenha que foram reduzidas apenas em 1 log na fase final do estudo. Algumas recomendações e BPO dadas nas reuniões de capacitação técnica foram aplicadas, mas não houve aceitação da utilização de luvas para o manejo da ordenha.

Na avaliação microbiológica das vacas, não foram detectadas SCP durante o estudo. No entanto, houve vacas positivas para as populações de SCN e *Streptococcus* spp. A contagem de células somáticas no tanque de expansão na fase final, foi superior aos limites permitidos > 1000 CCS /mL, talvez do leite de vacas recentemente compradas para o rebanho da fazenda (Tabela 20).

Tabela 20 – Ocorrência de SCN, SCP e *Streptococcus* spp., em amostras de leite de vacas individuais e tanques de expansão da fazenda F04, no estado de São Paulo, 2014.

Fase	Número de animais totais avaliados	Microrganismos				
		SCN		SCP		Streptococcus spp.
		Número de animais	log UFC/mL	Número de animais	Número de animais	log UFC/mL
I	5	2	0	0	0	4,8
D	20	2	4,6	0	0	0
F	5	4	4,5	0	1	0

Fase de estudo I= antes; D= durante; F= final.

Fonte: Própria autoria

Na avaliação geral das 4 fazendas as populações de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. mostraram-se elevadas para mãos e teteiras antes da ordenha. Como reportaram pesquisas precedentes, as mãos dos ordenadores e equipamentos podem ser fontes de transmissão de patógenos contagiosos dos quartos infectados (AZEVEDO et al., 2016; DUFOUR et al., 2012; FAGUNDES et al., 2011). Fagundes et al. (2011), ao avaliarem as práticas de ordenha em 42 fazendas leiteiras da região de São Paulo, reportaram *S. aureus* com maior frequência (24%) nos animais, das propriedades onde os ordenhadores não usavam luvas descartáveis. Estes resultados foram semelhantes ao reportado por Cortezi (2014) que trabalhou com 10 fazendas leiteiras também localizadas no sudeste do Estado de São Paulo, em que apenas o funcionário de uma fazenda usava luvas durante a ordenha e a presença de *S. aureus* no rebanho foi de 57,1%. Na presente pesquisa, com relação ao cuidado das mãos dos funcionários durante o manejo da ordenha, nenhuma das 4 fazendas adotaram o uso das luvas, mas eles aceitaram a lavagem das mãos com maior frequência durante o processo de capacitação técnica. Com relação à presença de SCP no rebanho, a média geral foi de 14,2%.

Na fase final do estudo, os funcionários e proprietários das 4 fazendas avaliadas, deram maior importância a lavar as mãos antes da ordenha que no final da ordenha (exemplo usando menos tempo e menos sabonete). Importante ressaltar que depois da ordenha, os proprietários e funcionários continuavam realizando outras atividades com o rebanho, fator que pode justificar que, as populações de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. das mãos depois da ordenha não terem reduzido.

Durante o processo da capacitação técnica, enfatizou-se a importância da limpeza e sanitização das teteiras, principalmente após uso com vacas doentes. A introdução de zaragotas no protocolo de verificação de limpeza das teteiras, foi ferramenta fundamental para visualizar as impurezas mantidas no interior das teteiras depois da lavagem.

No caso da avaliação de amostras da fonte de água, apenas a fazenda (F02) apresentou populações iniciais para *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. com posterior redução das mesmas. As outras fazendas não apresentaram populações de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Nas amostras de leite do tanque de expansão, as CCS foram elevadas em todas as propriedades analisadas ao longo do estudo. As fazendas F01 e F03 apresentaram SCN e SCP no rebanho. Azevedo et al. (2016), ao avaliarem o grau de contaminação por *Staphylococcus* spp. no leite proveniente de tanques de expansão e as práticas de ordenha em fazendas leiteiras de São Miguel de Azores em Portugal, observaram uma relação significativa ($P < 0,01$) entre rebanhos positivos para *S. aureus* e as contagens elevadas de células somáticas. Na pesquisa 72% das vacas positivas a *S. aureus*, tinham contagens de células somáticas entre 250.000-400.000 cél /mL.

6.4 Identificação molecular de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

As análises por PCR foram realizadas com intuito de identificar as bactérias dos gêneros *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. encontradas nas amostras coletadas durante o estudo. Desta forma, avaliar a circulação dos isolados nas mãos dos ordenhadores, teteiras, água, leite e vacas. Para aperfeiçoar a reação de PCR, foi necessário testar diferentes temperaturas de anelamento, sendo que para as amplificações dos genes *Tuf* e 16S *rDNA* a temperatura apropriada foi de 55°C.

Para identificação genética das espécies, foram selecionadas aleatoriamente 50 amostras positivas para *Staphylococcus* spp. e 24 amostras para *Streptococcus* spp. A seleção das amostras teve por objetivo obter informações das espécies envolvidas nos pontos de coleta e etapas do estudo. Para os isolados de *Staphylococcus* spp foram identificados com o gene *Tuf* 76% (16/21) dos isolados e, com o gene 16S *rDNA* 81% (17/21). Para *Streptococcus* spp. a identificação ocorreu pelo gene *sodA* o 75% dos isolados selecionados (18/24).

Foram determinados os tamanhos dos produtos esperados pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,5% após coloração com SybrGold®. Para confirmação da reação, utilizou-se como controle positivo uma cepa de referência para *Staphylococcus* spp., e *Streptococcus* spp., água livre de DNA como controle negativo e um marcador de 100 pb. Os geles de agarose foram usados para a identificação dos fragmentos 412 pb (*Tuf*), 420 pb (16S *rDNA*) e 438 pb (*sodA*). (Figuras 15, 16 e 17).

Figura 15 - Fragmentos de 412 pb observados nos isolados de *Staphylococcus* spp., a partir da reação de PCR, após eletroforese em gel de agarose 1,5% .

(1) marcador 100 pb; (2) controle positivo; (3,4,6,7,8,9) amostras identificadas como positivas para o gene *Tuf* (412 pb) e (9) controle negativo.

Fonte: Própria autoria.

Figura 16 - Fragmentos de 420 pb observados nos isolados de *Staphylococcus* spp., a partir da reação de PCR, após eletroforese em gel de agarose 1,5%.

(1) marcador de 100pb; (2) controle positivo; (4,5,6,8,9) amostras identificadas como positivas para gene 16S *rDNA* (420 pb); (10) controle negativo.

Fonte: Própria autoria.

Figura 17 - Fragmentos de 438 pb observados nos isolados de *Streptococcus* spp., a partir da reação de PCR, após eletroforese em gel de agarose 1,5%

(1) marcador de 100 pb; (2) controle positivo; (3 e 4) amostras identificadas como positivas para gene *sodA* (438 pb); (5) controle negativo.

