

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARISA MATIAS DE FRANÇA

Influência da educação sanitária de produtores sobre parâmetros de qualidade do leite e isolamento de patótipos de *Escherichia coli* em fazendas do estado de São Paulo.

Pirassununga

2016

MARISA MATIAS DE FRANÇA

Influência da educação sanitária de produtores sobre parâmetros de qualidade do leite e isolamento de patótipos de *Escherichia coli* em fazendas do estado de São Paulo.

Versão corrigida da dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Pós Graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Andrezza Maria Fernandes.

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

M814i Matias de França, Marisa
Influência da educação sanitária de produtores sobre parâmetros de qualidade do leite e isolamento de patótipos de *Escherichia coli* em fazendas do est / Marisa Matias de França ; orientador Andrezza Maria Fernandes. -- Pirassununga, 2016.
107 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Boas práticas de ordenha. 2. *Escherichia coli*. 3. Instrução Normativa 51. 4. PCR multiplex.
I. Maria Fernandes, Andrezza, orient. II. Título.

MARISA MATIAS DE FRANÇA

Influência da educação sanitária de produtores sobre parâmetros de qualidade do leite e isolamento de patótipos de *Escherichia coli* em fazendas do estado de São Paulo.

Versão corrigida da dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do programa de Pós Graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal.

Data de aprovação: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr Andrezza Maria Fernandes, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. - Orientador(a)

Prof. Dr Arlindo Saran Netto, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

Dr. Helena Fagundes Karsburg, Agrindus S/A – Fazenda Santa Rita, Descalvado, SP.

Pirassununga

2016

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a Deus e aos meus pais, por tornarem este sonho possível. Aos amigos e profissionais que ajudaram a realizá-lo, e a todos os envolvidos na produção de leite.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar e guiar meus caminhos, mantendo-me perseverante em todos momentos.

Aos meus pais Sebastião Luiz de França e Maria Matias S. de França, e meu irmão André Luiz de França, por todos os ensinamentos, apoio e amor incondicionais. Sem estes, este sonho não seria possível.

À equipe de trabalho: à aluna de Doutorado Rocio contero, e aos estagiários e amigos João Gustavo R. Forti, Patrycia Vaiciunnas e Sofia Pacgnella, pelo apoio, companheirismo, troca de experiências e momentos de descontração durante todo o período de experimento. Além dos demais estagiários do Laboratório de Microbiologia e Higiene Zootécnica, pelo auxílio nas atividades diárias. Este trabalho não seria executado desta forma sem a dedicação de todos vocês.

Ao M. V. Luciano LaGatta da Coordenadoria de Defesa Agropecuária da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, e a M.V. Paula Pieruzzi, pelo apoio ao ingresso na pós-graduação, e auxílio no planejamento de parte deste projeto, o qual teve início no trabalho de conclusão de curso da minha graduação. E também pela indicação de produtores de leite e profissionais da área.

Ao M.V Fernando Tufanin, da CATI Leite (Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – CATI) de Itirapina/ SP e ao Agrônomo Marcos Jonatan A. Jorge, do Escritório de Defesa Agropecuária (EDA) de Limeira/SP, pela mediação realizada entre o nosso grupo de pesquisa e os produtores de leite da região de Itirapina/SP.

Aos produtores de leite e funcionários: Cristian, Fernando, João Pedro, José, Luis Enrique, Marcos, Mariana, Nelson, Tiago, e demais envolvidos nas propriedades. Obrigada por aceitarem participar do projeto e disponibilizarem seus locais de trabalho, mãos de obra e rebanho para coletas e treinamentos até o final do experimento. Agradeço também a confiança depositada e o convívio agradável proporcionado neste período de um ano.

Às vacas que compunham os rebanhos participantes da educação sanitária, e em especial às que participaram assiduamente das coletas, demonstração de testes de detecção de mastite e demais práticas realizadas.

Aos amigos e companheiros de pós-graduação frequentantes do Laboratório de Microbiologia e Higiene Zootécnica, Andrea Vásques, Anna Alencar, Carolina Bedoya, Euder Michelin, Jenny, Juliana Baldin, Juliana Navarro, Marcela Jimenez, Loiane Sampaio, Maria Fernanda, Marina Massocco, Melina Gomes, Samara Maganha e Thaís Corrêa, pelo apoio técnico, companheirismo e paciência, tornando este convívio diário tão agradável, dentro e fora do laboratório. E pelas reuniões descontraídas com cafés, as quais auxiliaram na resolução de problemas acadêmicos e pessoais.

À técnica do Laboratório de Microbiologia e Higiene Zootécnica, Silvia Helena, que se tornou colega de pós-graduação e também uma amiga. Obrigada pelo auxílio técnico e muita paciência dedicada durante todo o experimento.

AGRADECIMENTOS

Às moradoras da República Forfé, em especial à Beatriz Villar, Carla Rocha, Eliana Oshiro, Gabriela Pombo, Madá e Mika, pela amizade e apoio em todos os momentos. Aos demais companheiros de moradia Katiéli, Cristian, Tânia, Bruna e Elissandra pelo companheirismo. Aos amigos Monalisa Bomfim, Luana Menegassi, Amanda Tasca, Carol Soares, Bárbara Rossi, Mariusa Zucchermaglio, Lana Verônica, Andressa, Bárbara Ramos, Mellory Martinson, Filipe Zanferari, Thiago Vendramini, Mariana Rentas, Fernanda Ramos, Iza Jardim, Natasha Crippa, Bruna Gomes, Natália Minami, Laura Fantucci e Tiago De Valle. A todos, obrigada por tudo.

Ao meu namorado Jackson, pelo carinho e companheirismo. E aos seus familiares pelo carinho e acolhimento.

Aos meus companheiros de quatro patas, os cães: Princesa, Biscoito, Bud, Malzi, Tina, Dominique e Xiru, pelos momentos de descontração.

À Prof. Dr. Andrezza Maria Fernandes, pelo auxílio no planejamento do projeto que originou esta dissertação, orientação e apoio dedicados.

Ao Prof^o Ricardo Luiz Moro de Souza, pelo auxílio, conselhos, paciência e apoio durante as análises moleculares e interpretação destes dados. E ao Prof^o César de Lima Gonçalves, pela dedicação e disponibilidade em auxiliar com a análise estatística dos dados.

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pelo oferecimento do curso de Pós-graduação em Biociência Animal e demais oportunidades. À todos os funcionários desta universidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento de parte do projeto que deu origem a esta dissertação.

EPÍGRAFE

“Não é o que você faz, mas quanto amor você dedica no que faz que realmente importa.” (Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

FRANCA, M. F. **Influência da educação sanitária de produtores sobre parâmetros de qualidade do leite e isolamento de patótipos de *Escherichia coli* em fazendas do estado de São Paulo.** 2016. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

O leite pode sofrer alterações nas características físico-químicas e biológicas devido à ação de microrganismos. Aspectos como deficiências de manejo e higiene de ordenha, altos índices de mastite, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, refrigeração ineficiente ou inexistente e mão de obra desqualificada estão relacionadas com os prejuízos na qualidade do leite cru e seus derivados. Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar a qualidade do leite cru produzido em propriedades da região nordeste do Estado de São Paulo e introduzir boas práticas na linha de ordenha e refrigeração do leite, monitorando os índices de qualidade: contagem de células somáticas (CCS), contagem de mesófilos e psicotróficos, presença de coliformes e isolamento e identificação molecular de *Escherichia coli*. Não foram detectados genes de virulência nos isolados de *E. coli*, porém, isto não elimina a possibilidade de as cepas encontradas nas fazendas carregarem outros genes de virulência e serem potencialmente patogênicas. Somente uma propriedade demonstrou redução nos índices de contaminações de modo geral. As demais propriedades não apresentaram modificações e investimentos em infraestrutura e manejo de ordenha, fato que refletiu na manutenção da situação inicial constatada nas propriedades antes do início do estudo.

Palavras-chave: Boas práticas de ordenha, Instrução Normativa 62, PNMQL.

ABSTRACT

FRANCA, M. F. **Influence of sanitary education of farmers on milk quality parameters and isolation of *Escherichia coli* pathotypes in farms from Sao Paulo State.** 2016. 107 p. Dissertation (Master's Degree) – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2016.

Milk may have changes in the physicochemical and biological characteristics due to the action of microorganisms. Aspects such as deficiencies on management and on milking hygiene, high rates of mastitis, inadequate maintenance and disinfection of equipment, inefficient or nonexistent refrigeration and non-specialized workers are related to the losses in the quality of raw milk and dairy products. Therefore, this study aimed to evaluate the quality of raw milk produced in properties in northeastern region of Sao Paulo State, introducing good practices on milking and cooling, and monitoring the quality levels: somatic cell counts (SCC), mesophile and psychrotrophic bacteria counts, presence of coliforms, isolation and molecular identification of *Escherichia coli*. Virulence genes in *E. coli* isolates were not detected, however, this does not eliminate the possibility that strains found on farms carry other virulence genes and are potentially pathogenic. Only one farm showed a reduction in the rates of general contamination. The other properties showed no change and investments in infrastructure and milking management, what can reflect in the maintenance of the inicial situation observed in the properties before the beginning of the study.

Key-words: Good milking practices, Instrução Normativa 62, PNMQL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sala de ordenha com sistema de ordenha mecânica canalizada na fazenda A. ...	54
Figura 2. Curral com piso de concreto e sistema de ordenha mecânica balde ao pé na fazenda D.	54
Figura 3. Curral de “chão batido” e sistema de ordenha mecânica balde ao pé na fazenda C.	55
Figura 4. Sistema automático de lavagem utilizado em ordenha mecânica balde ao pé na fazenda D.	56
Figura 5. Reservatório de água utilizado para abastecimento de água na propriedade A. ...	56
Figura 6. Procedimento de amostragem do leite armazenado no tanque de expansão da fazenda C, com auxílio de concha metálica esterilizada, para análises de composição, microbiologia e resíduo de antibióticos no leite.	60
Figura 7. Procedimento de obtenção de amostra composta de um dos animais do rebanho da propriedade B, para análise microbiológica.	60
Figura 8. Procedimento de amostragem da superfície da mão do ordenhador da fazenda D, com uso de suabe estéril.	60
Figura 9. Procedimento de amostragem da superfície interna dos equipamentos de ordenha da fazenda D, com auxílio de suabe estéril.	61
Figura 10. Procedimento de amostragem da água utilizada na lavagem de utensílios e equipamentos da fazenda D, com recipiente estéril.	61
Figura 11. Cultura de mesófilos utilizada na demonstração da contaminação dos pontos de coleta nas propriedades envolvidas no projeto educativo.	62
Figura 12. Uso de mídia áudio visual para exposição dos resultados obtidos nas coletas e discussão dos pontos positivos e negativos identificados após observação do manejo.	62
Figura 13. Realização de teste de CMT durante os módulos educativos.	63
Figura 14. Participação dos produtores no aprendizado de amostragem de leite destinado às análises de composição e contagem de células somáticas.	64
Figura 15. Funcionários após participação no módulo de boas práticas de ordenha na fazenda B.	64
Figura 16. Fragmentos de 903 pb e 175 pb observados nos isolados de <i>E. coli</i> , a partir da reação 1 de PCR multiplex, após eletroforese em gel de agarose 2%.	88
Figura 17. Fragmentos de 190 pb observados nos isolados de <i>E. coli</i> , a partir da reação 2 de PCR multiplex, após eletroforese em gel de agarose 2%.	88
Figura 18. Os fragmentos de 190 pb observados nos isolados de <i>E. coli</i> , a partir da reação 2 de PCR multiplex, após eletroforese em gel de agarose 2%.	89

Figura 19. Reconstrução filogenética pelo método de máxima verossimilhança com base no gene PHO de *Escherichia coli*. 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis para contagem bacteriana total e contagem de células somáticas padronizados pela Instrução Normativa 62 (MAPA) conforme os períodos de vigência para a região sudeste do Brasil.	25
Tabela 2. Sequência de <i>primers</i> e tamanho dos fragmentos de genes de virulência em <i>Escherichia coli</i> na reação um.	48
Tabela 3. Sequência de <i>primers</i> e tamanho dos fragmentos de genes de virulência em <i>Escherichia coli</i> na reação dois.	49
Tabela 4. Sequências de <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> e <i>Citrobacter</i> do repositório do GenBank.	51
Tabela 5. Descrição dos dados gerais das propriedades e respectivos rebanhos, na fase anterior ao início do programa educativo.	53
Tabela 6. Descrição da infraestrutura e aspectos higiênicos dos locais de ordenha das propriedades na fase anterior ao início do programa educativo.	57
Tabela 7. Descrição da infraestrutura e aspectos higiênicos dos locais de ordenha das propriedades na fase anterior ao início do programa.	58
Tabela 8. Descrição das alterações ocorridas nas propriedades após a implementação da educação sanitária.	65
Tabela 9. Correlação entre as médias das contagem de células somática e os componentes do leite das vacas das propriedades avaliadas em seis etapas de monitoramento.	66
Tabela 10. Correlação entre as médias das contagem de células somática e os componentes do leite dos tanques de refrigeração das propriedades avaliadas em seis etapas de monitoramento.	66
Tabela 11. Composição do leite armazenado em tanque de refrigeração durante as seis fases de coleta na fazenda A.	68
Tabela 12. Composição do leite armazenado em tanque de refrigeração durante as seis fases de coleta na fazenda B.	68
Tabela 13. Composição do leite armazenado em tanque de refrigeração durante as seis fases de coleta na fazenda C.	69
Tabela 14. Composição do leite armazenado em tanque de refrigeração durante as seis fases de coleta na fazenda D.	69
Tabela 15. Contagem de mesófilos e psicotróficos em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda A.	76
Tabela 16. Contagem de mesófilos e psicotróficos em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda B.	77

Tabela 17. Contagem de mesófilos e psicrotróficos em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda C.	78
Tabela 18. Contagem de mesófilos e psicrotróficos em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda D.	79
Tabela 19. Contagem de coliformes a 35°C e 45°C em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda A.	82
Tabela 20. Contagem de coliformes a 35°C e 45°C em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda B.	83
Tabela 21. Contagem de coliformes a 35°C e 45°C em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda C.	84
Tabela 22. Contagem de coliformes a 35°C e 45°C em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda D.	85
Tabela 23. Presença de <i>E. coli</i> em cada ponto de coleta ao longo dos seis períodos da educação sanitária nas respectivas fazendas participantes.	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

‰: porcentagem

°C: graus *Celsius*

μ: microlitros

μM: micro mol

AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina

APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

BHI: *Brain Heart Infusion*

CBQL: Conselho Brasileiro da Qualidade do Leite

CBT: Contagem bacteriana total

CCS: Contagem de células somáticas

cm²: centímetros quadrados

cm³: centímetros cúbicos

CMT: *California Mastitis Test*

DAEC: *E coli* difusamente aderente

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

E. coli: *Escherichia coli*

Eae: adesina intimina

EAEC: *E coli* Enteroagregativa

EC: Caldo *Escherichia coli*

EHEC: *E coli* Enterohemorrágica

EIEC: *E coli* Enteroinvasiva

EMB: Ágar Levine Eosina Azul de Metileno

EPEC: *E coli* Enteropatogênica

ESD: Extrato seco desengordurado

ETEC: *E coli* Enterotoxigênica

F: *Foward*

FDA: *Food and Drug Administration*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IN 51: Instrução Normativa nº 51

IN 62: Instrução Normativa nº 62

LST: Lauril Sulfato Triptose

LTI: Toxina termo-lábil 1

LTII: Toxina termo-lábil 2

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

min: minutos

mL: mililitros

ng: nanogramas

NMP: Número mais provável

pb: Pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PHO: Fosfatase Alcalina

PNMQL: Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite

R: *Reverse*

RBQL: Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite

RIISPOA: Regulamentos da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

SHU: Síndrome Hemolítica Urêmica

ST: Toxina termo-estável

STEC: *E coli* produtora de Shiga Toxina

STX1 e STX2: *Shiga* toxinas ou “verotoxinas”

t: Toneladas

UFC: Unidades formadoras de colônia

UHT: *Ultra High Temperature*

VBBL: Verde Bile Brilhante

WMT: *Wisconsin Mastitis Test*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Panorama da produção de leite no Brasil.....	21
2.2 Histórico da legislação brasileira para produção de leite.....	23
2.3 Aspectos da produção de leite com qualidade e rentabilidade.....	27
2.4 Segurança dos alimentos.....	30
2.4.1 <i>Escherichia coli</i>	30
2.4.2 <i>Escherichia coli</i> na produção de leite e derivados.....	34
2.5 Educação sanitária na produção de leite.....	35
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivos Gerais.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4. HIPÓTESE.....	39
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
5.1 Seleção das fazendas.....	40
5.2 Caracterização da propriedade e da qualidade do leite.....	40
5.3 Coleta de amostras e monitoramento dos índices de qualidade.....	41
5.4 Educação sanitária.....	42
5.5 Composição do leite.....	43
5.6 Análises microbiológicas.....	44
5.6.1 Contagem de microrganismos mesófilos e psicotróficos.....	44
5.6.2 Isolamento de <i>Escherichia coli</i>	45
5.7 Identificação molecular de <i>Escherichia coli</i>	45
5.7.1 Sequenciamento genético.....	50
5.7.2 Análise Filogenética.....	50
6 Análise dos dados.....	51
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
7.1 Descrição das propriedades.....	52
7.2 Educação sanitária.....	59
7.3 Monitoramento da composição do leite.....	66
7.4 Monitoramento da contaminação microbiológica.....	69
7.4.1 Contagem de microrganismos mesófilos e psicotróficos.....	69
7.4.2 Contagem de coliformes e detecção de <i>Escherichia coli</i>	80
7.5 Identificação molecular de <i>Escherichia coli</i> e pesquisa de genes de virulência.....	87

7.5.1	PCR Multiplex.....	87
7.5.2	PCR RFLP.....	88
7.5.3	Sequenciamento genético	89
7.4.4	Estudo filogenético	90
8	CONCLUSÃO.....	91
	REFERÊNCIAS	93

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA - *United States Department of Agriculture*), baseado em dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estima-se que no ano de 2014 a produção nacional de leite sob inspeção governamental foi de 24,747 bilhões de litros (25.489 milhões de toneladas), com previsão de 26.101 t em 2015 e 26.623 t no ano de 2016. Em 2014 o Brasil foi o quinto maior produtor de leite no ranking mundial, precedido pela União Europeia, Índia, Estados Unidos e China. O consumo interno de leite fluido teve estimativa de 10.982 t em 2015 e previsão de 11.198 t para o ano de 2016, e este crescimento foi relacionado ao aumento previsto no uso industrial. O USDA (2015) afirma que o comércio brasileiro de leite apresenta-se otimista, apesar da crise econômica enfrentada no momento.