Fonte: Própria autoria.

6.4.1 Sequenciamento para *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

No sequenciamento nucleotídico para confirmar as espécies de interesse foram usadas as sequências *forward* e *reverse* conjuntamente. Para *Staphylococcus* spp., os fragmentos dos genes *Tuf*, e 16S *rDNA* foram sequenciados das amostras coletadas (Tabela 21).

Santos e Fonseca (2007), afirmaram que os estafilococos coagulase negativo fazem parte da microbiota da pele do teto das vacas e podem indicar contaminação do momento da coleta ou infecção da glândula mamária, sendo causa de infecções mamárias em 10 a 20% dos quartos infectados.

Durante as últimas duas décadas estafilococos coagulase negativo têm sido considerados microrganismos emergentes em fazendas. As falhas no manejo e controles mais eficientes são importantes para evitar e/ou diminuir a disseminação de microrganismos causadores de graves doenças em humanos e em animais, que podem ser transmitidas através do leite.

Para confirmação do resultado obtido pelo sequenciamento, utilizou-se para comparação, as sequências similares de *Staphylococcus* spp., contidas no GenBank da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e foram identificadas diferentes espécies de *Staphylococcus* spp. nas amostras do leite do tanque de expansão, mãos dos funcionários, fonte de água e mãos dos funcionários durante o estudo. demonstrando que os controles de limpeza e sanitização são essenciais durante a ordenha e devem ser mantidos para reduzir a transferência bacteriana através dos processos de capacitação técnica. (Tabela 21).

Tabela 21 –Espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas em amostras dos pontos de coleta, das 4 fazendas produtoras de leite dentro do estudo, estado de São Paulo, 2014

Gene	Fazenda	Fase coleta	Ponto de coleta	Microrganismo	Porcentagem de similaridade (1)
Tuf	F01	I	Tanque	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99
16S	F01	I	Tanque	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	99
Tuf	F01	I	vaca	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	99
Tuf	F01	D	vaca	<i>Bacillus cereus</i>	99
16S	F01	D	vaca	<i>Bacillus badius</i> strain CFR198M	99
Tuf	F01	D	vaca	<i>Staphylococcus</i> sp. AOAB	87
16S	F02	I	MA	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
16S	F02	I	vaca	<i>Staphylococcus</i> sp. strain 71410	100
Tuf	F02	I	vaca	<i>Macroccus caseolyticus</i>	100
16S	F02	D	vaca	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain ATCC	99
Tuf	F02	D	vaca	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98
16S	F02	F	Água	<i>Staphylococcus sciuri</i> 16s	100
16S	F02	F	Tanque	<i>Staphylococcus lentus</i> 16s	100
16S	F02	F	vaca	<i>Staphylococcus pasteurii</i> strain A17	100
16S	F02	F	vaca	<i>Staphylococcus pasteurii</i> strain A17	100
Tuf	F02	F	Água	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99
Tuf	F02	F	Tanque	<i>Staphylococcus sciuri</i>	97
16S	F03	I	vaca	<i>Macroccus caseolyticus</i>	100
Tuf	F03	I	MA	<i>Staphylococcus capitis</i>	99
Tuf	F03	I	vaca	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	99
16S	F03	D	vaca	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	100
Tuf	F03	D	vaca	<i>Staphylococcus chromogenes</i> ATCC	99
16S	F04	I	Tanque	<i>Staphylococcus sciuri</i>	91
16S	F04	I	vaca	<i>Staphylococcus</i> sp. mutant XU1	100
Tuf	F04	I	vaca	<i>Staphylococcus warneri</i>	99
Tuf	F04	I	vaca	<i>Staphylococcus chromogenes</i> ATCC	99
16S	F04	I	MA	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	100
16S	F04	D	vaca	<i>Staphylococcus capitis</i>	99
Tuf	F04	D	vaca	<i>Enterococcus faecium</i>	99
Tuf	F04	D	vaca	<i>Macroccus caseolyticus</i>	100
16S	F04	D	MA	<i>Staphylococcus succinus</i>	99
16S	F04	F	Tanque	<i>Enterococcus faecium</i>	99
Tuf	F04	F	MA	<i>Staphylococcus fleurettii</i>	88

(1) Comparação com sequências de referência (*GeneBank*)

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; Vaca: leite de vacas individuais; Água: amostra da fonte de água.

Fase de estudo I= antes; D= durante; F= final.

Fonte: Própria autoria

Para confirmação do resultado obtido pelo sequenciamento, utilizou-se para comparação, as sequências similares de *Streptococcus* spp., contidas no GeneBank da NCBI. Foram identificadas diferentes espécies de *Streptococcus* spp. nas amostras do leite do tanque de expansão, mãos dos funcionários e superfície de teteiras, durante o estudo (Tabela 22).

Tabela 22 - Espécies de *Streptococcus* spp. isoladas em amostras dos pontos de coleta, das 4 fazendas produtoras de leite dentro do estudo, estado de São Paulo, 2014.

Gene	Fazenda	Fase de coleta	Ponto de coleta	Microrganismo	Porcentagem de similaridade (1)
SodA	F01	I	Tanque	<i>Enterococcus faecalis</i>	99
SodA	F01	I	MA	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	78
SodA	F01	I	TA	<i>Enterobacter cloacae</i>	99
SodA	F01	D	MA	<i>Enterococcus</i> spp.	99
SodA	F01	F	Tanque	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	99
SodA	F02	D	Tanque	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. equisimilis partial	79
SodA	F02	D	MA	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	98
SodA	F02	D	TA	<i>Staphylococcus massiliensis</i> strain CCUG 55927 superoxide dismutase	77
SodA	F02	F	MA	<i>Enterococcus saccharolyticus</i> partial	99
SodA	F02	F	TA	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. equisimilis partial	74
SodA	F03	I	Tanque	<i>Lactococcus garvieae</i> partial	96
SodA	F03	D	Tanque	<i>Staphylococcus</i> spp AOAB	83
SodA	F03	D	MA	<i>Aerococcus urinaeequi</i>	98
SodA	F03	D	vaca	<i>Streptococcus uberis</i>	99
SodA	F03	F	TA	<i>Staphylococcus</i> spp. AOAB	83
SodA	F04	I	Tanque	<i>Staphylococcus massiliensis</i>	77
SodA	F04	I	MA	<i>Staphylococcus epidermidis</i> superoxide dismutase	82
SodA	F04	D	MD	<i>Streptococcus pyogenes</i>	84

(1) Comparação com sequências de referência (GeneBank)

Tanque: leite do tanque de expansão; MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; Vaca: leite de vacas individuais.

Fase de estudo I= antes; D= durante; F= final.

Fonte: Própria autoria.

A Figura 18 apresenta o número de amostras que foram identificadas com os genes *Tuf*, 16S *rDNA* e *sodA*, nos diferentes pontos de coleta. Os genes *Tuf* e 16S *rDNA* permitiram a identificação de espécies de *Staphylococcus* spp., em amostras de leite de vacas individuais, em

similar frequência (45 e 55%), leite do tanque de expansão, fonte de água e mãos dos funcionários. O gene *sodA* foi importante na identificação de *Streptococcus* spp., em amostras do leite em tanque de expansão, mãos dos funcionários e superfícies de teteiras.

Figura 18 - Número de amostras nas quais foram identificadas espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus* por pontos de coleta, das fazendas produtoras de leite dentro do estudo, com uso dos genes *Tuf*, *sodA* e 16S *rDNA*, no estado de São Paulo, 2014.

Pontos de coleta: MA: mão antes; MD: mão depois; TA: Teteiras antes; TD: Teteiras depois.
Vaca: amostras de leite de vacas individuais.

n: Número de amostras

Fonte: Própria autoria.

No presente estudo com uso dos marcadores *Tuf* e 16S *rDNA* foram identificadas 18 espécies de estafilococos coagulase negativos principalmente isolados em amostras de leite de vacas individuais e tanques de expansão, dos quais *Staphylococcus chromogenes* foram os mais frequentes (27,8%), seguidos de *Staphylococcus schleiferi* e *Staphylococcus sciuri* (16,7%), *S. epidermidis* e *Macroccus caseolyticus* (11,1%).

Estudos prévios reportam que diferentes espécies de ECN foram isoladas de rebanhos leiteiros, sendo os mais envolvidos nos casos de mastite, *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. haemolyticus* e *S. simulans* (BABA et al., 2009; CERVINKOVA et al., 2013; HWANG et al., 2011). Enquanto que em quartos afetados ou com reação inflamatória, persistentemente entre as espécies mais isoladas estavam *S. chromogenes*, *S. epidermidis* e *S. simulans*.

(VISSCHER et al., 2017; XU et al., 2015).

Thorberg et al. (2009) reportaram que *Staphylococcus chromogenes* parece estar bem adaptado ao úbere por ser isolado do canal do teto e da pele, sendo mais diagnosticado em amostras de leite de vacas de primeiro parto do que em, amostras de leite de vacas mais velhas, enquanto que *S. epidermidis* foi encontrado principalmente em vacas mais velhas. Cerkvinkova et al. (2013) reportaram a presença de *S. epidermidis* em 5,2% num total de 358 amostras de vacas leiteiras aparentemente saudáveis. Da mesma forma, *Staphylococcus warneri*, também classificado como SCN, foi isolado tanto na pele dos animais saudáveis como doentes (THORBERG et al., 2009).

Macroccus são microrganismos Gram positivos que podem ser isolados da pele de animais, leite e carne, habitats ricos em nutrientes. São poucas as pesquisas realizadas com os *Macroccus* e se conhece que são bactérias que não causam doenças em animais ou humanos. Estudos de relação filogenética revelaram a similaridade entre *Staphylococcus spp.* e *M. caseolyticus*, sendo esta última considerada uma bactéria ancestral com certa associação a genes de resistência de antibióticos (BABA et al., 2009).

No presente estudo foram identificadas *Staphylococcus chromogenes*, *Macroccus* e *Staphylococcus epidermidis* principalmente em amostras de leite de vacas individuais e dos tanques de expansão das fazendas do estudo, portanto, a realização de BPO que contribuam à reduzir a incidência de mastite nos rebanhos (desinfecção do tetos, uso de luvas, controle de limpeza em teteiras, entre outras) são justificadas.

Entre as sequencias dos isolados, das amostras coletadas no presente estudo e aquelas derivadas do GeneBank pela grande similaridade (89%) foram identificadas espécies de *Streptococcus* com frequência variável, assim *S. dysgalactiae* (44%) e *Enterococcus* (36,4%), foram as mais frequentes, e *S. pyogenes*, *S. uberis* menos frequentes (9,1%), espécies de *Streptococcus* que são encontradas na maioria dos rebanhos leiteiros.

De acordo com pesquisas referentes à diferenciação de espécies do *S. dysgalactiae* (frequentes na mastite bovina) fatores de virulência que incluem proteínas de superfície (CHARAYA et al., 2015; XU et al., 2015). São importantes a espécie *S. dysgalactiae* e *S. dysgalactiae* subsp. *Equisimilis* identificadas em vacas leiteiras das fazendas do estudo tem sido

reportada com alta similaridade genética em pesquisas prévias, e são apenas diferenciadas pelo tipo de hemólise (SANTOS et al., 2007). No presente estudo, os mesmos foram identificados em amostras do leite do tanque de expansão e leite de vacas individuais.

A presença de *Enterococcus* spp. sugere deficiência nas condições higiênico-sanitárias, porque são bactérias mais frequentemente detectadas no trato gastrointestinal humano e de vários outros animais, além de estarem distribuídos na natureza, em plantas, solos, vegetais, águas (PERKINS et al., 2009; VÁSQUEZ et al., 2007). O uso de *Enterococcus* spp. como indicador de higiene e contaminação fecal pode ser interessante por poder indicar o uso de água contaminada, utilizada para lavar os tetos dos animais antes da ordenha, podendo facilmente contaminar a glândula mamária. A presença destas bactérias reflete deficiência do manejo higiênico (de mãos ou equipamentos) e alta exposição do leite ao material fecal (VANCANNEYT et al., 2002; VÁSQUEZ et al., 2007). Além disso, bactérias desse gênero apresentam uma alta capacidade de adquirir e transferir genes de resistência a antibióticos de uso clínico (VANCANNEYT et al., 2002). No presente estudo, foram identificados *Enterococcus* spp. em amostras de leite do tanque, superfície de teteiras e mãos dos ordenhadores das fazendas.

6.4.2 Estudo filogenético

Foram realizadas sucessivas edições e alinhamentos dos sequenciamentos com o programa ClustalW, implementado no programa BioEdit para que fosse possível a construção de árvores filogenéticas conduzido pelo programa MEGA versão 7, utilizando-se o modelo Kimura de dois parâmetros (CHAPMAN et al., 2001; MEMON et al., 2010). De acordo Hoshino, Fujimara e Kilian (2005), a partir de informações encontradas em grandes bases de dados é admissível inferir filogenias utilizando-se dados como características e distâncias, relativos aos genes de cada espécie (VIANA, 2007).