O leite está presente em uma parcela significativa dos alimentos utilizados na nutrição humana, seja na forma fluida ou de derivados, principalmente para crianças e gestantes. Além disso, a produção de leite gera empregos no âmbito do agronegócio e contribui para a manutenção da agricultura familiar, reduzindo o êxodo rural (DURR, 2004). Este alimento que contribui para a nutrição humana, geração de renda e movimentação do agronegócio, é também um produto que exige atenção devido a sua alta perecibilidade. O leite pode sofrer alterações nas características físico-químicas e biológicas devido à ação de microrganismos. Aspectos como deficiências de manejo e higiene de ordenha, altos índices de mastite, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, refrigeração ineficiente ou inexistente e mão de obra desqualificada estão relacionados com os prejuízos na qualidade do leite cru e seus derivados (SANTANA et al., 2004).

Além destes fatores, as falhas de manejo e a ausência de ações preventivas, como processamentos de pasteurização e esterilização, podem tornar o leite um veiculador de doenças (DURR, 2004). Desta forma, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa nº 51 de 20/09/2002 (IN 51), a qual aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite (BRASIL, 2002). Em 2011 esta IN foi reformulada pela publicação da Instrução Normativa nº 62 de dezembro de 2011 (IN 62), com o intuito de alterar os prazos dos limites estabelecidos pela IN 51 para

os índices de qualidade e promover alternativas para facilitar a implantação destas normas (BRASIL, 2011).

Dentro os microrganismos envolvidos na contaminação do leite, destaca-se a *Escherichia coli*. Este microrganismo é mais comum no trato intestinal humano e nos demais animais endotérmicos. Esta bactéria pertence à classe dos coliformes e à família *Enterobacteriaceae* (TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CHRISTINE, L. C., 2012). Apesar de algumas estirpes não serem consideradas patogênicas, diversas cepas carregam em seu genoma genes de virulência e apresentam patogenicidade, como o sorotipo O157, que pode causar Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), colite hemorrágica e trombocitopenia em seres humanos. Estas cepas podem ser isoladas do trato digestório de animais saudáveis. O monitoramento dos genes de virulência é uma ferramenta para detecção de novos patógenos (KARCH et al, 2002; CABAL et al, 2015).

Devido à importância do leite na nutrição humana, a possibilidade de transmissão de diversos microrganismos e falhas nos processos de ordenha e higienização do leite cru, justifica-se a introdução de programas de educação sanitária em fazendas produtoras de leite. Dessa forma, o presente trabalho foi realizado com o intuito de diagnosticar a qualidade do leite cru produzido em propriedades da região nordeste do Estado de São Paulo, introduzir boas práticas na linha de ordenha e refrigeração do leite, bem como monitorar os índices de qualidade: contagem de células somáticas (CCS), contagem de mesófilos e psicrotóxicos e presença de coliformes fecais. Adicionalmente, isolar *Escherichia coli* e rastrear possíveis cepas patogênicas a partir da detecção de genes de virulência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama da produção de leite no Brasil

A produção de leite no Brasil sempre esteve relacionada com a baixa produtividade da terra, mão de obra sem qualificação, e caracterizada pela sazonalidade da oferta do produto, devido à influência significativa dos fatores climáticos. Estes empecilhos afetaram o desenvolvimento tecnológico e aumento da produtividade até o início da década de 90 (NETTO e GOMES, 2005).

No período compreendido entre o ano de 1945 e o início da década de 90 os preços do mercado do leite foram controlados pelo governo a partir de uma prática denominada tabelamento, a qual teve o intuito de reduzir a sazonalidade, incentivar o consumo na forma fluida e estimular a produção no país. Em 1974, iniciou-se a prática da diferenciação do valor pago conforme o destino do leite e época do ano, sendo que no período da safra, os volumes excedentes à cota recebiam preços mais baixos (NETTO e NOGUEIRA, 2005).

O crescimento observado na produção leiteira entre 1975 e 2001 foi de aproximadamente 3,62% ao ano. Deste valor, 2,3% foram obtidos através do aumento na produtividade, concentrada principalmente entre os anos de 1996 e 2001. Ou seja, apesar da irregularidade do processo, ocorreu modernização no setor e aumento dos índices de produção (VILELA et al., 2002).

Em 1991 ocorreu a desregulamentação, ou seja, fim do controle governamental no mercado de leite no Brasil, a estabilização da economia e a abertura econômica. Além destes acontecimentos, a criação do plano real, e redução na inflação culminaram em um aumento no consumo de leite, fatores que geraram aumento do investimento, fortalecimento da concorrência e, dessa forma, incentivaram mudanças neste setor do agronegócio brasileiro (CARVALHO, 2010).

Os preços decresceram 99% em valores reais, entre 1975 a 1991, indicativo de que o tabelamento não atingiu o objetivo de reduzir os prejuízos econômicos do produtor. Já no período sem tabelamento, compreendido entre os anos de 1991 a 2000, o decréscimo atingido foi apenas 51,15% (VILELA et al., 2002).

Segundo Jank e Galan (1998), no início da década de noventa não havia padronização do manejo de ordenha e o transporte era realizado em latões até os locais de beneficiamento, em caminhões desprovidos de refrigeração. Com o

objetivo de padronizar esse processo e preservar as características do produto *in natura*, até o seu recebimento para beneficiamento, a partir da metade da década de 1990, iniciou-se a coleta a granel no país, com o uso de caminhões providos de tanque isotérmicos, mangueira flexível e bomba autoaspirante.

No que se refere ao consumo dos produtos, a partir de 1994 ocorreu um aumento significativo do consumo do leite “Longa Vida” ou UHT (*Ultra High Temperature*), fato que promoveu gradativa substituição de parte do consumo dos leites tipo A, B e C. Devido à menor perecibilidade deste produto, mediante o processamento UHT, as empresas beneficiadoras puderam realizar a oferta de leite na forma fluida em âmbito nacional, e a comercialização concentrou-se neste elo da cadeia (CARVALHO, 2010). De acordo com o USDA (2015) o Brasil importa principalmente leites com processamento UHT da Argentina e do Uruguai.

O aumento do consumo do leite “Longa Vida” acarretou também a redução expressiva do mercado informal (leiteiros) e da participação de padarias e pequenos supermercados, pois com a redução da perecibilidade do produto, a aquisição deixou de ser diária. Em 2010, o volume de leite fluido comercializado no país na forma UHT representou aproximadamente 75% do total (CARVALHO, 2010). Fatores como o aumento do consumo e crescimento da exportação trouxeram exigências em torno da qualidade da matéria-prima produzida (VILELA et al., 2002).

De acordo com o IBGE (2015), em 2014 a produção de leite gerou um total de R\$ 33,78 bilhões, com preço médio de R\$ 0,96/litro pago ao produtor. Sendo o maior preço médio R\$ 1,11 oriundo da Região Nordeste, e o menor R\$ 0,82, na região Norte. No quesito produtividade, a média obtida para o ano de 2014 foi de 1.525 litros/vaca/ano, a qual foi 2,2% maior em relação à de 2013, com 1.492 litros/vaca/ano. As três maiores médias de produtividade foram obtidas nos municípios de Araras (SP), Castro (PR) e Carlos Barbosa (RS). A maior média por região foi de 2.789 litros/vaca/ano obtida no Sul, a qual apresentou aumento de 4,3%. Já a menor produtividade foi de 345 litros/vaca/ano encontrada na região norte, em Roraima. Estima-se que a aquisição de leite sob inspeção sanitária governamental em empresas beneficiadoras foi de 24,75 bilhões de litros em 2014, sendo a produção informal de 29,6% do total.

2.2 Histórico da legislação brasileira para produção de leite

As normas que regeram a produção de leite brasileira até a década de 90 estavam contidas nos Regulamentos da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), aprovado pelo Decreto nº 30.691 do ano de 1952. Dessa forma, devido à necessidade da criação de uma padronização da produção de derivados lácteos, em 1997 o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), em parceria com a Embrapa, elaborou a proposta inicial do Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL). Este plano teve como objetivos regulamentar a produção e transporte do leite da fazenda à indústria, introduzir boas práticas de fabricação, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e inspeção do leite e derivados. Além disso, estabelecer normas técnicas higiênico-sanitárias para a produção dos tipos de leite produzidos na época (A, B e C), e sugerir normas de resfriamento e coleta de leite a granel. Em 1998 ocorreu a criação do Conselho Brasileiro da Qualidade do Leite (CBQL) para mediar as discussões acerca da produção de derivados de leite no país.

Em dezembro de 1999, o MAPA publicou a Portaria 56/99 para consulta pública, com a finalidade de elevar o padrão de qualidade do leite cru produzido no Brasil. O objetivo foi a padronização dos processos de produção, refrigeração e transporte do leite a granel até a empresa beneficiadora. Além disso, preconizou-se a regulamentação da identidade e qualidade dos tipos existentes neste período: A, B e C, e o leite denominado cru refrigerado, caracterizado pela matéria prima entregue ao beneficiamento, o qual seria substituto gradual dos tipos B e C (DURR, 2004).

Apesar da demanda de elaboração de uma nova legislação para produção de leite no país, as propostas da portaria 56/1999 geraram receio por parte da parcela de pequenos produtores, os quais previam exclusão devido à dificuldade de aderir à nova legislação. Diante disso e mediante consultadas públicas com representantes dos pequenos agricultores, indústria e governo, prorrogou-se por dois anos a publicação do novo regulamento (DURR, 2004). Apenas em abril de 2000 ocorreu a implementação da Portaria 56/99 pelo MAPA. Após este ato, realizou-se a publicação da Instrução Normativa nº 51 de 20/09/2002 (IN 51), que aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite (Brasil, 2002). Foram contemplados a padronização dos processos de ordenha, implantação de infraestrutura (transporte, fornecimento de água e energia),

participação efetiva das empresas beneficiadoras, treinamento técnico de produtores e incentivo à produção de qualidade com base em bonificações e penalizações (MACHADO, 2008).

Com o intuito de controlar a qualidade do produto, a IN 51 estabeleceu um padrão de amostragem do leite na propriedade, ao contrário do que era realizado até então: apenas na plataforma de recebimento das empresas beneficiadoras. Os indicadores estabelecidos foram a contagem bacteriana total expressa na forma de unidades formadoras de colônia por mililitro (CBT – UFC/mL) e a contagem de células somáticas expressa em células somáticas por mililitro (CCS – células/mL), para avaliação dos níveis de contaminação externa e saúde da glândula mamária, respectivamente. Também foram incluídos teste de resíduo de antibióticos e definição de teores mínimos para as frações de sólidos (gordura e proteína e lactose). O MAPA instituiu no mês de abril de 2002, através da Instrução Normativa 37, a chamada Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), com objetivo de realizar análises laboratoriais para fiscalização de amostras de leite cru, recolhidas em propriedades rurais e estabelecimentos de laticínios, nos níveis estabelecidos pela IN 51 (BRASIL, 2002).

Para a implementação da IN 51, foi estipulado um calendário gradativo para os prazos de vigência dos limites máximos para os índices de qualidade. Em julho de 2005 nos Estados do Sul, Sudeste e Centro-Oeste, ficou estabelecido o limite máximo aceito para o leite cru refrigerado (nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste) de 1.000.000 de unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL de leite) e para 1.000.000 de células somáticas/mL, para CCS. Em julho de 2008 os limites foram reduzidos para 750.000 UFC/mL e 750.000 células somáticas/mL (BRASIL, 2002).

No ano de 2011, próximo ao prazo final para a entrada em vigor definitiva da IN 51, o setor leiteiro e a Câmara Setorial do Leite e Derivados solicitaram a criação de novos prazos. Os resultados obtidos pelas análises na Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL) foram analisados e concluiu-se que o setor não estava apto para adequação às normas exigidas. Dessa forma, foi publicada a Instrução Normativa nº 62 de dezembro de 2011, com o intuito de alterar os prazos para os limites estabelecidos pela IN 51 para os índices de qualidade (CBT e CCS). Em maio de 2016, a IN 62 teve os prazos de CCS e CBT novamente prorrogados por 2 anos. As alterações realizadas nos prazos para índices de qualidade na região Sudeste do país estão contidos na Tabela 1. A

classificação do leite produzido no Brasil também foi alterada de tipo A, B e C, para leite tipo A, B, leite cru refrigerado e leite pasteurizado. A continuidade da produção do leite B ainda é um assunto em discussão. A IN 62 sugere a padronização dos resultados periódicos obtidos pela Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL), a criação de um programa de controle nacional de prevenção de mastite e investimento em infraestrutura (energia elétrica e estradas – transporte do leite). Além disso, o acesso ao crédito de financiamento e pagamento de bonificação por parte dos laticínios para quantidades de CBT, CCS e sólidos totais, ou seja, por qualidade, também estão envolvidos (Brasil, 2011).

Tabela 1. Níveis para contagem bacteriana total e contagem de células somáticas padronizados pela Instrução Normativa 62 (MAPA) conforme os períodos de vigência para a região sudeste do Brasil.

Índice medido por propriedade rural ou tanque comunitário	A partir de 01.07.2011 até 31.12.14	A partir de 01.01.12 até 30.06.14	A partir de 01.07.14 até 30.06.18	A partir de 01.07.18
Contagem padrão em placas (CCP) expressa em UFC/mL)	Máximo de 750.000	Máximo de 600.000	Máximo de 300.000	Máximo de 100.000
Contagem de células somáticas (CCS) expressa em CCS/mL	Máximo de 750.000	Máximo de 600.000	Máximo de 500.000	Máximo de 400.000

Fonte: Adaptado de Instrução Normativa 62/ MAPA – (BRASIL, 2011), após prorrogação de maio de 2016.

Para avaliar a qualidade do leite na microrregião de Pirassununga-SP, Olival et al., (2002) desenvolveram um estudo com 85 propriedades, no qual se indicou que 21% destas não estavam adequados à IN 51 para CBT e 11,1% para CCS, caso os limites máximos de 1.000.000 unidades formadoras de colônias (UFC/mL) para CBT e de 1.000.000 (células/mL) para CCS do leite. Dessa forma, para o limite de 100.000 ufc/mL e 400.000 células/mL, inicialmente previsto para 2011, a não conformidade seria de 71,6% dos produtores para CBT e 39,5% em CCS (BRASIL, 2002). Os estudos focados na avaliação da evolução da qualidade do leite no Brasil apresentam-se concentrados na região Sul do país. Paula et al. (2004) avaliaram 257.540 amostras de leite de tanques, provenientes de 32.590 rebanhos de 18 indústrias de laticínios, localizadas nos Estados de Santa Catarina, Paraná e São

Paulo, no período de janeiro de 1999 a novembro de 2001. A média para a CCS foi de 486.812 células/mL. Detectou-se grande variação da CCS entre as microrregiões, sendo a maior e menor médias ajustadas para CCS de 602.000 e 242.000 células/mL, respectivamente. Os autores observaram a maior média de CCS no mês de janeiro (497.000 células/mL) e a menor no mês de setembro (442.000 células/mL), sendo que, 64,6% das amostras analisadas apresentaram escore cinco ou maior.

Em 2009 produtores de Santa Catarina foram avaliados por Winck e Thaler Neto (2009) a partir da aplicação de questionários e coletas de leite dos tanques. Os perfis traçados a partir da pesquisa qualitativa foram correlacionados à adequação das propriedades aos limites máximos estabelecidos pela Instrução Normativa 51 (IN 51), considerando contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS). Os autores constataram que para os 166 produtores entrevistados, o percentual de não conformidade para CCS do leite (acima de 1.000.000 UFC/ml) foi de 11,3%, e para CBT (acima de 1.000.000 UFC/ml de leite) foi de 73,1%. Foi reportado neste estudo que a maioria das propriedades leiteiras se adequa aos limites de CCS, mas não aos de CBT, independente da dimensão, da pecuária leiteira ser a principal atividade econômica, do nível de conhecimento destes sobre as normas brasileiras de qualidade do leite e da satisfação dos produtores com esta atividade. Tais autores consideraram rígidos os níveis estabelecidos pela IN 51, inferindo maior dificuldade de adequação destas propriedades.

Em 2012, um estudo realizado por Miller e Nessi (2012) avaliou amostras de leite coletadas em 23 propriedades, das quais se constatou que no quesito composição do leite e CCS, 82,6% destas propriedades não atendiam aos padrões exigidos pela IN 51. Considerando o limite máximo de 400 mil células somáticas/mL, 73,91% das amostras apresentaram-se irregulares. Os autores atribuíram esses índices de reprovação à deficiência no manejo sanitário e de ordenha, principalmente em médias propriedades, ou seja, falhas de manejo no momento da ordenha, higienização incorreta do ambiente e equipamentos utilizados na ordenha, além da falta de conhecimento das medidas de controle e prevenção da mastite. Neste mesmo ano, Rosa e Queiroz (2012) avaliaram a composição, CCS e teor de nitrogênio ureico (NU) do leite em 69 amostras de leite de tanques de expansão e 3.517 de vacas individualmente em três sistemas distintos de produção

(especializado, semiespecializado e não especializado). Estes autores concluíram que 42% das amostras de leite dos tanques de expansão e 11% das individuais atenderam aos limites recomendados pela IN51 para a região Sul do Brasil, entre 2009 e 2010. Concluíram também que a CCS do tanque é eficiente para inferir sobre a qualidade do leite do rebanho, pois a CCS das vacas doentes é mascarada pela CCS ideal apresentada pelas vacas sadias.

Em Minas Gerais, a evolução anual da qualidade de leite cru refrigerado fornecido a uma empresa beneficiadora, foi avaliada a partir do levantamento do banco de dados das análises individuais de leite dos tanques refrigeradores, entre abril de 2002 a dezembro de 2008. Com base nos limites propostos pela IN 51 para 2008, no quesito CBT (UFC/mL) no ano de 2002, 74,3% das amostras de leite analisadas apresentaram-se dentro dos limites, índice que subiu para 85,8% em 2008. Para CCS, o índice de conformidade com a IN 51 em 2002 foi de 93,5%, com redução para 90,1% em 2008. Para composição do leite, os índices foram de 95,2% para teores de gordura, 98,2% de proteína e 89,6% de extrato seco desengordurado (ESD). De acordo com os autores, a melhoria dos índices de qualidade do leite cru seria mais eficiente após a introdução de um sistema de pagamento por qualidade do leite (PAIVA et al. 2012).

2.3 Aspectos da produção de leite com qualidade e rentabilidade

Segundo Dürr (2004), a qualidade do leite pode ser dividida em integridade e composição. Entende-se por leite de boa qualidade, o produto que seja íntegro, ou seja, livre de patógenos, sem adição de substâncias tóxicas ou remoção de componentes, sem deterioração física, química ou microbiológica. Pois, além do valor nutricional, a composição do leite está relacionada composição do leite define o valor nutricional e o rendimento industrial nos derivados. A melhoria da qualidade do leite pode ser realizada, ainda na glândula mamária, a partir da manipulação da composição (nutrição animal) e através práticas de controle e prevenção de mastite. Porém após a ejeção do leite, não há possibilidade da melhoria da qualidade, mas apenas formas de reduzir as contaminações e deterioração das características físico-químicas até a indústria.

A IN 62, de 29 de dezembro de 2011, define leite como “produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem

alimentadas e descansadas”. Sendo o aspecto físico definido por “líquido branco opalescente homogêneo, com sabor e odor característicos”. Preconiza-se ausência de sabores e odores adversos para o leite cru refrigerado, o qual se deve apresentar isento de sabores e odores estranhos, ausente de neutralizantes da acidez e reconstituintes de densidade. Para a composição, deve-se ter o teor original de gordura/ 100g de no mínimo de 3,0; densidade relativa entre 1,028 a 1,034 (15/15 C g/mL); acidez titulável entre 0,14 a 0,18 (g ácido láctico/100 mL); extrato seco desengordurado de no mínimo 8,4 (g/100g); índice crioscópico entre $-0,530^{\circ}\text{H}$ a $-0,550^{\circ}\text{H}$ (equivalentes a $-0,512^{\circ}\text{C}$ e a $-0,531^{\circ}\text{C}$) e teor de proteínas de no mínimo 2,9 (g /100g) (BRASIL, 2011).

Os microrganismos mesófilos aeróbios são considerados indicadores de qualidade da matéria prima ou alimento processado, e englobam a maior parte das bactérias acidificantes do leite, produtoras de ácido láctico. Tais bactérias estão envolvidas no processo de degradação do leite cru produzido (NASCIMENTO e SOUZA, 2002). Outro grupo de microrganismos também está relacionado com a degradação dos componentes do leite, principalmente proteínas e carboidratos, após a refrigeração. Estes são classificados como psicotróficos, apresentando temperatura ótima de crescimento ao redor de 20°C , porém, com capacidade de crescer entre 0 a 7°C , ou seja, em alimentos refrigerados. Dentre os gêneros de microrganismos nesta classificação estão: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Serratia* (SILVA et al, 2010). A proporção aceita para psicotróficos é de no máximo 10% dos microrganismos totais (BRASIL, 1976). A *E. coli* foi classificada como indicador de contaminação fecal apenas em alimentos crus (SILVA et al, 2010). Não há legislação vigente definida para contagens de coliformes em leite cru, dessa forma, a recomendação de Philpot e Nickerson (2002) é de valores abaixo de 10 NMP/mL, sendo a faixa entre 10 e 100 NMP/mL considerada aceitável por estes autores.

Outro indicador que tem sido utilizado em larga escala no controle da qualidade do leite é a CCS, a qual é composta por células (epiteliais ou de defesa) presentes no leite. Dessa forma, a CCS é considerada como indicativo de ocorrência de mastite no rebanho (RIBAS, 1999). A CCS obtida a partir de uma glândula mamária considerada saudável, ou seja, livre de inflamação, é de até 200.000 células/mL de leite (SANTOS e LARANJA, 2007). A higiene precária no manejo de ordenha, os altos índices de mastite, deficiências na manutenção e desinfecção dos

equipamentos, refrigeração ineficiente ou inexistente e ausência de treinamento da mão de obra são fatores que estão estritamente relacionados com os prejuízos na qualidade, tanto do leite cru, quanto de seus derivados (SANTANA et al., 2001).

Segundo Santos e Fonseca (2007), a inflamação da glândula mamária, denominada mastite, ocorre em resposta à invasão por bactérias, algas, fungos ou leveduras, através do canal do teto, para neutralizar as toxinas e regenerar o tecido do epitélio secretor. A mastite é classificada, conforme a forma de apresentação, em contagiosa e ambiental. As características predominantes da mastite contagiosa são a manifestação primordial na forma subclínica, durante um longo período, o aumento significativo na CCS do tanque e a necessidade de testes específicos para detecção, como por exemplo, o CMT (*Califórnia Mastitis Test*) e WMT (*Wisconsin Mastitis Test*) (SANTOS e FONSECA, 2007).

A característica contagiosa é devida ao tipo de microrganismos causadores, os quais são colonizadores do canal e superfície da pele e dos tetos. Dessa forma, a transmissão ocorre via teteiras, mãos dos ordenhadores, panos e demais utensílios utilizados durante o processo de ordenha. Os principais agentes causadores são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactie*, *Mycoplasma bovis* e *Corynebacterium bovis*. A mastite ambiental tem como características principais a manifestação clínica dos casos, pela apresentação de grumos no leite, endurecimento e coloração avermelhada da glândula mamária, febre, perda de apetite e morte do animal. Os agentes causadores estão presentes no ambiente, em locais onde há acúmulo de fezes, urina, barro e camas orgânicas, ou seja, a contaminação ocorre quando há condições irregulares de higiene e manejo dos animais. Os patógenos envolvidos primordialmente são os coliformes (*E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia* sp.) e estreptococcus ambientais (*S. uberis* e *S. dysgalactie*) (SANTOS e FONSECA, 2007).

A redução na quantidade do volume produzido e a perda da qualidade do produto final são os fatores que tornam a mastite a principal doença mundial em rebanhos leiteiros no que se refere a perdas econômicas para o produtor (HOGEVEEN et al., 2011). De acordo com Santos e Fonseca (2007), 15% da produção brasileira (3,3 bilhões de litros de leite ao ano) é reduzida em decorrência da alta prevalência de mastite. A mastite clínica apresenta custo médio por caso de US\$ 100,00, sendo a redução da produção responsável por US\$ 55,00, descarte do leite por US\$ 35,00, medicamentos por US\$ 12, serviços veterinários por US\$ 2,00 e

serviços extras por US\$ 3,00. Pode-se notar, portanto, que a perda por redução na produção é o prejuízo mais significativo economicamente (MILLER et al., 1993; SANTOS e FONSECA, 2007).

O controle da mastite é baseado na eliminação das infecções detectadas no rebanho, prevenção de novos casos e o rigoroso monitoramento da glândula mamária. Em 1996, na Inglaterra, foi desenvolvido pelo *National Institute of Research in Dairying* (NIRD) o programa de cinco pontos, o qual tem como foco a utilização adequada do equipamento de ordenha, utilização de desinfecção dos tetos pré e pós ordenha, identificação e tratamento de todos os casos clínicos, terapia em vacas secas, descarte e segregação de animais com mastite crônica. O fornecimento de ambiente limpo e confortável, nutrição balanceada, adequado uso da antibioticoterapia, coleta de dados para monitoramento da saúde da glândula mamária e amostragem periódica do leite são tópicos incluídos nos programas de controle de mastite mais recentes (SANTOS e FONSECA, 2007).

2.4 Segurança dos alimentos

2.4.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é o microrganismo mais comum do trato intestinal humano e dos demais animais endotérmicos. Pertencente à classe dos coliformes e à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo gram negativo, aeróbio facultativo, não esporulado, flagelado e móvel, fermentador de lactose com formação de gás à 35°C (TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CHRISTINE, L. C., 2012).

Esta bactéria foi descrita pela primeira vez pelo médico pediatra Theodor Von Escherich em 1885, a partir de isolados em amostras de fezes de crianças, sendo denominada "*Bacterium coli commune*". Foram então avaliadas as características de fermentação de carboidrato e produção de gás em meio anaeróbio. Em 1909, Escherich descobriu associação de coliformes com infecções intestinais agudas contagiosas, e isolamento frequente da *B. commune* em amostras de urina de crianças com sintomas de infecção (SHULMAN et al., 2007). A *E. coli* foi considerada indicador de contaminação fecal quando encontrada na água e alimentos crus em 1892 na Austrália e em 1895 nos EUA. A denominação foi revista em 1915, devido aos coliformes não serem habitantes obrigatórios do trato

digestório e estarem presentes no ambiente, sendo comuns em locais de processamento de alimentos e com potencial de crescimento em alimentos refrigerados. Devido a estes fatos, a *E. coli* foi classificada como indicador de contaminação fecal apenas em alimentos crus, indicando nos alimentos manufaturados contaminação pós processamento ou deficiência nos processos térmicos (SILVA et al, 2010).

A patogenicidade deste agente só foi reconhecida em 1982, quando o sorotipo O157 foi associado a surtos de colite hemorrágica (RYLEY et al, 1983; RANGEL et al, 2005). Em 1994, a *E. coli* O157 tornou-se uma infecção nacional de notificação obrigatória nos Estados Unidos (MEAD et al, 1999; RANGEL et al, 2005). Segundo Gyles (1994) e Kuhnert et al. (2000), pode-se isolar diversas estirpes de *E. coli* comensais e pertencentes a diversos sorotipos em amostras de fezes de seres humanos e animais saudáveis. Dessa forma, a eliminação destes microrganismos no ambiente pode ocasionar a contaminação dos alimentos de origem animal e vegetal, além dos reservatórios de água. No caso da *E. coli*, o mecanismo responsável pela patogenicidade é considerado complexo, devido à presença de muitos fatores, os quais variam de acordo com a classificação dos sorogrupos. Dessa forma, a presença de um fator de virulência único não é capaz de definir uma estirpe como patogênica (CASADEVALL, 1999; KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000). Muitos dos genes de virulência desta bactéria estão localizados nos plasmídeos e fagos, dessa forma há possibilidade de troca de genes entre as estirpes (MUHLDORFER; HACKER, 1994; KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000).

De acordo com a presença dos fatores de virulência, as estirpes patogênicas de *E. coli* têm sido divididas em Enterotoxigênica (ETEC), Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de Shiga Toxina (STEC), Enterohemorrágica (EHEC), Enteroinvasiva (EIEC), Enteroagregativa (EAEC) e Difusamente aderente (DAEC) (LIOR, 1994; HUNTER, 1997). Alguns fatores de virulência são caracterizados por estruturas antigênicas presentes na morfologia externa da bactéria. Tais estruturas são compostas pelos antígenos somáticos (Öhne - "O"), capsulares (Kapsel - "K"), flagelares (Hauch - "H") e fimbriais ou "pilis" (Fímbria - "F"), os quais seguem a classificação de Kauffmann de 1947 (CAMPOS e TRABULSI, 2002).

Outro fator de virulência comum às *E. coli* patogênicas é a presença de genes capazes de produzir diversas toxinas. As toxinas *Shiga* (toxinas "*Shiga-like*" ou "verotoxinas") *Stx1* e *Stx2*, codificadas pelos genes *stx1* e *stx 2*, respectivamente,

são produzidas pelo patotipo denominado STEC (*E. coli* produtora de toxina *Shiga*). Após a entrada do patógeno no organismo, *Stx1* e *Stx2* produzem resíduos nos ribossomos da célula hospedeira, os quais bloqueiam a ligação aminoacil-tRNA e inibem a síntese de proteínas (SAXENA; O'BRIEN; ACKERMAN,1989; KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000). Segundo Beutin et al. (1995) e Cortés et al. (2001), além da presença de um dos genes *stx1* e *stx 2*, a alta patogenicidade da EHEC (subgrupo do patotipo STEC), é definida pelo gene denominado *eae*, que codifica a proteína de membrana adesina intimina. Tal proteína confere capacidade de aderência às células hospedeiras. Este patotipo causa lesão nas vilosidades do intestino conhecida como “*Attaching and effacing*” ou em forma de cálice. Schmidt et al. (1995) e Cortés et al. (2001) afirmam que a EHEC também possui o gene *ehxA*, que codifica a hemolisina-enteroemolisina. A intimina adesina fimbrial (*eae*), responsável pela adesão íntima em células epiteliais é comum para as estirpes de EPEC e EHEC, dessa forma, a lesão “*Attaching and effacing*” é típica para ambas. As EPEC não produzem nenhuma enterotoxina ou citotoxina (CROXEN e FINLAY, 2010).

Segundo Gyles e Barnum (1969) e Kuhnert et al. (2000), as toxinas termo-lábil *LTI* (gene *eltIA*) e *LTII* (gene *eltIIA*) são encontradas em ETEC. A toxina *LTI* atua no bloqueio da enzima adenilato ciclase nos enterócitos ativos e aumenta a concentração de AMPc (Monofosfato cíclico de adenosina) nas células, desregulando o controle de absorção de água e eletrólitos. A toxina *ST* se liga à superfície dos enterócitos e causa desativação da guanilato ciclase e acúmulo de GMPc (monofosfato cíclico de guanosina). O acúmulo de GMPc ocasiona a perda de eletrólitos como os íons de cloreto e a água (NATARO; KAPER,1998; KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000). Ambas as toxinas causam alteração da homeostase e ocasionam secreção intestinal e diarreia. *ST* mantém a atividade tóxica após incubação a 100°C durante 30 minutos, enquanto a *LT* perde atividade sob estas condições (DUBREUIL, 1997; GULHAN et al., 2009).

O patotipo EAEC é caracterizado pela adesão às células hospedeiras, que envolve a formação de um empilhamento de células mediadas pelos genes que se encontram no plasmídeo *pAA*. Estes plasmídeos codificam genes responsáveis pela formação de fímbrias de adesão agregativa (AAFS), as quais auxiliam a fixação à intestinal mucosa (HARRINGTON et al., 2005; CROXEN e FINLAY, 2010). A colonização por EAEC ocorre nos intestinos delgado e grosso e pode levar à

inflamação do cólon. De modo geral, a diarreia causada é aquosa, porém pode ser acompanhada por muco ou sangue (NATARO e KAPER, 1998; CROXEN AND FINLAY, 2010).

Rangel et al. (2005), a partir da avaliação de dados de notificações nos Estados Unidos entre os anos de 1982 e 2002, constataram 350 surtos relatados em 49 estados, representando 8.598 casos de infecção por *E. coli* O157. Com total de 1.493 (17,4%) internações, 354 (4,1%) casos de síndrome hemolítica urêmica (SHU) e 40 (0,5%) óbitos. Este estudo concluiu que dos 350 surtos, 183 (52%) foram transmitidos por via alimentar, 74 (21%) por via desconhecida, 50 (14%) de pessoa a pessoa, 21 (6%) por contato com água contaminada, 11 (3%) por contato com animais, 10 (3%) por água potável, e 1 (0,3%) de transmissões relacionadas com manipulação em laboratório. Dos 40 surtos relacionados com a preparação da carne moída, 27 (68%) estavam ligados a hambúrgueres e 5 (13%) a molho de carne. O último relato associado aos hambúrgueres de restaurantes *fast-foods* foi em 1995. Sete surtos foram associados com produtos lácteos, dentre eles, 4 foram causados pelo consumo de leite cru e os demais devido à coalhada de queijo e manteiga manufaturados a partir de leite cru.

Em 2011, surgiu na Alemanha e países vizinhos o sorotipo O104: H4, híbrido dos patótipos EHEC e EAEC, causando surto com aproximadamente 2.987 casos de gastroenterite, 855 de SHU e a morte de 54 pacientes. Esta estirpe foi considerada como híbrida, pois possuía o gene de virulência *aggR* da *E. coli* EAEC e o *stx2* da EHEC, uma combinação raramente detectada anteriormente. O reservatório natural desta estirpe não foi definido, porém a suspeita de contaminação foi por brotos de feijão (BUCHHOLZ et al, 2001; CABAL et al, 2015).