Características são as peculiaridades que cada espécie possui, sendo possível obter relações entre eles com base na similaridade destas peculiaridades. As distâncias demonstraram as diferenças relativas do tempo de evolução entre as espécies, de maneira que sua grandeza indica se as linhagens serão dispostas na árvore em ramificações próximas ou distantes (VIANA, 2007).

A reconstrução filogenética para confirmação dos microrganismos obtidos, nos resultados através de sequenciamento nucleotídico foi inferida utilizando-se o método *Unweighted Pair*

Group Method with Arithmetic (UPGMA) segundo a recomendação dos artigos de referencia (HOSHINO; FUJIWARA; KILIAN, 2005; MEMON et al., 2010; SHOME et al., 2012).

A árvore ideal para o gene *Tuf* possui a soma de comprimento do ramo = 1.74904397. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de ramificação nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas foram usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura dois parâmetros (KIMURA, 1980; SRIVATHSAN; RUDDLIF, 2012), tendo como unidade o número de substituições de base por local. A análise envolveu 33 sequências nucleotídicas. Todas as posições com lacunas e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 343 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no programa MEGA7 3 (KUMAR et al., 2016) (Figura 19).

De maneira similar, a árvore ideal para o gene 16S *rDNA*, possui a soma de comprimento do ramo =1,76581289. A análise envolveu 34 sequências nucleotídicas. Todas as posições com lacunas e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 70 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no programa MEGA7 (KUMAR et al., 2016) (Figura 20).

A árvore ideal para o gene *sodA*, possui a soma de comprimento do ramo =1,76561236. A análise envolveu 36 sequências nucleotídicas. Todas as posições com lacunas e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 320 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas no programa MEGA7 (KUMAR et al., 2016) (Figura 21).

Figura 19 - Reconstrução filogenética pelo método UPGMA a partir de sequências parciais de nucleotídeos do gene *Tuf* obtidas das amostras *Staphylococcus* spp., isoladas no presente estudo e outras do GeneBank, 2014.

Fonte: Imagem do autor

Figura 20 - Reconstrução filogenética pelo método UPGMA a partir de sequências parciais de nucleotídeos do gene 16S *rDNA* obtidas das amostras *Staphylococcus* spp., isoladas no presente estudo e outras do GeneBank.

Fonte: Própria autoria

Figura 21 – Reconstrução filogenética pelo método UPGMA a partir de sequências parciais de nucleotídeos do gene *sodA* obtidas das amostras *Streptococcus* spp., isoladas no presente estudo e outras do GeneBank.

Fonte: Própria autoria

7 CONCLUSÃO

As análises dos sistemas de produção mostraram que se algumas práticas essenciais da ordenha eram bem cumpridas ao início da capacitação técnica, outras práticas também efetivas não eram realizadas.

A presença de proprietários e funcionários nas reuniões de capacitação técnica pode ser uma estratégia para o envolvimento e motivação para alcançar os objetivos das BPO. A estabilidade laboral favorece que os processos tenham continuidade e não sejam perdidos. O sucesso da aplicação de programas de controle da qualidade requer o comprometimento dos produtores de leite.

Embora as contagens microbiológicas tenham sido variáveis nas amostras dos pontos de coleta das fazendas do estudo, elas constituíram uma ferramenta importante durante o processo de capacitação técnica.

A identificação das mesmas espécies de microrganismos em alguns pontos de coleta comprova que os controles de limpeza são essenciais durante a ordenha e devem ser mantidos para reduzir a transferência bacteriana. Apesar de muitos produtores conhecerem esta informação, a confirmação por evidências documentadas pode ter maior impacto nos programas de capacitação técnica, acelerando a adoção das medidas e focando as atividades indispensáveis.

Além dos benefícios dos programas de treinamento em BPO na produção de leite, indústria e segurança dos consumidores, também é favorecida a disseminação de informação técnica para proprietários e funcionários de ordenha, promovendo o conhecimento e confiança nas tarefas que realizam. Os métodos de intervenção devem motivar aos produtores a participar e se-comprometer nas melhorias, para prevenção dos riscos de higiene no leite, ainda que os resultados requeiram tempo.

REFERÊNCIAS

- ALARCON, P. et al. Pig farmers' perceptions, attitudes, influences and management of information in the decision-making process for disease control. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam v. 116, n. 3, p. 223–242, 2014.
- ALMEIDA, J.; DOMINGUES, P.; SAMPAIO, P. Different perspectives on management systems integration. **Total Quality Management**, Abingdon, v. 25, n. 4, p. 338-351, 2014.
- ÁLVAREZ, G. et al. Raw milk quality produced in small dairy farms in the South of Mexico City. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 44, p. 237-242, 2012.
- ANDRADE, A. P. et al. Perfil de Staphylococcus coagulase positiva e negativa contaminantes de queijo de coalho. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento /Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, v. 52, p. 1–19, 2011
- ANGELILLO, I. et al. Food handlers and foodborne diseases: knowledge, attitudes, and reported behavior in Italy. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 3, p. 381–5, 2000.
- AMARAL, L. A. et al. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 173-177, 2004.
- AWALE, M. et al. Bovine mastitis: a threat to Economy. **Scientific Reports**, London, v. 1, n. 5, p. 1-10, 2012.
- AZEVEDO, C. et al. Prevalence of contagious and environmental mastitis-causing bacteria in bulk tank milk and its relationships with milking practices of dairy cattle herds in São Miguel Island (Azores). **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 48, n. 2, p. 451-459, 2016.
- BABA, T. et al. Complete genome sequence of *Staphylococcus caseolyticus* strain JSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 191, n. 4, p. 1180-1190, 2009.
- BARBANO, D. M.; MA, Y.; SANTOS, M. V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 89, supl. 1, p. E15-E19, 2006.
- BARKEMA, H. W. et al. Invited review: changes in the dairy industry affecting dairy cattle health and welfare. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 98, n. 11, p. 7426-7445, 2015.
- BELAGE, E. et al. The Canadian National Dairy Study 2015 - Adoption of milking practices in Canadian dairy herds. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 100, n. 5, p. 3839-3849, 2017.
- BELLI, P. et al. Microbiological survey of milk and dairy products from a small scale dairy processing unit in Maroua (Cameroon). **Journal Food Control**, Kidlington, v. 32, p. 366–370., 2013.

BOTARO, B. G.; GAMEIRO, A. H.; SANTOS, M. V. Quality based payment program and milk quality in dairy cooperatives of Southern Brazil: An econometric analysis. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 1, p. 21-26, 2013.