A recombinação dos genes entre *E. coli* encontradas em um determinado ambiente pode conduzir ao surgimento de novas estirpes do patótipo EHEC com características de virulência similares ao sorotipo O104:H4. Dessa forma, o monitoramento dos genes de virulência é uma ferramenta para detecção de novos patógenos (KARCH et al, 2012; CABAL et al, 2015). Souza et al. (2002) realizaram estudo do perfil de diarreias agudas no Brasil, no Estado de São Paulo e reportaram que das 105 bactérias isoladas, 90 eram *Escherichia coli* (EPEC 27, DAEC 24, ETEC 21, EAEC 18), sendo considerada como o agente mais frequente. Dos seis patótipos existentes, a EPEC foi isolada com maior mais frequência (27 cepas) que as outras. Detectou-se a presença dos fatores de virulência *eaf*, *bfp* e *eae* em 60%

destas cepas (EPEC típicas). Neste estudo, mesmo entre as crianças que apresentavam fezes sanguinolentas, não foram encontradas cepas de EHEC. Aly et al. (2014) realizaram estudo em 110 amostras coletadas em um hospital infantil no Cairo, Egito, com isolamento de *E. coli* em 100 (91%) amostras.

2.4.2 *Escherichia coli* na produção de leite e derivados

Os ruminantes são considerados por Gyles (2007) como principal reservatório da STEC. De acordo com Tortora et al. (2012), aproximadamente 2 a 3% dos bovinos apresentam *E. coli* STEC no intestino. Este fato é relacionado ao tipo de alimentação fornecida aos animais tanto na produção de carne, quanto na produção de leite. As dietas de alto teor de grãos afetam o equilíbrio do pH ruminal, o que causa colonização do trato digestório com STEC, já que são resistentes à acidez. Em estudo na Bélgica, foi realizada amostragem da sola de galochas em 180 propriedades, entre produtoras de leite e carne. Obteve-se prevalência de 37,8% (68 de 180 fazendas) de *E. coli* O157, sendo os maiores valores detectados em fazendas leiteiras (61,2%, 30 de 49 fazendas) (COBBAUT et al., 2009; FARROKH et al, 2013).

Heuvelink et al. (1998) afirmam que a excreção de STEC pelos ruminantes pode ser esporádica. No entanto, Gyles (2007) afirma que a excreção também pode ocorrer durante alguns meses. Para Wood et al. (2007), as condições das instalações que abrigam os animais influencia na excreção de *E. coli*. Além disso, condições fisiológicas do animal, como a idade (ELLIS-IVERSEN et al., 2008) e a saúde do animal (BYRNE et al., 2003) também podem ter efeitos na eliminação da bactéria (FARROKH, 2013).

Duas vias de contaminação por *E. coli* no leite cru, principalmente do patotipo STEC, podem ser consideradas primordiais. A primeira delas é a rara mastite subclínica causando excreção pelo úbere. A segunda é a contaminação fecal, que ocorre pela excreção das fezes possivelmente contaminadas, com as quais as teteiras podem ter contato e promover consequente contaminação do leite durante o processo de ordenha (HUSSEIN e SAKUMA, 2005; FARROKH et al, 2013).

Os genes *stx2*, *aggR*, *wzxO104*, *fliCH4*, presentes na estirpe híbrida O104:H4 relacionada ao surto alemão de 2011, foram encontrados por Cabal et al. (2015) em amostras fecais oriundas de animais de abatedouros próximos aos locais do surto.

Um Estudo realizado em 859 fazendas, em 21 estados dos EUA, detectou em 199 das amostras (23%) o gene que codifica *eaeA* intimina, fator de virulência associados às formas enteropatogênicas e EHEC. Obteve-se baixa incidência de O157:H7 no leite dos tanques, mas apesar disso, há chances de outras formas enteropatogênicas estarem presentes. Dessa forma, constatou-se que a detecção por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para fatores de virulência associados à patogenicidade de *E.coli* constitui uma forma de detectar potenciais perigos no leite cru (KARNS et al., 2007).

Kaipainen et al. (2002) realizaram análises de identificação molecular de genes de virulência em *E. coli* isoladas de amostras de leite de animais com mastite clínica originárias da Finlândia e da Índia. Pelo menos um gene de virulência foi encontrado em 79 (49%) e 48 (42%) respectivamente. Em estudo realizado no Irã, por Ghanbarpour e Oswald (2010), foi observado que dos 127 isolados de *E. coli*, 47 (37%) possuíam pelo menos um gene de virulência. Nenhum dos isolados continha os genes para *F17a-A*, intimina e fímbrias P ou S. A presença de um total de 78 genes de virulência de *E. coli* foi avaliada em amostras de leite mastítico por Blum e Leitner (2013), porém não foram detectados padrões de virulência.

2.5 Educação sanitária na produção de leite

Santos et al. (2003) elaboraram um programa de educação sanitária para produtores familiares na região de Pirassununga/SP, a partir do diagnóstico inicial das propriedades, participação ativa dos produtores envolvidos, avaliação de dados qualitativos e quantitativos coletados ao final do processo educativo. Dessa forma, foi possível perceber transformações na visão dos produtores acerca da qualidade do leite. A produção de leite com qualidade passou a ser considerada como possibilidade de desenvolvimento da produção local. Com relação aos indicadores de qualidade, após a implantação do programa foram diagnosticadas significativas reduções médias, de 11,6% na CBT e 9,3% para CCS.

Devido à importância da produção de alimentos seguros, foi determinado um sistema de controle dos processos de produção, com o objetivo de garantir a idoneidade e qualidade dos produtos finais, caracterizado como Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (SOARES et al., 2002). Este sistema foi criado

pela companhia Pillsbury, a partir da solicitação da NASA, com o intuito de garantir a inocuidade dos alimentos que seriam consumidos pelos astronautas em missões no espaço. Foi adotado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1971, com o intuito de regulamentar a indústria produtora de alimentos de baixa acidez (GARCIA, 2000). No Brasil, a Portaria 1498 do Ministério da Saúde estabeleceu, a partir de 1994, a implantação de APPCC nas indústrias alimentícias (BRASIL, 1993). Para o estabelecimento de um sistema de APPCC devem ser considerados os seguintes critérios: identificação dos perigos potenciais; determinação dos pontos críticos de controle (PCC); estabelecimento dos limites críticos para cada item avaliado; implantação de rotina de monitoramento; determinação de ações corretivas; adoção de sistema de registro das ações adotadas; e estabelecer um sistema de avaliação do APPCC (CEZARI e NASCIMENTO, 1995; SPEXOTO; OLIVEIRA; OLIVAL 2005).

A implantação de um sistema APPCC foi realizada em fazenda produtora de leite A no interior de São Paulo, mediante avaliações dos índices de mastite no rebanho e contagens de células somáticas, além de contagens de mesófilos, psicotróficos e coliformes fecais em amostras do tanque de refrigeração. Para CCS e casos de mastite não foram detectadas reduções efetivas, somente foi obtida redução significativa no número de quartos infectados e no escore de mastite subclínica pelo CMT. As contagens de mesófilos e psicotróficos também não apresentaram alterações significativas, apenas para coliformes fecais os valores apresentaram redução significativa. Os autores concluíram que a aplicação do APPCC possibilitou melhoria nas condições sanitárias nesta unidade produção de leite A (SPEXOTO; OLIVEIRA; OLIVAL, 2005).

Em 19 municípios da região central do Paraná, Vallin et al. (2009) realizaram implantação de práticas higiênicas e sanitárias. Foram analisadas 46 amostras de leite cru, sendo 32 de propriedades com ordenha manual e 14 com ordenha mecânica. Os índices de CBT apresentaram valores 87,90% menores nas propriedades com ordenha manual, e 86,99% nas propriedades com ordenha mecânica, quando comparados com o período anterior ao início das práticas. Os autores concluíram que o nível tecnológico da ordenha não implica, necessariamente, em leite de melhor qualidade, pois os valores médios de CBT oriundos de ordenha mecânica foram cerca de três vezes maiores do que os encontrados em ordenhas manuais, antes e após as práticas. No parâmetro CCS, 13,04% das propriedades estavam fora dos limites permitidos pela IN 51. As

reduções na CBT foram mais representativas do que as observadas na CCS, após a aplicação do treinamento. De acordo com os autores, Isto pode ser atribuído ao fato de que as práticas reduziram a contaminação microbiana dos tetos, utensílios e equipamentos de ordenha.

A eficiência da utilização de práticas higiênicas no manejo de ordenha foi avaliada por Yamazi et al. (2010), com base no monitoramento das contagens de aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes totais e *Escherichia coli*. Os autores demonstraram que mesófilos e psicrotróficos foram os principais agentes contaminantes encontrados nos tetos e amostras de leite. Quanto à higiene, observaram que a aplicação de cloro na desinfecção dos tetos das vacas e utensílios de ordenha após o processo foram eficientes na redução da contagem de microrganismos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o impacto da educação sanitária e treinamento em manejo de ordenha para produtores e funcionários, de acordo com a Instrução Normativa 62, sobre a ocorrência de patógenos causadores de mastite e parâmetros de qualidade do leite produzido em fazendas da região nordeste do Estado de São Paulo.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a adequação das propriedades aos parâmetros de qualidade exigidos pela IN 62;
- b) Avaliar os parâmetros de qualidade exigidos pela IN 62 (CBT, CCS e resíduo de antibióticos) em amostras de leite dos tanques de refrigeração, antes, durante e após a educação sanitária dos funcionários;
- c) Avaliar a condição higiênica da ordenha das propriedades pelo monitoramento de mesófilos, psicotróficos, coliformes a 35°C, coliformes a 45°C e *Escherichia coli* nas amostras de leite cru nos tanques de refrigeração, amostras compostas de vacas, teteiras e equipamentos, e amostras de água das propriedades, antes, durante e após a educação sanitária dos funcionários;
- d) Isolar e identificar genotipicamente patótipos de *Escherichia coli* em amostras de leite do tanque e amostras compostas de vacas, suabes de teteiras e equipamentos, e amostras de água das propriedades.
- e) Inferir sobre a eficiência da educação sanitária dos funcionários nas fazendas avaliadas.

4. HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo é de que a educação sanitária nas pequenas propriedades da região de Pirassununga/SP reduzirá os níveis de contaminação por coliformes totais, coliformes fecais, *Escherichia coli*, mesófilos e psicrotróficos durante o processo de obtenção e armazenamento do leite.

5. MATERIAL E MÉTODOS

As etapas de seleção das fazendas, caracterização das propriedades e da qualidade do leite, coleta de amostras, educação sanitária, monitoramento dos índices de qualidade, análises de composição e contagens de mesófilos e psicotróficos foram efetuadas em conjunto pelas alunas Marisa Matias de França e Rocio Elizabeth Contero Callay, em projetos com objetivos finais diferentes, mas com análises comuns.

5.1 Seleção das fazendas

A seleção das fazendas foi realizada com base no levantamento de dados acerca da produção de leite média mensal, número de vacas em lactação e sistema de ordenha. Priorizou-se a produção de leite como atividade principal na renda da propriedade, rebanhos de até 80 vacas em lactação e média de produção de leite média por animal entre 10 e 25 litros, sistema de pastejo semi-intensivo, ordenha mecânica “balde ao pé” ou mecânica “canalizada”. Também foram considerados o interesse e a disponibilidade do proprietário e funcionários em participar das atividades realizadas durante o processo de educação sanitária e a distância máxima de 80 km entre as propriedades e o *campus* da Universidade de São Paulo em Pirassununga/SP.

Após levantamento de dados das propriedades, foi promovida uma reunião a fim de esclarecer os objetivos do estudo e os benefícios da pesquisa, avaliar o comprometimento do proprietário e da equipe de funcionários, além de determinar o tempo estimado de realização das atividades e etapas a serem desenvolvidas. O acordo foi firmado mediante assinatura de um termo de compromisso (Anexo A), no qual foi concedida a utilização dos dados coletados para a pesquisa.

5.2 Caracterização da propriedade e da qualidade do leite

A fase de caracterização das propriedades foi realizada entre os meses de fevereiro e março de 2015, mediante visitas técnicas para apresentação do projeto e coleta de dados a cerca do sistema de produção, infraestrutura da propriedade e manejo de ordenha.

Foram selecionadas quatro propriedades para participação do projeto de educação sanitária, e todas elas permaneceram durante todo o período do estudo. Com o intuito de preservar as unidades produtoras de leite e os respectivos envolvidos, as fazendas foram codificadas como A, B, C e D.

Após o acordo, foi realizada a caracterização do rebanho, do manejo nutricional, reprodutivo, higiênico sanitário de ordenha e instalações. Esta caracterização foi feita a partir da aplicação de questionário próprio, elaborado especificamente para esta finalidade (anexo B). Antes do início do treinamento técnico, no mês de março/2015, avaliou-se a qualidade do leite armazenado nos tanques de refrigeração, eficiência dos processos de sanitização dos equipamentos e utensílios de ordenha, higiene das mãos dos ordenhadores durante a ordenha e qualidade microbiológica da água utilizada na propriedade.

Com base na IN 62, os níveis de contagem de células somáticas (CCS/mL), contagem bacteriana total (CBT/mL) e resíduo de antibióticos foram utilizados como parâmetros para diagnosticar a qualidade do leite produzido nas propriedades. Também se considerou a presença de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* (BRASIL, 2011).

A eficiência dos processos de sanitização dos equipamentos e utensílios de ordenha e higiene das mãos dos ordenhadores foi avaliada a partir dos níveis de mesófilos, psicotróficos, coliformes a 35°C, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* presentes nas superfícies no período antes e depois da ordenha. Para diagnóstico da qualidade da água foram considerados estes mesmos parâmetros.

5.3 Coleta de amostras e monitoramento dos índices de qualidade

Os índices considerados para avaliação da qualidade do leite armazenado no tanque de expansão, eficiência dos processos de sanitização dos equipamentos de ordenha e higiene das mãos dos ordenhadores e qualidade da água foram monitorados mediante coletas realizadas nos meses de maio, junho, agosto, outubro e novembro de 2015. Os períodos de coleta realizaram-se sempre após cada uma das seis fases de treinamento técnico.

No decorrer do estudo, ao início de cada fase de treinamentos, os resultados e recomendações da coleta anterior foram entregues aos produtores e funcionários

durante reunião técnica. Esta prática teve o intuito de promover a troca de experiências e discutir os pontos fortes e fracos da propriedade. A cada visita técnica foi realizado no rebanho o *California Mastitis Test* (CMT) com intuito de treinar os funcionários para inserção deste teste na rotina de ordenha. Os dados referentes ao manejo e índices zootécnicos da propriedade foram atualizados a cada módulo do treinamento para registrar as alterações realizadas pelos produtores.

Para análises de CBT e identificação microbiológica foi realizada a retirada de uma amostra de 500 mL do tanque após agitação por 5 minutos, em frasco esterilizado, com auxílio de concha metálica desinfetada com álcool 70% (DPC, 1991; CASSOLI e MACHADO, 2006).

Para avaliação da eficiência de lavagem de mãos dos ordenhadores e teteiras, foram coletadas amostras das superfícies a partir de suabes estéreis e armazenados em tubos contendo 10 mL de solução de água peptonada 0,1% esterilizada (Himedia, Índia), segundo indicações de Midura e Bryant (2001) e Silva et al. (2010). A amostragem foi realizada antes do início e ao término ordenha.

Para o cálculo das unidades formadoras de colônia (UFC), realizou-se a medição da área interior das teteiras (cm³) e das mãos dos ordenhadores (cm²). A água utilizada para a higienização do local, equipamentos e utensílios de ordenha foi avaliada mediante amostragem de 1 litro, segundo recomendações de Kim e Feng (2001) e Silva et al. (2010), em frasco esterilizado, após esterilização da torneira por flambagem e descarte do fluxo inicial.

As amostras destinadas às análises microbiológicas foram mantidas a temperatura de até 10°C e enviadas ao Laboratório Multiusuário de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP. As amostras destinadas às análises de CCS e composição do leite foram enviadas para a Clínica do leite – ESALQ - USP

5.4 Educação sanitária

A segunda parte do estudo consistiu na realização de reuniões teórico-práticas com os produtores e funcionários das fazendas. Nas reuniões, ocorridas nos meses de abril, junho, julho, setembro, outubro e novembro de 2015, foram abordados os seguintes temas:

- Mastite: definição, agentes causadores, via de transmissão dos patógenos, métodos para diagnóstico da mastite clínica e subclínica durante a ordenha, direcionamento de tratamento específico, métodos de controle e prevenção de novos casos dentro do rebanho;
- Boas práticas de ordenha: realização de preparação do úbere com base na utilização de lavagem dos tetos quando necessário, imersão dos tetos em solução desinfetante, secagem com material descartável, colocação correta de teteiras e imersão dos tetos com desinfetante específico pós ordenha;
- Equipamento de ordenha: correta manipulação dos componentes do equipamento de ordenha, atenção para regulação do sistema de vácuo, tempo de retirada das teteiras do úbere dos animais e períodos de realização da manutenção do conjunto de mangueiras do sistema de leite e vácuo;
- Higienização de equipamentos e instalações: importância da realização de higienização dos equipamentos e utensílios após cada ordenha. Direcionamento da utilização dos produtos nas concentrações, temperatura e tempo ideais;
- Armazenagem e resfriamento do leite: Influência da temperatura (°C) e tempo de armazenamento na proliferação de microrganismos no leite cru refrigerado;
- Qualidade da água: importância do controle das propriedades físico-químicas da água e contagem bacteriana total na melhoria da qualidade do leite e sanidade do rebanho.

Os treinamentos foram realizados utilizando recursos audiovisuais com fotos e imagens, a fim de facilitar o entendimento dos conceitos e dos resultados das coletas. Foram apresentadas placas de cultivos de bactérias, preparadas em laboratório, com as próprias amostras de cada fazenda, para a visualização da contaminação. As atividades de boas práticas de ordenha foram demonstradas nas próprias instalações da propriedade com a participação ativa dos produtores e funcionários para reforçar os conceitos.

5.5 Composição do leite

As concentrações de gordura, lactose e proteína bruta, foram analisadas por absorção infravermelha (Foos, Hillerod, Dinamarca). A contagem de células somáticas (CCS) foi analisada por citometria de fluxo em equipamento optoeletrônico (Foos, Hillerod, Dinamarca). Estas análises foram realizadas na Clínica do leite, pertencente à Escola de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ - USP).