BRADLEY, A. J. Bovine Mastitis : An Evolving Disease. **The Veterinary Journal**, Bristol, v. 163, p. 1–13, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1.

BRUIJNIS, M. et al. Dairy farmers' attitudes and intentions towards improving dairy cow foot health. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 155, n. 1, p. 103-113, 2013.

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A. Métodos de conservação o de amostras de leite para determinação da contagem bacteriana total por citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 2, p. 434-439, 2010.

CARLONI, E. et al. Effect of farm characteristics and practices on hygienic quality of ovine raw milk used for artisan cheese production in central Italy. **Animal Science Journal**, Nova Yorko, v. 87, n. 4, p. 591–599, 2016.

CERVINKOVA, D. et al. Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. **Veterinarni Medicina**, Prague, v. 58, n. 11, p. 567-575, 2013.

CHAPMAN, P. A. et al. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 68, n. 1-2, p. 11-20, 2001.

CHARAYA, G. et al. Detection of major mastitis pathogens by multiplex polymerase chain reaction assay in buffalo milk. **Indian Journal Animal Sci**, Ansari Nagar, v. 85, n. February, p. 122–125, 2015.

CHASE, L. E.; ELY, L. O.; HUTJENS, M. F. Major advances in extension education programs in dairy production. **Journal Dairy Science**, New York, v. 89, n. 4, p. 1147-1154, 2006.

CHEN, S. X. et al. Effect of somatic cell count in goat milk on yield , sensory quality , and fatty acid profile of semisoft cheese. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 93, n. 4, p. 1345–1354, 2010

CORTEZI, A. M. **Condições higiênico sanitárias e manejo de rebanhos leiteiros correlacionados á qualidade do leite cru refrigerado**. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

CROWTHER, J.; HERD, T.; MICHELS, M. Food safety education and awareness: a model training programme for managers in the food industry. **Food Control**, Kidlington, v. 4, n. 2, p. 97-100, 1993.

DALTON, K.; ISRAELSEN, C.; YOUNG, A. J. The importance of increasing milk quality by

decreasing the Somatic Cell Count (SCC). **Agriculture Extension Utah State University**, Logan, n. April, 2017.

DERKS, M. et al. Associations between farmer participation in veterinary herd health management programs and farm performance. **Journal Dairy Science**, New York, v. 97, n. 3, p. 1336-47, 2014.

DING, Y. et al. Antimicrobial resistance and virulence-related genes of *Streptococcus* obtained from dairy cows with mastitis in Inner Mongolia, China. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 1–6, 2015.

DOS SANTOS, A. F. et al. Antimicrobial residues in milk and occurrence of clinical and subclinical mastitis in herds in the region of Campinas, São Paulo. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró v. 8, n. 1, p. 60–67, 2014.

DUFOUR, S. et al. Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. **Journal Dairy Science**, New York, v. 95, p. 1283-1300, 2012.

DURAN, N. et al. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. **Indian Journal of Medical Research**, Ansari Nagar, v. 135, n. 5, p. 389-396, 2012.

FAGUNDES, H. et al. Microbiological analysis and somatic cell counts in raw milk from farms of Sao Paulo State, Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, Victoria Island, v. 5, n. 21, p. 3542-3545, 2011.

FAGUNDES, H. et al. 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**, Victoria Island, v. 6, n. 28, p. 5805-5808, 2012.

FIRETTI, R.; RIBEIRO, M. M.; FRANZOLIN NETO, R. Programa capacitação rural-Sebrae/SP: metodologia, aplicação e pesquisa de opinião com os participantes. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 7, p. 24-40, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Guide to good dairy farming practice**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations and International Dairy Federation, 2011.

GOLI, M. et al. Prevalence assessment of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* by multiplex polymerase chain reaction (M-PCR) in bovine sub-clinical mastitis and their effect on somatic cell count (SCC) in Iranian dairy cows. **African Journal of Microbiology Research**, Lagos, v. 6, n. 12, p. 3005–3010, 2012.

GROSCHUP, M. H.; HAHN, G.; TIMONEY, J. F. Antigenic and genetic homogeneity of *Streptococcus uberis* strains from the bovine udder. **Epidemiology and Infection**, New York v. 107, n. 2, p. 297–310, 1991.

GÜRLER, H. et al. Investigation on the etiology of subclinical mastitis in jersey and hybrid jersey dairy cows. **Acta Veterinaria**, Warsaw, v. 65, n. 3, p. 358–370, 2015.

HALASA, T. et al. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. **The Veterinary Quarterly**, Abingdon, v. 29, n. 1, p. 18-31, 2007.

HALL, T. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98 NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, n. 41, p. 95–98, 1999

HOSHINO, T.; FUJIWARA, T.; KILIAN, M. Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 43, n. 12, p. 6073-6085, 2005.

HOVINEN, M.; AISLA, A. M.; PYORALA, S. Visual detection of technical success and effectiveness of teat cleaning in two automatic milking systems. **Journal Dairy Science**, New York, v. 88, n. 9, p. 3354-3362, 2005.

HUIJPS, K. et al. Costs and efficacy of management measures to improve udder health on Dutch dairy farms. **Journal Dairy Science**, New York, v. 93, n. 1, p. 115-24, 2010.

HWANG, S. M. et al. tuf gene sequence analysis has greater discriminatory power than 16S rRNA sequence analysis in identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 12, p. 4142-4149, 2011.

JANSEN, J. et al. Explaining mastitis incidence in Dutch dairy farming: the influence of farmers' attitudes and behaviour. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 92, n. 3, p. 210-23, Nov. 2009.

JANSEN, J.; RENES, R. J.; LAM, T. J. Evaluation of two communication strategies to improve udder health management. **Journal Dairy Science**, New York, v. 93, n. 2, p. 604-12, 2010.

JUCIMARA, J. et al. Qualidade da água utilizada na ordenha de propriedades leiteiras do Meio Oeste Catarinense , Brasil. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 10, n. 1, p. 9-15, 2011.

KALUPAHANA, R.; SILVA-FLETCHER, A. A participant-Led programme for field veterinary training to identify bacteriological quality of milk from the farmer to the retail outlet. **Food Control**, Kidlington, v. 63, p. 128-134, 2016.

KESHAVARZ, S. Effect of educational and extension programs in improvement of raw milk quality with CIPP. Evaluation model in Iran. **Journal of American Science**, Richmond Hill, v. 10, n. 1, p. 1642-1645, 2013.

KILPATRICK, S. Education and training: impacts on farm management practice. **Journal of Agricultural Education and Extension**, Abingdon, v. 7, n. 2, p. 105-116, 2000.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KIVARIA, M. F.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; KAPAGA, A. M. Risk indicators associated with subclinical mastitis in smallholder dairy cows in Tanzania. **Tropical Animal Health and Production**, v. 36, n. 6, p. 581-592, 2004.

KRÓL, J. et al. Short communication: *Streptococcus canis* is able to establish a persistent udder infection in a dairy herd. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 98, n. 2, p. 7090-7096, 2015.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016

LEITE-JUNIOR, B. R. et al. Aplicação das boas práticas agropecuárias no processo de ordenha em uma propriedade rural do município de Rio Pomba, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 66, n. 380, p. 31-39, 2011.

LINGATHURAI, S.; VELLATHURAI, P. Bacteriological quality and safety of raw cow milk bacteriological quality and safety of raw cow milk in Madurai, South India. **Webmed Central Microbiology**, London, p. 1-10, 2010.

MARTINS, C. M. M. R. et al. Efficacy of a high free iodine barrier teat disinfectant for the prevention of naturally occurring new intramammary infections and clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. p. 1-10, 2017.

MATSUBARA, M. T. et al. Good practices in milking to reduce microbiological contamination of milk in agreste of Pernambuco. **Semina. Ciencias Agrarias**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 277-286, 2011.

MEHROTRA, M. et al. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.

MEMON, J. et al. Molecular characterization and antimicrobial sensitivity of pathogens from sub-clinical and clinical mastitis in Eastern China. **Pakistan Veterinay Journal**, Faisalabad, v. 8318, n. 2, p. 85-92, 2010.

MICINSKIA, J. et al. Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction. **Polish Annals of Medicine**, Varsóvia, v. 20, n. 1, p. 69–76, 2013

MORE, S. J. Global trends in milk quality: implications for the Irish dairy industry. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 62, supl. 4, p. S5-S14, 2009.

NICKERSON, S. C. Management strategies to reduce heat stress, prevent mastitis and improve milk quality in dairy cows and heifers. **Extension Bulletin**, Ithaca, v. 1426, 2014. 10 p.

PEREIRA, P. C. Milk nutritional composition and its role in human health. **Nutrition**, London, v. 30, n. 6, p. 619–627, 2014.

PERKINS, N. R. et al. An analysis of the relationship between bulk tank milk quality and wash water quality on dairy farms in Ontario, Canada. **Journal Dairy Science**, New York, v. 92, n. 8, p. 3714-3722, 2009.

PINHEIRO, M. G. et al. Efecto do ambiente pre-ordenha (sala de espera) sobre a temperatura da pele, a temperatura retal e a produção de leite de bovinos da raça Jersey. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, Vila Real, v. 12, n. 2, p. 37-43, 2005.

PINTO, C. L. D. O.; MARTINS, M. L.; VANETTI, M. C. D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 645-651, 2006.

QUEVEDO-BLASCO, R.; QUEVEDO-BLASCO, V. J.; TÉLLEZ-TRANI, M. Cuestionario de evaluación motivacional del proceso de aprendizaje (EMPA). **European Journal of Investigation in Health, Psychology and Education**, Almería. v. 6, n. 2, p. 83–105, 2016.

REINEMANN, D. J. et al. Review of practices for cleaning and sanitation of milking machines. **Bulletin-International Dairy Federation**, p. 3-18, 2003.

REYES, J. et al. Influence of milking method, disinfection and herd management practices on bulk tank milk somatic cell counts in tropical dairy herds in Colombia. **The Veterinay Journal**, London, v. 220, p. 34-39, 2017.

ROJO-GIMENO, C. et al. Farm-economic analysis of reducing antimicrobial use whilst adopting improved management strategies on farrow-to-finish pig farms. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 129, p. 74-87, 2016.

ROLLIN, E.; DHUYVETTER, K. C.; OVERTON, M. W. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 257–264, 2015

SANTOS, E. M. P. et al. Streptococcus e gêneros relacionados como agentes etiológicos de mastite bovina Streptococcus and related genera as etiological agents of bovine mastitis. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 1, p. 17-27, 2007.

SEMBADA, P. et al. Improved milk production performance of smallholder farms in West Java (Indonesia). **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 48, n. 4, p. 793-799, 2016.

SHOME, B. R. et al. Molecular characterization of Streptococcus agalactiae and Streptococcus uberis isolates from bovine milk. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 44, n. 8, p. 1981-1992, 2012.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Varela, São Paulo, 2010.

SOUZA, E. L. et al. Biofilm formation by Staphylococcus aureus from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 67–75, 2014.

SPEXOTO, A. A.; OLIVEIRA, C. A. F.; OLIVAL, A. D. A. Aplicação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle em propriedade leiteira tipo A. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1424-1430, 2005.

SRIVATHSAN, A.; RUDDLIF, M. On the inappropriate use of Kimura-2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. **Cladistics**, Chichester, v. 28, p. 190-194, 2012.

SURKAR, S. H. et al. Adoption of quality milk production practices by dairy farmers in Wardha District of Maharashtra. **Agricultural rural development**, Frankfurt Am Main, v. 1, p. 1-4, 2014.

TAKAHASHI, F. H. et al. Variação e monitoramento da qualidade do leite através do controle estatístico de processos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 13, n. 1, p. 99-107, 2012.

THEAN, Y. T.; SIEW, Y. N.; WAN, X. N. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci recovered from nonsterile sites. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 9, p. 3413–3414, 2006.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

THORBERG, B. M. et al. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 92, n. 10, p. 4962-70, 2009.

TOLOSA, T. et al. Milk production, quality, and consumption in Jimma (Ethiopia): facts and producers', retailers', and consumers' perspectives. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 124, p. 9-14, 2016.

VAARST, M. et al. participatory livestock farmer training for improvement of animal health in rural and peri-urban smallholder dairy herds in Jinja, Uganda. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 39, n. 1, p. 1-11, 2007.

VALEEVA, N. I.; LAM, T. J. G. M.; HOGEVEEN, H. Motivation of dairy farmers to improve mastitis management. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 90, n. 9, p. 4466-4477, 2007.

VANCANNEYT, M. et al. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1381-1391, 2002.

VAN SOEST, F. J. S. et al. Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 99, n. 10, p. 8365–8374, 2016.

VÁSQUEZ, F. et al. Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (departamento de Boyacá). **Revista de Medicina Veterinaria**, Bogotá, n. 14, p. 61-83, 2007.

VIANA, G. V. R. **Técnicas para construção de árvores filogenéticas**. 2007. 176 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ceará, Fortaleza, 2007.

VISSCHER, A. de et al. Coagulase-negative *Staphylococcus* species in bulk milk: prevalence, distribution, and associated subgroup-and species-specific risk factors. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 100, n. 1, p. 629-642, 2017.