5.6 Análises microbiológicas

Alíquotas de 1 mL das amostras de leite, suabes de mãos e teteiras e água foram utilizadas para se obter a diluição 10^{-1} , a partir da qual foram preparadas em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% estéril as diluições subsequentes, até 10^{-5} , de acordo com a metodologia descrita por Swanson et al. (2001) e Silva et al. (2010).

5.6.1 Contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos

Para contagem de mesófilos, 100 μ L de cada diluição foram semeados em superfície, em duplicata, em meio PCA (Merck, Darmstadt, Germany), com posterior incubação a 37°C por 48h (MORTON, 2001; SILVA et al., 2010). Para psicrotróficos semearam-se em superfície 100 μ L de cada diluição em duplicata, em meio PCA, com incubação a 7°C por 10 dias (COUSIN et al, 2001; SILVA et al., 2010) . A contagem foi realizada com auxílio de uma lupa de contador de colônias manual (Phoenix, Araraquara, Brasil). Para o cálculo de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), foram selecionadas as placas com 20 a 200 colônias. O resultado foi obtido utilizando a fórmula:

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

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 das superfícies de equipamentos de ordenha (teteiras) e mãos dos ordenhadores, 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 da área amostrada, efetuou-se medição prévia da área interna das teteiras (cm³) e mãos dos ordenhadores (cm²) de cada propriedade (SWANSON, 2001; SILVA et al. 2010).

5.6.2 Isolamento de *Escherichia coli*

Para identificar a presença de coliformes a 35°C, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, utilizou-se metodologia descrita por Downes e Ito (2001) e Silva et al. (2010). Alíquotas de 1 mL das diluições de cada amostra foram adicionadas a uma série de três tubos contendo caldo Lauril Sulfato Tryptose (LST) (Himedia, Índia) com incubação a 35°C por 24 horas. Os tubos foram considerados positivos quando observado crescimento (turvação) e produção de gás. Em seguida, realizou-se a transferência de uma alçada de cada tubo positivo para tubos com caldo Verde Bile Brilhante (VBBL) (Acumedia, Lansing, Michigan), com incubação a 35° C por 24 horas para posterior observação de crescimento e produção de gás. De cada tubo positivo, foi transferida uma alçada para tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC) (Himedia, Índia), com incubação a 45°C em banho-maria (Logen Scientific), por 24 horas para confirmação da presença de coliformes coliformes termotolerantes.

Para isolamento de *Escherichia coli*, de cada tubo de EC positivo com produção de gás, transferiu-se uma alçada para placas contendo Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (EMB) (Acumedia, Lansing, Michigan), incubadas a 35° C por 24 horas. Consideraram-se positivas as amostras com desenvolvimento de colônias nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico, das quais 10 foram selecionadas para cultivo em caldo BHI (Acumedia, Lansing, Michigan) a 37°C por 24 h. Após o crescimento, cinco colônias foram congeladas em 20% de glicerol e cinco colônias foram destinadas à identificação molecular de *Escherichia coli*.

5.7 Identificação molecular de *Escherichia coli*

Os isolados de *Escherichia coli* foram destinados à identificação genotípica dos cinco patótipos: Enterotoxigênica (ETEC), Enteroagregativa (EAEC), Enteropatogênica (EPEC), Enteroinvasiva (EIEC) e Enterohemorrágica (EHEC).

As colônias foram submetidas à extração de DNA bacteriano, através da técnica de choque térmico, de acordo com os procedimentos descritos por Chapman et al. (2001). As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos, para posterior descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* em 100 µL de água MilliQ. O *pellet* ressuspendido foi incubado em banho-maria seco a 95°C durante 10 min. e centrifugado por 2 minutos a 20.500 x g. O DNA contido no sobrenadante foi quantificado em espectrofotômetro (Denovix, Delaware, USA) e armazenado a -20°C para posterior utilização.

O DNA foi utilizado no método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) multiplex com *primers* específicos (Invitrogen, Califórnia, USA) para amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes responsáveis pela produção de Fosfatase Alcalina (*PHO – A*, Forward 18,2 nmoles e Reverse 17,2 nmoles) presente em todos os patótipos de *E. coli*, toxina termolábil 1 (*LT1*, F 21,7 e R 17,6 nmoles), toxina termolábil 2 (*LT 2*, F 19,6 e R 23,2nmoles) e toxina termoestável (*ST1*) da ETEC, verotoxina (*VT1* e *VT2*, F 23,5 e R 18,5 nmoles) da EHEC, e o gene que codifica a adesina intimina (*eae*, F 22,4 e R 18,3 nmoles) presente em EHEC e EPEC (Kong et al., 1999). A sequência dos *primers* utilizados e os tamanhos dos respectivos fragmentos aplicados estão disponíveis na Tabela 2.

As amplificações foram conduzidas em um volume de 50 µL contendo 13,5 µL de água deionizada, 0,75 µL de cada *primer*, 25 µL *Gotaq Color Master Mix*, 2X (Promega, Madison, WI, USA) (composto por 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP e 3mM MgCl₂), 1,5µL Formamida 10%, e 1 µL de DNA (250 ng/µL). As amplificações foram efetuadas em termociclador (Esco Swft Maxpro, Pennsylvania, USA), programado para um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 min., seguido de 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 min; anelamento a 52°C por 1 min; extensão a 72°C por 1 min., e extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de reação esperados para estes *primers* são fragmentos de 720, 523, 360, 275 e 175 pares de bases para os *primers* *LT2*, *VT* (*VT1* e *VT2*), *eae*, *LT1* e *ST1*, respectivamente.

Em outra reação foram utilizados os *primers* *Einv*, que detectam o gene *ipaH* do plasmídeo de invasão (*pInv*, F 23,2 nmoles e R 26,0 nmoles) e *Eagg* (F 17,6

nmoles e R 17,6 nmoles), que detecta o gene *aaTa* do plasmídeo pAA da aderência agregativa (AA), presentes na EIEC e EAEC (PASS et al, 2000). As amplificações foram conduzidas em um volume de 25 µL contendo 7,5 µL de água livre de DNAases (DEPC), 1,0 µL de cada *primer*, 12,5 µL de Gotaq Master mix (Promega, Madison, WI, USA) e 1 µL de DNA (250 ng/µL). As amplificações foram efetuadas em termociclador, programadas para 30 ciclos com desnaturação a 92°C por 30s; anelamento a 57°C por 1 min; extensão a 72°C por 1 min., e extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de reação esperados para estes *primers* são fragmentos de 140 e 194 pares de bases para os *primers Einv* e *Eagg*, respectivamente. A sequência dos *primers* utilizados e os tamanhos dos respectivos fragmentos aplicados estão disponíveis na Tabela 3.

Para confirmação dos produtos, foi realizada uma digestão enzimática a partir da técnica de PCR RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) utilizando a endonuclease *HINC II* (Thermo Scientific, Waltham, MA USA). As amplificações foram conduzidas em um volume de 20 µL contendo 13,5 µL de água depeptonada; 2,0 µL de Buffer 10x tango (33mM Tris-acetato pH 7,9; 10 mM Acetato de magnésio; 66mM Acetato de potássio e 0,1 mg/mLBSA) (Thermo Scientific, Waltham, MA USA); 0,5 µL de *Hinc II* (10U/µL) e 4,0 µL de cada amostra amplificada na reação de PCR multiplex. As amplificações foram efetuadas em termociclador, programadas para cinco ciclos a 37°C por 4 horas; e 1 ciclo de 65°C por 20 min. Os produtos de reação esperados para a digestão realizada pela *HINC II* são fragmentos de 334 e 559 para *PHO*, 22 e 153 para *ST1*, 202 e 74 para *LT1* e 282 e 79 para *eae*.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), após coloração com SyberGold (0,1 µL/mL) (Invitrogen, EUA) e visualizados em transiluminador UV (BioAgency). Os tamanhos dos produtos foram determinados pela comparação ao padrão de migração eletroforética de marcadores (Promega, Madinson, EUA) de tamanho molecular de 100 pb para as reações de PCR multiplex e de 50 pb para as reações de digestão enzimática.

Tabela 2. Sequência de *primers* e tamanho dos fragmentos de genes de virulência em *Escherichia coli* na reação um.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento (bp)	Tamanho dos fragmentos após digestão (<i>Hinc II</i>)	Número de acesso dos <i>primers</i>
Fosfatase alcalina (PhoA)	Pho - F	GTGACAAAAGCCCCGGACACCATAAATGCCT	903	344/559	M13345
	Pho - R	TACTGTCATTAGGTTGCGGATTTGGCGT			
Toxina Termoestável 1 (ST1)	ST1 - F	CTTTCCCCTCTTTTAGTCAG	175	22/153	M25607
	ST1 - R	TAACATGGAGCACAGGCAGG			
Toxina Termolável 1 (LT1)	LT1 - F	TTACGGCGTTACTATCCTCTCTA	275	201/74	J01646
	LT1 - R	GGTCTCGGTCAGATGTGATTC			
Toxina Termolável 2 (LT2)	LT2 - F	ATATCATTTTCTGTTTCAGCAA	720	-	M17894
	LT2 - R	CAATAAAATCATCTTCGCTCATG			
Verotoxina 1 (VT1)	VT - F	GAACGAAATAATTTATATGTG	520	-	Z36901
Verotoxina 2 (VT2)	VT - R	CCTGATGATGGCAATTCAGTA			M36727
Attachment and effacement (EAE)	EAE - F	GGAACGGCAGGTTAATCTGCAG	360	282/79*	M58154
	EAE - R	CGAAGCCATTTGCTGGGCGCTC		360**	Z11541

*Fragmento específico da EPEC que sofre digestão pela endonuclease *Hinc II*;

**Fragmento específico da EHEC que não sofre digestão pela *Hinc II*.

Fonte: Adaptado de Kong et al. (1999).

Tabela 3. Sequência de *primers* e tamanho dos fragmentos de genes de virulência em *Escherichia coli* na reação dois.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento (bp)	Número de acesso dos <i>primers</i>
<i>ipaH</i>	Einv -F	TGGAAAACTCAGTGCCTCTGCGG	140	M32063
	Einv -R	TTCTGATGCCTGATGGACCAGGAG		
<i>aaTa</i> do plasmídio pAA	Eagg -F	AGACTCTGGCGAAAGACTGTATC	194	X81423
	Eagg -R	ATGGCTGTCTGTAATAGATGAGAAC		

Fonte: PASS et al. (2000).

5.7.1 Sequenciamento genético

Para confirmação das espécies isoladas, as amostras positivas foram retiradas do gel e purificadas com a utilização do kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Alemanha), segundo instruções do fabricante. As amostras obtidas pela purificação foram enviadas para sequenciamento ao setor de sequenciamento de DNA, no centro de pesquisas sobre o genoma humano e células-tronco do Instituto de Biociências – USP. A etapa de sequenciamento foi realizada pelo método Sanger com auxílio de sequenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer 3100 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, EUA).

5.7.2 Análise Filogenética

Reconstrução filogenética para sequências de 903 nucleotídeos relativas ao gene *PHO* de *Escherichia coli* foram realizadas através do método Kimura 2-parameter, utilizando-se o modelo de substituição *maximum likelihood* com suporte nodal de *bootstrap* para 1000 pseudo-réplicas através do programa MEGA 7.0 (KUMAR et al., 1994), sendo as matrizes de substituição para nucleotídeos o programa MEGA 7.0 (KUMAR et al., 1994) e ProtTest 2 (ABASCAL; ZARDOYA; POSADA, 2005). Para as reconstruções, foram utilizadas sequências de *Escherichia coli* e outros microrganismos representates da Família *Enterobacteriaceae* (*Shigella*, *Klebsiella* e *Citrobacter*) depositadas no GenBank, conforme indicado na Tabela 4.

Tabela 4. Sequências de *Escherichia coli*, *Shigella*, *Klebsiella* e *Citrobacter* do repositório do GenBank.

Cepa	Origem	Código de acesso ao GenBank
<i>E. coli</i> O104:h4 Str C227-11	Dinamarca	CP011331.1
<i>E. coli</i> FAG1	Holanda	CP009578.1
<i>E. coli</i> FHI65	Noruega	NZ_LM996539.1
<i>E. coli</i> K-12 Lac +	China	CP011342.2
<i>E. coli</i> O111:H Str 11128	Japão	AP010960.1
<i>E. coli</i> (PHO) Str. RM45E	EUA	M29667.1
<i>E. coli</i> Sanji Str. Sanji	China	CP011061.1
<i>E. coli</i> StOLav104	Noruega	NZ_LK931534.1
<i>Shigella sonesi</i>	EUA	CP014099.1
<i>Shigella flexneri</i>	China	CP007037.1
<i>Shigella flexneri</i> PWR501	EUA	AF348706.1
<i>Shigella flexneri</i>	China	CP000266.1
<i>K. pneumoniae</i>	Coreia do Sul	CP012754.1
<i>K. pneumoniae</i>	Alemanha	CP011314.1
<i>Citrobacter freundii</i>	EUA	CP007557.1
<i>Citrobacter freundii</i>	China	CP012554.1
<i>Citrobacter freundii</i>	Polônia	AF550415.2

Fonte: GenBank - National Center for Biotechnology Information (NCBI).

6 Análise dos dados

Para avaliação da eficiência do programa de educação sanitária, os dados foram divididos em quantitativos: CCS, contagem de mesófilos, psicrotróficos, coliformes 35°C e coliformes 45°C, e qualitativos: descrição do sistema de produção, manejo de ordenha, e registros das alterações ocorridas nas propriedades ao longo do programa educativo.

Tanto os dados quantitativos quanto os qualitativos foram analisados de forma descritiva. Para os dados de contagem de células somáticas e composição do leite (gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e sólidos totais), foram calculadas correlações desconsiderando o efeito de coleta, utilizando-se o programa SAS, versão 2004.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Descrição das propriedades

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. Todas as propriedades selecionadas possuíam a produção de leite como atividade principal na renda. O número de vacas em lactação foi de no máximo 50 animais, com média de produção de leite por dia em torno de 220 litros e sistema de produção semi-intensivo. A remuneração pelo litro de leite manteve-se em torno de R\$ 0,80 a 0,90, sendo que todas as propriedades estavam vinculadas a laticínios que não possuem programa de bonificação pela composição do leite (gordura, proteínas e sólidos totais) ou por índices de qualidade (CBT e CCS). A idade dos responsáveis pela ordenha variou entre 21 a 43 anos. Os dados gerais das propriedades e rebanhos e informações básicas dos proprietários estão descritos na Tabela 5.

Apenas uma das propriedades possuía sistema de ordenha mecânica canalizada, as demais adotam a ordenha mecânica balde ao pé. A rotina de ordenha era realizada de forma semelhante, duas vezes ao dia, respeitando os horários estabelecidos diariamente e com intervalo médio de 9 horas. Apenas uma fazenda possuía sala de ordenha, nas demais a ordenha era realizada em currais de piso de concreto ou chão batido. As particularidades das instalações podem ser observadas nas Figuras 1, 2 e 3.

Tabela 5. Descrição dos dados gerais das propriedades e respectivos rebanhos, na fase anterior ao início do programa educativo.

Itens avaliados	Propriedade				
	A	B	C	D	
Dados gerais da propriedade e rebanho	Área da propriedade (ha)	120	2,5	21	32,5
	Total de animais no rebanho	130	20	28	19
	Vacas em lactação	50	15	10	9
	Raça dos animais	Girolando	Girolando	Girolando	Holandês
	Sistema de produção	Semi-intensivo	Semi-intensivo	Semi-intensivo	Semi-intensivo
	Origem da Mão de obra	Proprietário e contratada	Contratada	Proprietário e familiar	Proprietário
	Produção média de leite (Litros/dia)	360	230	140	150
	Remuneração pelo litro (R\$/Litro)	0,90	0,85	0,95	1,15
	Bonificação por qualidade	Não	Não	Não	Não
Informações do proprietário	Idade (anos)	35	43	40	21
	Escolaridade	Superior completo (Agronomia)	Superior completo (Eng. Civil)	Ensino médio completo	Superior incompleto (Gestão de agronegócio)
	Tempo de atuação na produção de leite (anos)	2	< 1	2	3
	Reconhecimento da importância da qualidade do leite	sim	sim	sim	sim
	Participação em curso sobre manejo de gado leiteiro	Sim – Qualidade do leite - Nestlé	Sim - Pastagem	Não	Sim - Produção de ruminantes como aluno especial (FZEA USP)

Figura 1. Sala de ordenha com sistema de ordenha mecânica canalizada na fazenda A.



Fonte: Imagem do autor.

Figura 2. Curral com piso de concreto e sistema de ordenha mecânica balde ao pé na fazenda D.



Fonte: Imagem do autor.

Figura 3. Curral de “chão batido” e sistema de ordenha mecânica balde ao pé na fazenda C.



Fonte: Imagem do autor.

No quesito refrigeração, apenas a fazenda D ainda não havia adotado o tanque de expansão, devido baixo volume obtido até o período, a refrigeração do leite era realizada em *freezer*. Esta mesma propriedade distinguia-se das demais devido a forma manual como os equipamentos era lavados, sem a utilização de detergentes específicos. O sistema automático de lavagem está ilustrado na Figura 4. O detergente ácido, direcionado para a remoção dos resíduos de minerais que podem se depositar nos equipamentos, não era utilizado por nenhum dos proprietários. Da mesma forma, não era adotada a prática de lavagem com sanitizante, para remoção específica de contaminações bacterianas.