WALKER, E.; PRITCHARD, C.; FORSYTHE, S. Food handlers' hygiene knowledge in small food businesses. **Food Control**, Kidlington, v. 14, n. 5, p. 339–343, 2003.

WINCK, C. A.; THALER, A. Perfil de propriedades leiteiras de Santa Catarina em relação à Instrução Normativa 51. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 2, p. 296–305, 2012.

XU, J. et al. The diversities of staphylococcal species, virulence and antibiotic resistance genes in the subclinical mastitis milk from a single Chinese cow herd. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 88, p. 29–38, 2015.

ZAREIE, R.; ZAMANI, G. H.; KARAMI, E. The effect of dairy farmers' technical knowledge on milk bacterial count. **Academic Web Journal of Agricultural Research**, Delta, v. 1, n. 1, p. 9–13, 2016.

ANEXO A – Termo de compromisso e livre esclarecimento

Propriedade: _____

Proprietário ou Responsável: _____

Telefone: () _____ () _____

Local: _____ **Data:** ____/____/____

Responsáveis pelo projeto:

Prof. Dr. Andrezza Maria Fernandes – Departamento de Medicina Veterinária (FZEA USP)

Marisa Matias de França – Zootecnista, Mestranda em Biociência animal (FZEA USP)

Rocio Contero – Bióloga, Doutoranda em Ciências dos alimentos (FZEA USP)

TERMO DE COMPROMISSO

A. Apresentação

Devido à diversidade dos sistemas de produção leiteira brasileira e em acordo com a Instrução Normativa 62 (IN 62), o projeto de pesquisa intitulado: “Estudo da influência da educação sanitária de produtores e funcionários sobre parâmetros de qualidade do leite e isolamento de microrganismos causadores de mastite” será realizado com o intuito de envolver produtores e funcionários de níveis socioeconômicos e infraestruturas distintos, em atividades que contribuam para a adequação às normas sanitárias, em fazendas da região de Pirassununga/SP.

Objetivo do projeto

- Treinar aos funcionários e proprietários da fazenda, ou atualizar o conhecimento técnico a cerca do manejo na produção de leite com qualidade e produtividade, segundo a Instrução normativa 62;
- Monitorar a qualidade do leite através de análises dos parâmetros microbiológicos de Contagem Total de Bactérias (CBT), Contagem de Células Somáticas (CCS) e patógenos

causadores de mastites, a partir da coleta de amostras de leite do tanque e de alguns animais do rebanho;

B. Comprometimentos

O proprietário da Fazenda em questão e os responsáveis do projeto concordam:

De parte dos responsáveis do projeto:

- Realizar uma caracterização geral da fazenda, no manejo das Boas Práticas de Ordenha;
- Fazer coleta de amostras de leite por tanque para realizar as análises microbiológicas, com intervalo de 1 mês, na data acordada com antecedência com o proprietário;
- Realizar capacitações técnicas para a implementação das Boas Práticas de Ordenha, com determinação dos pontos críticos, a cada dois meses, nas datas e horários adequados à rotina do proprietário e funcionários;
- Apoiar os funcionários e proprietários nos problemas ou dificuldades técnicas que se apresentaram durante o projeto;

De parte do proprietário e funcionários da fazenda:

- Permitir e garantir o cumprimento das coletas de leite;
- Participar das reuniões técnicas de capacitação;
- Preencher as fichas de registros relacionadas às atividades;

C. Custos

Serão de responsabilidade da equipe do projeto os custos que envolvem os seguintes itens:

- Equipe técnica especializada na capacitação;
- Transporte dos técnicos durante a coleta das amostras e capacitação;
- Material didático das capacitações técnicas teóricas-práticas.
- Análises laboratoriais das amostras de leite;

Observação: Os investimentos referentes às melhorias sugeridas para o manejo da propriedade serão de responsabilidade dos proprietários, quando estes decidirem realizá-las.

D. Utilização das informações da propriedade

A fim de utilização restrita dos dados para pesquisa, apenas serão utilizados os resultados das análises laboratoriais do leite e dados de produção da fazenda. As informações relacionadas aos produtores, funcionários, nome e endereço das fazendas não serão divulgadas.

E. Duração do projeto

O projeto terá duração de 10 meses a partir da data de início das atividades.

Estão de acordo com as informações contidas neste termo de compromisso os presentes, abaixo assinados:

Responsável pela fazenda:

Docente Responsável:

Pós-graduando (a) Responsável:

Prof^a. Dr^a. Andrezza Maria Fernandes

ANEXO B – Ficha de caracterização da propriedade

Propriedade: _____ **Código:** _____

**Proprietário ou
Responsável:** _____

Telefone: () _____ () _____

Localização propriedade

Endereço: _____

Cidade: _____ **Estado:** _____

Laticínio captador: _____ **Data:** ____/____/____

Responsáveis pelo projeto:

Prof. Dr. Andrezza Maria Fernandes – Departamento de Medicina Veterinária (FZEA USP)

Contato: andrezzaf@usp.br /

Marisa Matias de França – Zoot., Mestranda em Biociência animal (FZEA USP)

Contato: marisa.franca@usp.br /

Rocio Contero – Bióloga, Doutoranda em Ciências dos alimentos (FZEA USP)

Contato: r.contero@usp.br /

FICHA DE CARACTERIZAÇÃO DA PROPRIEDADE E REBANHO

1. Perfil do proprietário

1.1 Nome _____

1.2 Idade _____ **1.3 Sexo** () M () F

1.4 Grau de escolaridade

☐ Não alfabetizado

☐ Ensino Fundamental ☐ completo ☐ incompleto

☐ Ensino Médio ☐ completo ☐ incompleto

☐ Ensino Superior ☐ completo ☐ incompleto

Curso: _____

1.5 Ocupação/atividade na propriedade _____**1.6 Tempo de trabalho na propriedade _____****2. Avaliação do conhecimento técnico****2.1 Você reconhece a importância de treinamentos para melhoria da qualidade do leite?**

Sim ☐ Não ☐

2.2 Você fez algum curso ou treinamento sobre manejo de gado leiteiro?

Sim ☐ Não ☐ Especificar: _____

2.3 Que tópicos você quer aprender / Aprofundar?

3. Características gerais da propriedade**3.1 Área total: _____ ha****3.2 Outras atividades desenvolvidas:**

☐ Bovinocultura de corte ☐ Caprinocultura / Ovinocultura

☐ Avicultura (corte ou postura)

☐ Agricultura Especificar: _____ ☐ Outros: _____

3.3. Raça predominante do rebanho:

☐ Holandês ☐ Girolando ☐ SRD

☐ Gir ☐ Jersey

3.4 Compra de animais: Sim ☐ Não ☐

Frequência: _____

3.5 Remuneração: _____ R\$/Litro

3.6 Produção de leite média: _____ Litro/dia.

3.7 Número total de animais no rebanho _____

3.8 Bezerros lactantes _____ **machos** _____

3.9 Número de vacas em lactação: _____

3.11 Número de vacas de primeira cria: _____

3.12 Número de vacas de segunda cria: _____

3.13 Número de vacas de terceira cria: _____

3.14 Número de vacas com mais de 3 crias: _____

3.15 Número de vacas secas: _____

4. Sistema de produção:

☐ Semi-intensivo ☐ Intensivo ☐ Extensivo

5. Infraestrutura e mão de obra da propriedade:

5.1 Origem da mão de obra para a ordenha:

☐ Contratada ☐ Familiar ☐ Contratada e familiar

Número de funcionários: _____

5.2 Local de ordenha:

☐ Sala de ordenha ☐ Curral Outro: _____

5.3 Sistema de ordenha:

☐ Ordenha manual ☐ Mecanizada Balde ao pé ☐ Mecanizada canalizada

5.4 Número de ordenhas por dia:

☐ Uma ☐ Duas ☐ Três

5.5 Intervalo de ordenha: _____**5.6 Armazenagem do leite**

☐ Tanque de expansão direta ☐ Tanque de imersão
☐ Tanque coletivo ☐ Entrega em latão na indústria

5.7 Intervalo de coleta do leite na propriedade por parte do laticínio:

☐ 24 horas – 1 dia ☐ 48 horas – 2 dias ☐ Mais de 48 horas

6. Controle e prevenção de mastite**6.1 Há acompanhamento do rebanho por um técnico?**

☐ Zootecnista ☐ Veterinário ☐ Agrônomo
☐ Técnico agrícola ☐ Não há

6.2 Realiza exame dos primeiros jatos de leite (teste da caneca de fundo escuro)?

☐ Não ☐ Sim Frequência: _____

6.3 Lava os tetos com água antes da ordenha? ☐ Sim ☐ Não

☐ Quando necessário

6.4 Desinfeta os tetos antes da ordenha?

☐ Não ☐ Sim Produto: _____

6.5 Qual material utilizado para secagem dos tetos?

☐ Não seca ☐ Papel toalha ☐ Pano comum ☐ Outro: _____

6.6. Desinfeta os tetos depois da ordenha?

☐ Não ☐ Sim Produto: _____

6.7. Realiza o tratamento de todos os casos clínicos de mastite?

☐ Sim ☐ Não

6.8. Realiza o tratamento da vaca seca (tratamento a secagem)?

☐ Todos as vacas ☐ Parte das vacas

☐ Não realiza

6.9. Qual o critério para descarte de animais?

☐ Mastite crônica ☐ Outras doenças

☐ Baixa produção ☐ Outro _____

6.10. Envia amostras de leite de animais para análises laboratoriais?

☐ Sim ☐ Não

6.11 Se envia, qual é a finalidade das análises?

☐ Identificação de patógenos da mastite ☐ Antibiógrama

☐ Contagem de células somáticas Obs: ☐ Animais ☐ Rebanho

☐ Composição

6.12 Observa e respeita o período de carência quando trata as vacas em lactação com antimicrobianos?

☐ Sim ☐ Não

6.13 Qual é o destino do leite com resíduos de antimicrobianos?

☐ Fornecido apenas os bezerros machos ☐ Fornecido a todos os bezerros

☐ Outro destino: _____

7. Aplicação de antibióticos

7.1. Quais os casos em que usa tratamento com antimicrobianos das vacas?

☐ Doença de casco ☐ Mastite ☐ Pneumonia

☐ Diarréia ☐ Metrite ☐ Outros _____

7.2. Há um protocolo de uso de antimicrobianos para tratamento de mastite?

☐ Sim ☐ Não

7.3. Se a resposta do item 7.2 for afirmativa, anotar o protocolo

usado: _____

7.4. Quem recomenda os medicamentos para tratamento da mastite?

☐ Técnico ☐ Proprietário ☐ Outro _____

7.5. Há registro (anotação) dos tratamentos para mastite?

☐ Sim ☐ Não

7.6. Há registro (anotação) dos tratamentos para outras doenças?

☐ Sim ☐ Não

7.7. Utiliza alguma maneira visual para marcar os animais tratados com antimicrobianos?

☐ Sim ☐ Não

7.8. Utiliza algum antimicrobiano da linha não-veterinária para tratamento da mastite?

☐ Sim ☐ Não

7.9. Quantos tratamentos de mastite clínica foram realizados no último mês?

7.10. Anotar o nome comercial e as bases dos antimicrobianos utilizados na propriedade:

8. Limpeza e higienização de equipamentos e instalações

8.1 Frequência de lavagem da instalação de ordenha:

☐ Após cada ordenha ☐ Mensalmente

☐ Diariamente ☐ Não é realizada

☐ Semanalmente

8.2 Frequência de lavagem dos equipamentos e utensílios de ordenha:

☐ Após cada ordenha ☐ Mensalmente

☐ Diariamente ☐ Não é realizada

☐ Semanalmente

8.3 Lavagem do tanque após a entrega do leite ao laticínio:

☐ sim ☐ não

8.4 Utilização de detergentes específicos para a lavagem dos equipamentos:

☐ sim ☐ não

Especificar: _____

9. Origem da água

9.1 Origem da água utilizada na higienização dos equipamentos de ordenha:

☐ Rede de distribuição ☐ Cisterna
☐ Poço artesiano ☐ outro _____
☐ Riacho

9.2 Tratamento da água utilizada na propriedade:

☐ sim Especificar: _____ ☐ não

9.3 Análise da água utilizada:

☐ sim Periodicidade: _____ ☐ não

10. Manejo reprodutivo

10.1 Manejo adotado na fazenda: ☐ Inseminação artificial ☐ Monta natural

10.2 Idade média da 1ª cobertura: _____

10.3 Intervalo entre partos (média): ☐ 12 a 15 ☐ mais de 15 meses

10.4 Forma de detecção de cio: _____

10.5 Reposição do plantel:

11. Manejo nutricional

Bezerros _____

Novilhas _____

Vacas em lactação_____

Vacas secas_____

Formulação do concentrado adquirida em casa Agropecuária:

()sim ()não

Oferta de volumoso: () feno () silagem () resíduos/subprodutos

Tipo de pastagem no verão_____

Tipo de pastagem no inverno_____