A propriedade A era a única a utilizar lavagem da sala de ordenha, devido à facilidade do escoamento da água. As que realizam a ordenha em curral utilizavam o método de raspagem das fezes com auxílio de pás. As propriedades A, B e C inseriam a água quente em suas rotinas de higienização de equipamentos, a qual era aquecida com auxílio de resistência elétrica portátil. A água que abastecia a propriedade, destinada tanto ao consumo humano e lavagem de utensílios e equipamentos, tinha origem em poços artesianos (Figura 5) nas fazendas A, C e D, e em nascente na fazenda B. Os demais dados referentes à infraestrutura e higienização dos equipamentos estão descritos na Tabela 6.

Em todas as fazendas, havia o hábito de identificar a mastite clínica antes da ordenha, porém, nenhuma delas o realizava com auxílio da caneca de fundo escuro. Da mesma forma, não havia utilização do teste de CMT para estimativa visual da contagem de células somáticas das vacas do rebanho. Apenas a fazenda C não realizava desinfecção pré ordenha. A secagem dos tetos com papel descartável era efetuada em todas as propriedades. As informações acerca do controle, tratamento e prevenção da mastite e estão detalhados na Tabela 7. O laticínio captador das propriedades C e D recolhia o leite em um período maior do que 48 horas. O envio de amostras de leite para análises microbiológicas ou de composição, por parte dos produtores, não era uma prática rotineira em nenhuma das propriedades.

Figura 4. Sistema automático de lavagem utilizado em ordenha mecânica balde ao pé na fazenda D.



Fonte: Imagem do autor.

Figura 5. Reservatório de água utilizado para abastecimento de água na propriedade A.



Fonte: Imagem do autor.

Tabela 6. Descrição da infraestrutura e aspectos higiênicos dos locais de ordenha das propriedades na fase anterior ao início do programa educativo.

Itens avaliados	Propriedade				
	A	B	C	D	
Ordenha e Infraestrutura	Número de ordenhas	2	2	2	2
	Intervalo de ordenhas (horas)	9	10	9	9
	Sistema de ordenha	Mecânico "fluxo fechado"	Mecânico balde ao pé	Mecânico balde ao pé	Mecânico balde ao pé
	Infraestrutura	Sala de ordenha	Curral - piso de concreto	Curral – chão batido	Curral - piso de concreto
Refrigeração	Tanque de expansão	Tanque de expansão	Tanque de expansão	Freezer	
Higienização dos equipamentos e Local de ordenha	Frequência de lavagem dos equipamentos	Após cada ordenha	Após cada ordenha	Após cada ordenha	Após cada ordenha
	Sistema de lavagem	Automático	Automático	Automático	Manual
	Uso de detergente básico	Sim	Sim	Sim	Não
	Uso de detergente ácido	Não	Não	Não	Não
	Uso de sanitizante	Não	Não	Não	Não
	Uso de água quente	Sim	Sim	Sim	Não
	Frequência de lavagem do local de ordenha	Após cada ordenha	Não lava	Não lava	Não lava
Frequência de lavagem do tanque	Após retirada pelo laticínio	Após retirada pelo laticínio	Após retirada pelo laticínio	Não*	
Água utilizada na higienização de equipamentos	Origem	Poço artesiano	Nascente	Poço artesiano	Poço artesiano
	Tratamento	Não	Não	Não	Não
	Envio de amostras para análise	Sim, análise físico-química	Não	Não	Não

*A propriedade D não possuía tanque de expansão no início do estudo.

Tabela 7. Descrição da infraestrutura e aspectos higiênicos dos locais de ordenha das propriedades na fase anterior ao início do programa.

Itens avaliados	Propriedade				
	A	B	C	D	
Controle e prevenção de mastite	Teste da caneca	Não	Não	Não	Não
	CMT	Não	Não	Não	Não
	Lavagem dos tetos quando necessário	Não	Não	Não	Sim
	Desinfecção pré ordenha	Sim (solução iodada)	Sim (solução iodada)	Não	Sim (solução iodada)
	Desinfecção pós ordenha	Sim (solução iodada)	Sim (solução iodada)	Sim (solução iodada)	Sim (solução iodada)
	Secagem dos tetos	Sim - papel descartável			
Tratamento de mastite	Descarte de leite no período de carência	Sim	Sim	Sim	Sim
	Registro de tratamento de mastite	Sim	Não	Não	Não
	Identificação visual de vacas em tratamento	Não	Não	Não	Não
Informações adicionais	Frequência de captação do leite pelo laticínio (horas)	48	48	Mais de 48 horas	Mais de 48 horas
	Compra de animais	Sim	Sim	Sim	Sim
	Critério de descarte dos animais	Baixa produção /doenças	Doenças	Mastite/outras doenças	Mastite/outras doenças
	Envio de amostras de leite para análise de composição ou microbiologia	Enviava anteriormente	Nunca enviou	Enviou algumas vezes	Nunca enviou

7.2 Educação sanitária

Após o período de diagnóstico, iniciou-se a realização efetiva da educação sanitária, no período de abril a dezembro de 2015. O projeto educacional consistiu em seis módulos, os quais foram realizados em visitas técnicas às propriedades, de forma individual. Este método foi adotado com o intuito de favorecer o aprendizado de todos, pois as informações quantitativas e qualitativas coletadas na fase de caracterização demonstraram considerável disparidade entre as características de rebanho, mão de obra, sistema de produção, infraestrutura e manejo de ordenha. De forma geral, os módulos abordaram os mesmos temas para todos os produtores em cada período, porém, as sugestões feitas consideraram a realidade do sistema e infraestrutura de cada um. Os procedimentos de coleta realizados para caracterização e monitoramento dos índices de contaminações microbiológicas estão ilustrados nas Figuras 6 a 10.

O módulo inicial abordou a inclusão das boas práticas de ordenha e manejo higiênico-sanitário, como responsáveis pela melhoria nas condições de trabalho dos funcionários e no valor agregado ao produto, aumento no rendimento dos derivados e produção de alimentos seguros, livres de riscos à saúde dos consumidores. Também foram apresentados para as fazendas, os respectivos resultados de composição do leite e contaminação microbiológica obtidos na coleta de caracterização. Com o intuito de ilustrar de forma prática a contaminação encontrada em cada ponto de coleta, as placas de Petri com as culturas isoladas foram mostradas aos produtores e funcionários durante a primeira reunião. A Figura 11 apresenta uma placa de cultura bacteriológica utilizada na atividade prática do primeiro módulo.

Figura 6. Procedimento de amostragem do leite armazenado no tanque de expansão da fazenda C, com auxílio de concha metálica esterilizada, para análises de composição, microbiologia e resíduo de antibióticos no leite.



Fonte: Imagem do autor.

Figura 7. Procedimento de obtenção de amostra composta de um dos animais do rebanho da propriedade B, para análise microbiológica.



Fonte: Imagem do autor.

Figura 8. Procedimento de amostragem da superfície da mão do ordenhador da fazenda D, com uso de suabe estéril.



Fonte: Imagem do autor.

Figura 9. Procedimento de amostragem da superfície interna dos equipamentos de ordenha da fazenda D, com auxílio de suabe estéril.



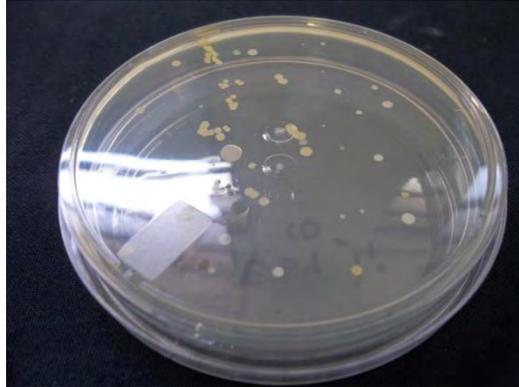
Fonte: Imagem do autor.

Figura 10. Procedimento de amostragem da água utilizada na lavagem de utensílios e equipamentos da fazenda D, com recipiente estéril.



Fonte: Imagem do autor.

Figura 11. Cultura de mesófilos utilizada na demonstração da contaminação dos pontos de coleta nas propriedades envolvidas no projeto educativo.



Fonte: Imagem do autor.

Ao final de cada módulo educativo, foi reservado um período para discussão dos resultados obtidos nas coletas realizadas de forma concomitante às reuniões técnicas, como ilustrado na Figura 12. Esta prática foi adotada com o intuito de expor aos produtores o comportamento dos índices de qualidade e contaminação microbiológica dos pontos de coleta. Nos casos em que foram detectadas melhorias nos índices, houve incentivo para a continuação das atividades, e nos casos de manutenção ou piora dos índices, ocorreram discussões para buscar os pontos críticos do sistema e soluções para os mesmos. Os resultados foram expostos em forma de gráficos de barras, com auxílio de mídia áudio visual. Para facilitar o entendimento, adotou-se sistema de cores para representar a estratificação dos resultados em: “aceitável” = verde; “atenção” = amarelo; e “perigo” = vermelho. Cada um dos três níveis de resultados foram classificados de acordo com a legislação ou recomendação da literatura existente para cada microrganismo e pontos de coletas.

Figura 12. Uso de mídia áudio visual para exposição dos resultados obtidos nas coletas e discussão dos pontos positivos e negativos identificados após observação do manejo.



Fonte: Imagem do autor.

O segundo módulo enfatizou a forma correta de aplicação dos procedimentos higiênicos durante a ordenha, levando em consideração o sistema de cada propriedade. Abordou-se a importância da detecção, controle e prevenção da mastite, desinfecção pré e pós ordenha, procedimentos para tratamento da mastite clínica. Devido ao sistema ordenha “mecânica balde ao pé” ser utilizado em três das propriedades e a única com sistema “fluxo fechado” não possuir extratores automáticos nas teteiras, ressaltou-se a importância da retirada dos equipamentos imediatamente após a observação visual do encerramento do fluxo de leite. Esta medida foi tomada para evitar lesões no esfíncter dos tetos, causadas pelo uso do equipamento após o término da ordenha. Além disso, desde este módulo até o final do projeto educativo, foi realizado treinamento para teste de CMT aos responsáveis pela ordenha, com o intuito de implantar o diagnóstico e controle da mastite subclínica, como representado na Figura 13.

Figura 13. Realização de teste de CMT durante os módulos educativos.



Fonte: Imagem do autor.

O terceiro módulo englobou os métodos de higienização dos equipamentos, considerando as particularidades de cada infraestrutura e sistema de ordenha. Ressaltou-se a importância de detergentes e sanitizantes específicos e o uso correto indicado pelo fabricante de cada marca comercial. Os demais módulos foram utilizados para reforçar os conceitos abordados desde o início do projeto educativo.

Durante todo o processo educacional, estimulou-se a participação ativa de todos os envolvidos na atividade leiteira. Algumas das atividades realizadas são ilustradas nas Figuras 14 e 15.

Figura 14. Participação dos produtores no aprendizado de amostragem de leite destinado às análises de composição e contagem de células somáticas.



Fonte: Imagem do autor.

Figura 15. Funcionários após participação no módulo de boas práticas de ordenha na fazenda B.



Fonte: Imagem do autor.

Ao término das atividades educacionais, realizou-se uma reunião coletiva para encerramento oficial do programa de educação sanitária, com o intuito de promover a difusão do conhecimento a partir da troca de experiências entre os produtores e funcionários de realidades distintas. Além disso, apresentou-se uma média calculada com os índices de qualidade e contaminação dos pontos de coleta de todas as quatro fazendas ao longo dos seus módulos educativos. A média foi

utilizada para preservar a identidade de cada propriedade, auxiliando na ilustração do efeito na qualidade do leite, por parte do programa implementado.

As alterações realizadas por parte dos proprietários nas respectivas fazendas após o início da educação sanitária estão detalhadas na Tabela 8.

Tabela 8. Descrição das alterações ocorridas nas propriedades após a implementação da educação sanitária.

Itens avaliados	Propriedade			
	A	B	C	D
Refrigeração	Tanque de expansão	Tanque de expansão	Tanque de expansão	Tanque de expansão
Sistema de lavagem	Automático	Automático	Automático	Automático
Uso de detergente alcalino	Sim	Sim	Sim	Sim
Uso de detergente ácido	Sim	Não	Não	Sim
Uso de sanitizante	Não	Não	Não	Não
Tratamento da água	Adição de cloro	Não	Adição de cloro	Adição de cloro

A partir do conjunto de sugestões feitas ao longo do programa educativo, foram observadas poucas alterações na infraestrutura e manejo sanitário de ordenha. A propriedade D realizou a substituição do freezer pelo tanque de expansão para a refrigeração do leite. Porém, esta propriedade passou a ter problemas com o congelamento do leite devido à produção inferior a 100 litros obtida em alguns dias. Esta mesma fazenda adquiriu um sistema de lavagem automática para os equipamentos de ordenha e inseriu o uso de detergentes alcalino e ácido. A propriedade A também realizou adoção do detergente ácido para remoção dos resíduos de sais minerais que podem se depositar nos equipamentos de ordenha.

No quesito tratamento da água, devido a nenhuma das propriedades possuírem rede de abastecimento de água tratada, a estratégia encontrada por A, C e D foi a adição de cloro na água dos poços artesianos. Apesar do reconhecimento da necessidade das sugestões realizadas durante o programa educativo, a baixa adesão deve-se, em partes, à ausência de programas de bonificação por qualidade do leite por parte dos laticínios captadores.

7.3 Monitoramento da composição do leite

Os resultados de composição do leite (gordura, proteína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado,) foram correlacionados com a contagem de células somáticas, desconsiderando o efeito de coleta. Como demonstrado na Tabela 9, para o leite dos animais, detectou-se correlação negativa entre CCS e lactose ($p < 0,10$). Ou seja, quanto maior a CCS menor a porcentagem de lactose no leite. Santos e Fonseca (2007) afirmam que os microrganismos como *Lactobacillus*, *Streptococcus* e algumas enterobactérias fermentam a lactose produzindo ácido láctico. Além disso, leite com alta CCS, oriundo de vacas com mastite apresentam menor teor de lactose devido às possíveis lesões causadas no epitélio secretor do animal. Dessa forma, a correlação negativa encontrada entre CCS e lactose pode ser associada à presença de leite mastítico e microrganismos mesófilos no tanque.

Nas amostras de leite cru armazenado nos tanques de refrigeração não foi encontrada correlação significativa entre a CCS e os demais componentes do leite, como ilustrado na Tabela 10. Este fenômeno pode ser justificado pelo fato de o leite armazenado no tanque ser uma mistura de leite sadio e leite oriundo de vacas com mastite subclínica. Ou seja, os componentes afetados pela alta CCS do leite mastítico podem ser compensados pela composição do leite de vacas sadias.

Tabela 9. Correlação entre as médias das contagem de células somática e os componentes do leite das vacas das propriedades avaliadas em seis etapas de monitoramento.

Composição do leite	<i>r</i>	<i>P</i>
Gordura	0,167	0,495
Proteína	0,388	0,101
Lactose	-0,453	0,052
Sólidos Totais	0,156	0,524
Extrato Seco Desengordurado	0,080	0,745

Tabela 10. Correlação entre as médias das contagem de células somática e os componentes do leite dos tanques de refrigeração das propriedades avaliadas em seis etapas de monitoramento.

Composição do leite	<i>r</i>	<i>P</i>
Gordura	0,012	0,961

Proteína	0,239	0,324
Lactose	-0,364	0,126
Sólidos Totais	0,021	0,933
Extrato Seco Desengordurado	0,025	0,920

Considerando os padrões de composição do leite estabelecidos pela IN 62, o leite cru refrigerado deve conter o mínimo de 3% de teor de gordura, 2,9% de proteínas e 8,4 % de extrato seco desengordurado (BRASIL, 2011). Desta forma, a fazenda A manteve todos estes índices acima do mínimo recomendado pela legislação, como evidenciado na Tabela 11. Na fazenda B, os índices de gordura e proteína mantiveram-se dentro do permitido pela legislação em todas as coletas, exceto pelo teor de extrato seco desengordurado (ESD), que estava em 8,3% na primeira coleta (Tabela 12). A fazenda C também manteve os teores de gordura, proteína e ESD dentro do recomendado pela legislação. Somente a fazenda D apresentou teor de gordura de 2,08% na primeira coleta, porém, a partir da segunda coleta, alcançou valores adequados. Tais resultados estão apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Com relação à CCS, a IN 62 estipula o valor de 500.000 células/mL entre os períodos de junho de 2014 até julho de 2016, e 400.000 células/mL a partir de julho de 2016 (BRASIL, 2011). Considerando o limite final de 400.000 células/mL para CCS, a fazenda A apresentava na primeira coleta este índice dentro do limite aceito, porém, experimentou aumento crescente a partir da segunda coleta, variando entre 919.000 células/mL na terceira coleta, e finalizando com 609.000 células/mL. As boas práticas de ordenha e o diagnóstico de mastite faziam parte do manejo diário nesta propriedade. Porém, as recomendações feitas para os animais com mastite subclínica não eram aplicadas por parte dos produtores. Dessa forma, acredita-se que este fato tenha impedido a redução da CCS e até mesmo contribuído para o aumento desta. As variações entre as coletas estão expressas na Figura 11.

Por sua vez, como exposto na Tabela 12, a fazenda B apresentou CCS em todos os períodos de coleta dentro dos padrões preconizados pela IN 62. Esta propriedade desde o início não apresentou registros de mastite consideráveis, e não adquiriu animais de outras propriedades ao longo do projeto de educação sanitária.

Dessa forma, a possibilidade de introdução de patógenos causadores de mastite, não ocorreu.

Os resultados para CCS da fazenda C estão detalhados na Figura 13 e demonstram que desde a primeira coleta estes níveis estavam 368.000 células/mL e se manteve dentro dos limites permitidos até a última coleta, na qual houve pequena elevação para 491.000 células/mL. Nesta propriedade, as indicações para controle da mastite subclínica eram adotadas na maioria dos casos.

Durante o processo de educação sanitária, a importância da nutrição animal para a qualidade composicional do leite (gordura, proteínas, sólidos totais e ESD) foi abordada, porém, não ocorreram interferências no manejo nutricional dos animais.

Tabela 11. Composição do leite armazenado em tanque de refrigeração durante as seis fases de coleta na fazenda A.

Coleta	Componentes do leite					
	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	ST (%)	ESD (%)	CCS (cél/mL)
Caracterização	3,40	3,24	4,30	11,95	8,55	339.000
2	3,42	3,32	4,38	12,15	8,73	515.000
3	3,08	3,44	4,52	12,02	8,94	919.000
4	3,54	3,30	4,34	12,27	8,73	456.000
5	3,33	3,23	4,31	11,93	8,60	725.000
6	3,11	3,11	4,54	11,79	8,68	609.000

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

Tabela 12. Composição do leite armazenado em tanque de refrigeração durante as seis fases de coleta na fazenda B.

Coleta	Componentes do leite					
	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	ST (%)	ESD (%)	CCS (cél/mL)
Caracterização	3,35	2,97	4,45	11,71	8,36	202.000
2	3,71	3,17	4,26	12,16	8,45	269.000
3	3,35	3,16	4,37	11,87	8,52	240.000
4	3,82	3,22	4,55	12,62	8,80	247.000
5	3,08	3,24	4,46	11,80	8,72	229.000
6	3,36	3,03	4,69	12,06	8,70	159.000

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

Tabela 13. Composição do leite armazenado em tanque de refrigeração durante as seis fases de coleta na fazenda C.

Coleta	Componentes do leite					
	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	ST (%)	ESD (%)	CCS (cél/mL)
Caracterização	3,71	3,59	4,38	12,69	8,98	368.000
2	3,78	3,21	4,41	12,45	8,67	183.000
3	3,65	3,14	4,66	12,40	8,75	161.000
4	3,19	3,08	4,65	11,88	8,69	127.000
5	3,38	2,99	4,57	11,91	8,53	259.000
6	3,27	3,19	4,53	11,91	8,64	491.000

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

Tabela 14. Composição do leite armazenado em tanque de refrigeração durante as seis fases de coleta na fazenda D.

Coleta	Componentes do leite					
	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	ST (%)	ESD (%)	CCS (cél/mL)
Caracterização	2,08	3,14	4,58	10,73	8,65	573.000
2	3,25	3,11	4,62	11,93	8,68	180.000
3	3,47	3,21	4,58	12,24	8,77	209.000
4	3,19	3,08	4,65	11,88	8,69	127.000
5	3,38	2,99	4,57	11,91	8,53	259.000
6	3,81	2,97	4,51	12,28	8,47	1.583.000

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

7.4 Monitoramento da contaminação microbiológica

7.4.1 Contagem de microrganismos mesófilos e psicrotróficos

Os dados referentes às contagens de mesófilos e psicrotróficos no leite refrigerado, superfície das teteiras e mãos e água da fazenda A estão dispostos na Tabela 15. Na fazenda A, as contagens de mesófilos totais no leite cru refrigerado apresentaram-se desde a primeira coleta acima de 5 log UFC/mL e apenas nas fases 2 e 3 estas contagens apresentaram reduções. A contagem de psicrotróficos iniciou em 6,7 UFC/mL e diminuiu nas coletas 4 a 6.

Quanto à contaminação das mãos do ordenhador, na fazenda A os resultados da contagem de mesófilos, no momento anterior ao início da ordenha e ao final do processo, foram de 1,0 log UFC/cm² no período de caracterização, porém apresentaram variações que culminaram em aumento das contagens após a finalização do programa sanitário. Nestes locais, a contagem de microrganismos psicrotróficos também foi de 1,0 log UFC/cm², chegando a 2 UFC/cm² na fase final.

Na avaliação da contaminação nos equipamentos de ordenha, a contagem de mesófilos na fazenda A no período antes da ordenha foi de 1 log UFC/cm³ na fase 1 do programa educativo, porém, aumentou até o final do processo. No período pós ordenha, a contagem manteve-se entre 1,0 e 2,0 log UFC/cm³, apresentando elevação no módulo final da educação sanitária. A contagem de psicrotróficos obtida para nas teteiras, antes da ordenha, foi de 1,0 log UFC/cm³ na primeira coleta, aumentou na segunda e reduziu novamente para 1,0 log UFC/cm³ nas fases seguintes.

A contaminação por mesófilos na água da fazenda A também iniciou em 1,0 log UFC/mL na fase 1, com aumento durante o processo e redução a 1,0 log UFC/mL na última coleta. Para os psicrotróficos, na fase 1 obteve-se 4,48 log UFC/mL, reduzindo para 1,0 log UFC/mL em todas as fase seguintes do estudo.

Os dados referentes à fazenda B estão dispostos na Tabela 16. Para a fazenda B a contagem de mesófilos no início do estudo foi de 6,78 log UFC/mL, alternando nas fases seguintes entre aumento e redução de 1 log UFC/mL, mantendo-se semelhante ao início. A contaminação por psicrotróficos manteve-se entre 6,15 e 6,78 log UFC/mL, com redução até o período final.

No quesito contaminação nas mãos de ordenhadores na fazenda B, antes da ordenha, tanto as contagens de mesófilos quanto psicrotróficos estavam em 1,0 log UFC/cm² até a segunda fase do estudo, terminando o estudo em 4,52 e 2,29 log UFC/cm², respectivamente. Nas mãos, depois da ordenha, a contagem de mesófilos manteve-se entre 4,0 e 3,0 log UFC/cm², e entre 1,0 e 2,55 log UFC/cm² para

psicrotróficos. Para as superfícies internas das teteiras, antes da ordenha, a contagem de mesófilos iniciou em 1,0 log UFC/cm³ e permaneceram crescentes até a última fase. Depois da ordenha, os resultados apresentaram aumento contínuo para contagem de mesófilos. Para psicrotróficos, a contagem antes da ordenha manteve-se até a quarta 1,0 log UFC/cm³, coleta e elevou-se até a última fase. No período depois da ordenha, as contagens iniciaram em 1 log UFC/cm³ e levaram-se até a fase final.

A água da fazenda B, nas três primeiras fases da educação sanitária, apresentou contaminação por mesófilos entre 4,11 e 4,40 log UFC/mL, as quais foram reduzidas até a última fase. A contagem de psicrotróficos no início do estudo foi de 3,30 log UFC/mL, diminuindo continuamente até a fase 6.

Os dados referentes às contagens de mesófilos e psicrotróficos da fazenda C estão dispostos na Tabela 17. A propriedade C apresentou 5,59 log UFC/mL de contagem de mesófilos na fase de caracterização e durante o programa observou-se acréscimo. Os psicrotróficos estiveram presentes no leite refrigerado em 1,0 log/mL durante os três primeiros períodos da educação sanitária, aumentando a partir da fase 4 até o fim do estudo.

No que se refere à superfície das mãos dos ordenhadores na fazenda C, antes da ordenha a contagem de mesófilos foi de 3,34 log UFC/cm², elevando-se na fase 4 e diminuindo na fase final. Após a ordenha, os mesófilos mantiveram-se em 2,6 log UFC/cm² até o 5^o período. Os psicrotróficos foram detectados em níveis de 1,0 log UFC/cm² em todos os períodos do estudo, antes e depois da ordenha.

Nos equipamentos da fazenda C, antes da ordenha, foram encontrados valores para mesófilos de 1,0 log UFC/cm³ e aumento na fase final. No momento após a ordenha, as contagens apresentaram-se em 3,15 e 3,19 log UFC/mL fases iniciais, com redução entre a 3^a e 5^a coletas e aumento na fase final. A contagem de psicrotróficos foi de 1,0 log UFC/cm³ em todos os períodos do estudo, antes e depois da ordenha.

Na água da fazenda C, a contaminação por mesófilos foi detectada no início com 6,48 log UFC/mL, havendo redução até o final do programa de educação sanitária.

Os resultados da fazenda D estão dispostos na Tabela 18. A fazenda D foi a única propriedade que iniciou a educação sanitária com valor de contagem de mesófilos na faixa de 6,0 log UFC/mL, havendo redução contínua ao longo das

próximas fases. Os psicotróficos no tanque mantiveram-se em 1,0 log UFC/mL nas três primeiras fases do treinamento, apresentando aumento na última etapa.

Na fase de caracterização, a contaminação por mesófilos na superfície das mãos dos ordenhadores, antes da ordenha, estava em 4,54 log UFC/cm², reduziu nas fases seguintes. Nas mãos depois da ordenha, a contagem iniciou em 2,85 log UFC/cm², e aumentou ao final do treinamento. Já a contagem de psicotróficos manteve-se em torno de 1,0 log UFC/cm² para as mãos, antes e depois da ordenha, em todas as fases do estudo.

Com relação à contaminação de equipamentos, no momento antes da ordenha, a primeira coleta diagnosticou contagem por mesófilos em 3,33 log UFC/cm³, aumento no segundo período e reduções conseguintes até o 6º período. A contagem da superfície das teteadas, no momento após a ordenha foi de 3,7 e 5,84 log UFC/cm³ nas primeiras fases, reduzindo durante o período da educação sanitária, elevando-se na fase final. Para psicotróficos, a contaminação nos equipamentos foi de 1,0 log UFC/cm³ em todas as 6 etapas da educação sanitária, tanto antes quanto depois da ordenha. A água da propriedade D apresentou contaminação constante de 1,0 log UFC/mL.

Para contagem bacteriana total (ou contagem padrão em placa), a IN 62 estipula o valor de 300.000 UFC/mL entre os períodos de junho de 2014 até julho de 2016, e 100.000 UFC/mL (equivalente a 5,0 log UFC/mL) a partir de julho de 2016 (BRASIL, 2011). Considerando os prazos finais da IN 62, todas as propriedades apresentaram contagens elevadas na fase de caracterização, acima do permitido. Estes resultados condizem com os encontrados por Winck e Thaler Neto (2009), que obtiveram 73,1% (121) das propriedades estudadas apresentando CBT acima de 6 log UFC/mL de leite. Guerreiro et al. (2005) detectaram, na fase de caracterização, propriedades com índices de contaminação bacteriana no leite refrigerado na base de 6 log UFC/mL. Vallin et al. (2009) constataram que 21 (45,65%) propriedades submetidas a um programa de práticas higiênicas de manejo apresentaram CBT acima de 6 log UFC/mL.

A fazenda D foi a única propriedade que iniciou a educação sanitária com valor de contagem de mesófilos acima do permitido pela IN 62 e obteve redução contínua ao longo das fases, até enquadrar-se na legislação. As demais propriedades apresentaram reduções, mas não suficientes para estarem conformes com a IN 62.

Santana et al. (2001) evidenciaram que, na propriedade leiteira, as principais fontes de contaminação por aeróbios mesófilos, em ordem decrescente, são a superfície e a água residual de latões, tanques de expansão e tetos mal higienizados. Dessa forma, infere-se que as reduções das contagens de mesófilos no tanque, mãos e equipamentos de ordenha da propriedade D possam ter sido mais efetivas devido às diversas modificações efetuadas pelo proprietário na infraestrutura e manejo de ordenha. Houve substituição do freezer por tanque de expansão e introdução da lavagem automática dos equipamentos, que possibilitou o uso de detergentes específicos no processo de higienização. Além disso, este resultado é compatível com o encontrado por Guerreiro et al. (2005), os quais afirmaram que a propriedade mais engajada ao estudo educacional foi a que obteve reduções mais significativas nas contagens bacterianas.

O Brasil não possui nenhum padrão oficial para contaminação por mesófilos aeróbios em superfícies que tenham contato com alimentos, seja na forma crua ou processada. Dessa forma, utiliza-se como limite os padrões estipulados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), a qual indica o limite de 50 UFC/cm², correspondente a 1,70 log UFC/cm². A falta de limites oficiais atualizados para avaliar superfícies como mãos de manipuladores, equipamentos e utensílios que entrem em contato com a matéria prima, tornam limitada a avaliação da contaminação de mãos de ordenhadores e equipamento de ordenha, assim como a eficiência da educação sanitária.

Ao longo da educação sanitária, de modo geral, as propriedades A e B, que alegavam ter incluso na rotina de ordenha a lavagem com detergentes, não apresentaram alterações nas contagens de mesófilos na superfície das teteiras nos momentos antes e depois da ordenha. As propriedades C e D, após o módulo de higienização (módulo 2), obtiveram redução nas contagens nestes locais. No entanto, Santana et al. (2001) afirmaram que apenas a higienização dos equipamentos como rotina na propriedade não garante a remoção dos componentes do leite e microrganismos.

Deve-se destacar que a eficiência da higiene de equipamentos e utensílios está relacionada com o uso das concentrações corretas dos detergentes e sanitizantes, além da temperatura específica. Dessa forma, conclui-se que a ausência de redução nas contagens de mesófilos nas propriedades A e B podem ter sido relacionadas às falhas técnicas no procedimento de higienização, como

controle do tempo e temperatura necessários para ação eficiente dos produtos. Nas propriedades C e D não se realizava regularmente a higienização até o início do programa de educação sanitária, sendo que a propriedade D não possuía sistema de lavagem automática. Estes fatos justificam a diminuição mais efetiva na contagem de mesófilos após o treinamento.

A água apresentou contaminações por mesófilos em torno de 3 log UFC/mL em todas as propriedades, e estes níveis não sofreram reduções aparentes durante a educação sanitária. Este fato pode ter ocorrido devido ao uso do cloro, sem o devido conhecimento da quantidade, concentração e tempo de ação corretos deste produto para tratamento da água, conforme o tipo de reservatório de cada propriedade. Além disso, houve ausência do conhecimento das propriedades físico-químicas da água. Segundo Santana et al. (2001), a água pode representar uma fonte de contaminação do leite cru, através do uso na lavagem dos tetos, equipamentos, utensílios e tanques de refrigeração. As características físico-químicas da água podem também influenciar na ação das soluções destinadas à higienização de tanques e equipamentos (SANTOS e FONSECA, 2007). Este fato indica que os investimentos em equipamentos e soluções sanitizantes podem ser insuficientes se não há rotina de análises da água.

Deve-se ressaltar que a proporção aceita para psicotróficos é de no máximo 10% dos microrganismos totais (BRASIL, 1976), no entanto, em todas as propriedades avaliadas a contagem de psicotróficos representava mais do que 10% da contagem de mesófilos, em todos os pontos de coleta. De acordo com Santos e Fonseca (2007), os psicotróficos são oriundos do ambiente, contaminam o leite através das falhas no manejo higiênico de tetos, mãos e equipamentos e comprometem o rendimento de derivados. De modo geral, mãos, equipamentos e água não apresentaram valores superiores a 1 log UFC/mL de psicotróficos.

O leite dos tanques de refrigeração demonstraram valores elevados desde a fase de caracterização nas fazendas A e B, reduzindo até 2 log UFC/mL ao final da educação sanitária. Nas fazendas C e D o comportamento foi inverso. Estas altas contagens podem indicar falhas na higienização de tetos, ou variação no intervalo de dias de armazenagem do leite no tanque, até o recolhimento pelo laticínio. O tempo ideal de retirada do leite do tanque de refrigeração é de até 48 horas (BRASIL, 2011). Em alguns locais, a contagem de psicotróficos excedeu a de mesófilos. Este resultado também foi relatado por Santana et al. (2001). Porém, estes autores

concluíram que o método de contagem de mesófilos pode não ser eficiente para estimar a contagem total de microrganismos existentes no leite.

Tabela 15. Contagem de mesófilos e psicrotóxicos em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda A.

Microrganismos	Fase de coleta	Pontos de coleta					
		Tanque (log UFC/mL)	Água (log UFC/mL)	Mão antes da ordenha (log UFC/cm ²)	Mão depois da ordenha (log UFC/cm ²)	Teteira antes da ordenha (log UFC/cm ³)	Teteira depois da ordenha (log UFC/cm ³)
Mesófilos	Caracterização	6,48	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	2	4,34	2,70	1,48	2,63	5,10	1,83
	3	4,29	3,72	4,90	4,96	1,61	4,40
	4	6,35	3,38	3,94	4,74	5,81	5,04
	5	6,31	2,10	2,03	2,69	3,26	3,57
	6	6,09	1,00	4,21	4,19	5,19	4,31
Psicrotóxicos	Caracterização	6,78	4,48	1,00	1,00	1,00	1,00
	2	5,34	2,70	1,48	2,63	5,10	1,83
	3	6,78	1,00	2,71	3,44	1,00	3,68
	4	4,48	1,00	1,04	1,00	1,00	1,00
	5	4,48	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	6	4,48	1,00	1,96	2,23	2,60	2,40

UFC: unidades formadoras de colônia.

Tabela 16. Contagem de mesófilos e psicrotróficos em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda B.

Microorganismos	Fase de coleta	Pontos de coleta					
		Tanque (log UFC/mL)	Água (log UFC/mL)	Mão antes da ordenha (log UFC/cm ²)	Mão depois da ordenha (log UFC/cm ²)	Teteira antes da ordenha (log UFC/cm ³)	Teteira depois da ordenha (log UFC/cm ³)
Mesófilos	Caracterização	6,78	4,11	1,00		1,00	
	2	5,33	4,85	1,54	4,34	1,77	3,80
	3	6,37	4,40	4,77	3,58	5,62	3,50
	4	5,47	2,11	3,38	3,80	5,49	4,27
	5	6,48	3,30	2,82	3,15	4,61	4,02
	6	6,78	3,40	4,54	3,82	4,77	5,77
Psicrotróficos	Caracterização	6,15	3,30	1,00		1,00	
	2	5,40	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	3	6,78	1,00	4,70	1,00	1,00	2,65
	4	4,48	1,00	1,85	1,28	2,55	2,55
	5	4,48	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	6	4,48	1,90	2,39	2,14	2,55	2,55

UFC: unidades formadoras de colônia.

Tabela 17. Contagem de mesófilos e psicotróficos em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda C.

Microorganismos	Fase de coleta	Pontos de coleta					
		Tanque (log UFC/mL)	Água (log UFC/mL)	Mão antes da ordenha (log UFC/cm ²)	Mão depois da ordenha (log UFC/cm ²)	Teteira antes da ordenha (log UFC/cm ³)	Teteira depois da ordenha (log UFC/cm ³)
Mesófilos	Caracterização	5,59	6,48	3,34	2,79	1,00	3,51
	2	6,01	3,18	3,05	2,34	2,90	3,19
	3	6,36	4,11	2,82	2,38	1,18	1,04
	4	5,24	2,91	4,86	2,62	1,41	1,15
	5	5,13	3,18	1,81	2,42	0,95	1,70
	6	5,83	4,26	1,89	3,67	5,23	3,48
Psicotróficos	Caracterização	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	4	3,43	1,70	0,85	1,41	1,00	1,00
	5	2,95	1,00	1,00	1,00	2,60	2,16
	6	3,06	2,35	1,00	0,48	2,78	2,40

UFC: unidades formadoras de colônia.

Tabela 18. Contagem de mesófilos e psicrotróficos em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda D.

Microrganismos	Fase de coleta	Pontos de coleta					
		Tanque (log UFC/mL)	Água (log UFC/mL)	Mão antes da ordenha (log UFC/cm ²)	Mão depois da ordenha (log UFC/cm ²)	Teteira antes da ordenha (log UFC/cm ³)	Teteira depois da ordenha (log UFC/cm ³)
Mesófilos	Caracterização	6,28	1,00	4,54	2,89	3,33	3,71
	2	6,17	3,00	3,12	3,67	5,84	5,84
	3	6,76	1,00	1,00	2,06	1,00	1,00
	4	3,93	2,34	1,85	1,40	1,68	1,53
	5	3,85	2,23	2,94	2,02	3,16	1,00
	6	4,78	3,48	2,47	3,24	3,71	0,48
Psicrotróficos	Caracterização	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	2	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	4	4,67	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	5	3,67	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	6	4,92	1,00	1,49	1,45	0,90	1,00

UFC: unidades formadoras de colônia.

7.4.2 Contagem de coliformes e detecção de *Escherichia coli*

Não há legislação vigente para contagens de coliformes em leite cru, dessa forma, a recomendação de Philpot e Nickerson (2002) é de valores abaixo de 10 NMP/mL (1 log NMP/mL), sendo a faixa entre 10 e 100 NMP/mL (1,0 a 2,0 log NMP/mL) considerada aceitável por estes autores.

A fazenda A apresentou contaminação por coliformes a 35°C de 3,04 log NMP/mL no leite refrigerado em praticamente todas as fases, com 1,36 log NMP/mL na fase 2. Foram observados valores crescentes ao longo dos períodos de coleta, desde a fase inicial, com 1,36 até 3,04 log NMP/mL para coliformes a 45°C. Na água da propriedade, ao longo do treinamento, a detecção de ambos os grupos de coliforme, foi inferior a 1,0 log NMP/mL. A contaminação de coliformes para superfícies de mãos dos ordenhadores e equipamentos, nos momentos antes e depois da ordenha, em todas as fases de coleta, demonstrou variação, mantendo-se em 2,0 log NMP/cm². A Tabela 19 contém os níveis de contaminação do leite refrigerado, superfície das teteiras e mãos e água da fazenda A por coliformes 35°C e 45°C.

A propriedade B teve contaminação de coliformes em superfícies de mãos dos ordenhadores e equipamentos, antes e depois da ordenha, em todas as fases de coleta, com valor de 2,0 log NMP/cm². Na água desta propriedade, durante todas as coletas, a detecção de coliformes foi inferior a 1,0 log NMP/mL. Na Tabela 20 estão os dados de contaminação por coliformas na fazenda B.

A propriedade C iniciou o estudo com o leite refrigerado apresentando contaminação por coliformes a 35°C menor que 1,0 log NMP/mL e a partir da terceira coleta aumentou para 3,04 log NMP/mL, mantendo-se neste patamar até o final. Os níveis de coliformes a 45°C mantiveram-se até a 5ª coleta em níveis inferiores a 1,0 log NMP/mL e aumentaram até 3,04 log NMP/mL no período final. Para esta propriedade, a contaminação por coliformes nas superfícies de mãos dos ordenhadores e equipamentos, antes e depois da ordenha e em todas as fases de coleta teve pouca variação, mantendo-se em 2,0 log NMP/cm². A água apresentou valores inferiores a 1,0 log NMP/mL. A Tabela 21 contém os resultados de estimativa de coliformes para a fazenda C.

A contaminação de coliformes para superfícies de mãos dos ordenhadores e equipamentos, nos momentos antes e depois da ordenha, em todas as fases de

coleta, manteve-se em torno de 1,0 a 2,0 log NMP/cm² e 2,0 log NMP/cm³, respectivamente. Na água os níveis foram inferiores a 1,0 log NMP/mL. Na Tabela 22 estão dispostos os resultados de coliformes para a fazenda D.

De modo geral, todas as propriedades apresentaram contaminações de até 3,0 log NMP/mL no leite de tanque e entre 1,0 a 2,0 log NMP/mL em superfícies (mãos dos ordenhadores e equipamentos), antes e depois da ordenha durante o período de coletas.

Em todas as propriedades detectou-se contaminação por coliformes a 35°C na faixa de 3 log UFC/mL no leite cru refrigerado, ou seja, nenhuma atendeu ao índice recomendado de (1,0 a 2,0 log NMP/mL) de Philpot e Nickerson (2002). A presença de coliformes nas mãos e teteiras podem indicar fonte de contaminação para o leite cru armazenado nos tanques de refrigeração.

Tabela 19. Contagem de coliformes a 35°C e 45°C em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda A.

Microrganismos	Fase de coleta	Pontos de coleta					
		Tanque (log NMP/mL)	Água (log NMP /mL)	Mão antes da ordenha (log NMP /cm ²)	Mão depois da ordenha (log NMP /cm ²)	Teteira antes da ordenha (log NMP /cm ³)	Teteira depois da ordenha (log NMP /cm ³)
Coliformes 35°C	Caracterização	3,04	0,48	1,52	0,86	1,51	0,76
	2	1,36	0,96	0,48	0,48	0,48	0,48
	3	3,04	0,48	1,52	1,52	0,48	2,17
	4	3,04	0,48	1,52	0,48	2,17	0,48
	5	3,04	0,48	0,48	1,52	1,51	2,17
	6	3,04	0,48	0,48	0,48	0,48	2,17
Coliformes 45°C	Caracterização	1,36	0,48	0,48	0,48	0,76	0,48
	2	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	3	1,36	0,48	0,48	0,48	0,48	1,51
	4	0,48	0,48	1,52	0,48	2,17	0,48
	5	3,04	0,48	0,48	0,48	1,51	2,17
	6	3,04	0,48	0,48	0,48	0,48	0,49

NMP: Número mais provável.

Tabela 20. Contagem de coliformes a 35°C e 45°C em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda B.

Microrganismos	Fase de coleta	Pontos de coleta					
		Tanque (log NMP/mL)	Água (log NMP /mL)	Mão antes da ordenha (log NMP /cm ²)	Mão depois da ordenha (log NMP /cm ²)	Teteira antes da ordenha (log NMP /cm ³)	Teteira depois da ordenha (log NMP /cm ³)
Coliformes 35°C	Caracterização	3,04	2,38	0,48		0,48	
	2	2,66	0,48	0,48	0,48	1,45	0,48
	3	3,04	0,48	1,41	0,48	2,11	0,48
	4	3,04	3,04	1,41	1,41	2,11	2,11
	5	3,04	0,48	0,48	0,48	1,45	0,48
	6	3,04	2,38	0,48	1,41	2,11	2,11
Coliformes 45°C	Caracterização	0,48	0,48	0,48		0,48	
	2	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	3	0,48	0,48	1,03	0,48	0,48	0,48
	4	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	5	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	6	1,43	0,48	0,48	1,41	0,48	0,48

NMP: Número mais provável.

Tabela 21. Contagem de coliformes a 35°C e 45°C em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda C.

Microrganismos	Fase de coleta	Pontos de coleta					
		Tanque (log NMP/mL)	Água (log NMP /mL)	Mão antes da ordenha (log NMP /cm ²)	Mão depois da ordenha (log NMP /cm ²)	Teteira antes da ordenha (log NMP /cm ³)	Teteira depois da ordenha (log NMP /cm ³)
Coliformes 35°C	Caracterização	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	2	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	3	3,04	0,48	1,50	0,48	0,48	0,48
	4	3,04	0,48	0,48	1,50	0,48	0,48
	5	3,04	0,96	0,48	0,48	0,48	0,48
	6	3,04	1,36	0,48	1,50	2,10	2,10
Coliformes 45°C	Caracterização	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	2	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	3	1,36	0,48	1,50	0,48	0,48	0,48
	4	0,97	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	5	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	6	3,04	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48

NMP: Número mais provável.

Tabela 22. Contagem de coliformes a 35°C e 45°C em diversos pontos do processo de ordenha e armazenagem do leite durante das seis fases de coleta na fazenda D.

Microrganismos	Fase de coleta	Pontos de coleta					
		Tanque (log NMP/mL)	Água (log NMP /mL)	Mão antes da ordenha (log NMP /cm ²)	Mão depois da ordenha (log NMP /cm ²)	Teteira antes da ordenha (log NMP /cm ³)	Teteira depois da ordenha (log NMP /cm ³)
Coliformes 35°C	Caracterização	1,36	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	2	3,04	0,48	0,48	0,48	2,10	2,10
	3	1,36	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	4	3,04	2,38	0,48	0,48	0,48	0,48
	5	3,04	1,36	0,48	0,48	2,10	0,48
	6	3,04	2,38	0,84	0,48	0,48	0,48
Coliformes 45°C	Caracterização	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	2	0,87	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	3	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	4	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
	5	3,04	0,48	0,48	0,48	2,10	0,48
	6	2,38	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48

NMP: Número mais provável.

A Tabela 23 reúne os pontos nos quais foi detectada a presença de *E. coli*, em cada fazenda, ao longo do programa de educação sanitária. Observa-se que em todos os períodos houve detecção em pelo menos um local, para todas as fazendas. A propriedade A apresentou maior frequência de detecção de *E. coli*. Segundo Silva et al. (2010), esta bactéria foi classificada como indicador de contaminação fecal em alimentos crus. Cepas de *E. coli* podem ser isoladas do trato digestório de animais saudáveis (KARCH et al., 2002; CABAL et al., 2015). O leite pode ser contaminado por via fecal, pela excreção das fezes contaminadas em contato com as teteiras, promovendo consequente contaminação do leite durante o processo de ordenha (HUSSEIN e SAKUMA, 2005; FARROKH et al., 2013). Dessa forma, no caso do leite refrigerado, a fonte destes microrganismos podem ser as fezes depositadas na sala de ordenha, que entraram em contato com o leite no momento da ordenha, devido às falhas no manejo higiênico de tetos e equipamentos nas fazendas estudadas.

Tondo e Bartz (2013) recomendam ausência de coliformes fecais e *E. coli* nas mãos de manipuladores de alimentos e ausência de *E. coli* em 100 cm² em superfícies que entram em contato direto com alimentos. A consideração destas recomendações no âmbito de mãos de ordenhadores e equipamentos de ordenha tornam-se rigorosas devido ao local de ordenha ser propenso a presença constante de fezes.

Tabela 23. Presença de *E. coli* em cada ponto de coleta ao longo dos seis períodos da educação sanitária nas respectivas fazendas participantes.

Ponto de coleta	Fazenda A						Fazenda B						Fazenda C						Fazenda D					
	Fase de coleta						Fase de coleta						Fase de coleta						Fase de coleta					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Tanque	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+
Mão antes da ordenha	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Mão depois da ordenha	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Teteira antes da ordenha	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Teteira depois da ordenha	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Água	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

7.5 Identificação molecular de *Escherichia coli* e pesquisa de genes de virulência

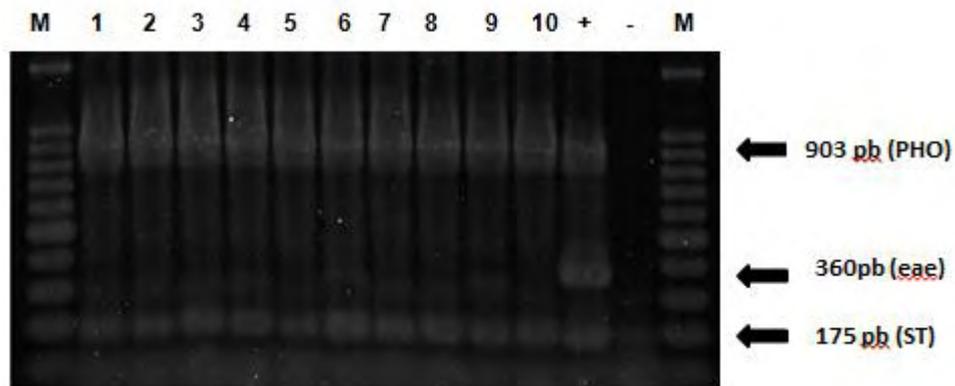
7.5.1 PCR Multiplex

As análises por PCR multiplex foram realizadas com o intuito de confirmar a nível genético, a presença de *E. coli* nas amostras suspeitas após testes microbiológicos. Além disso, foram pesquisados genes de virulência nestas cepas, com o intuito de investigar a presença de *E. coli* potencialmente patogênicas, nas mãos dos ordenhadores, equipamentos de ordenha, água e leite cru refrigerado. Dessa forma, houve avaliação da circulação de cepas causadoras de infecções e toxi-infecções alimentares ou morte, caso haja consumo do leite cru e derivados. Também de cepas produtoras de toxinas, as quais podem reduzir a vida de prateleira dos derivados lácteos, e cepas formadoras de biofilmes, que podem aderir aos equipamentos e tubulações tanto nas propriedades quanto nos laticínios, dificultando o controle higiênico destes locais.

A partir da reação 1 de PCR multiplex, o fragmento com tamanhos moleculares de 903 pb, referente ao gene constitutivo (*PHO*), responsável pela produção de fosfatase Alcalina em todos as cepas de *E. coli*, foi detectado em 100% dos 37 isolados de *E. coli*. Também foi observada em 100% dos isolados de *E. coli* a presença do fragmento com 175 pb referente ao gene ST, responsável pela produção da toxina termoestável em cepas do patotipo Enterotoxigênico. Os fragmentos observados após eletroforese em gel de agarose 2% estão representados na Figura 16. Para confirmação da reação, utilizou-se como controle positivo uma cepa de referência de *E. coli* Enterohemorrágica ATCC 43895, a qual possui os genes *PHO* e *eae*. Também foi utilizado um controle negativo com água livre de DNA.

Na segunda reação de PCR multiplex, detectou-se em 100% das amostras o fragmento de 190 bp referente ao gene *Eagg* do plasmídio pAA da aderência agregativa (AA). Os fragmentos observados, após eletroforese em gel de agarose 2% são mostrados na Figura 17.

Figura 16. Fragmentos de 903 pb e 175 pb observados nos isolados de *E. coli*, a partir da reação 1 de PCR multiplex, após eletroforese em gel de agarose 2%.



M: marcador molecular de 100 pb; [1 a 10]: amostras detectadas dos pontos de coleta; [+]: controle positivo *E. coli* EHEC; [-]: controle negativo.

Figura 17. Fragmentos de 190 pb observados nos isolados de *E. coli*, a partir da reação 2 de PCR multiplex, após eletroforese em gel de agarose 2%.

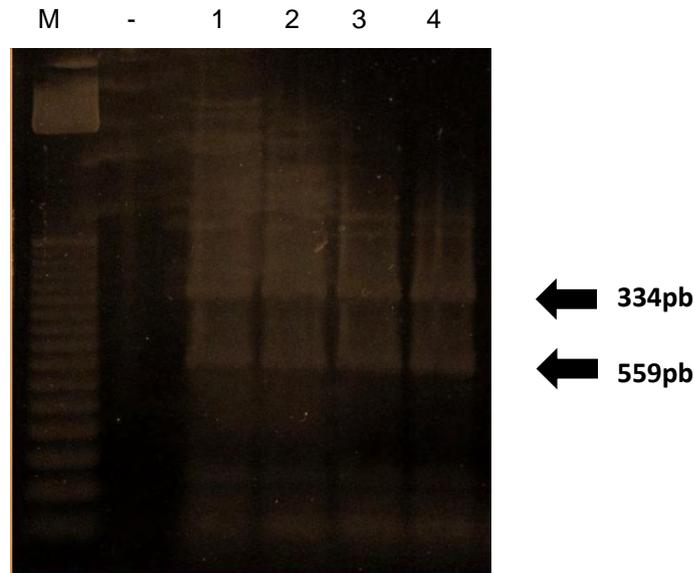


M: marcador molecular de 100 pb; [1 a 10]: amostras detectadas dos pontos de coleta; [-]: controle negativo.

7.5.2 PCR RFLP

Os únicos fragmentos nos quais pode-se afirmar que houve digestão enzimática realizada pela *HINC II*, foram os de tamanho 903 pb referentes ao gene *PHO*, os quais foram clivados em dois fragmentos de 334 pb e 559 pb, como observado na Figura 18.

Figura 18. Os fragmentos de 190 pb observados nos isolados de *E. coli*, a partir da reação 2 de PCR multiplex, após eletroforese em gel de agarose 2%.



M: marcador molecular de 50 pb; [1 a 4]: amostras detectadas dos pontos de coleta; [-]: controle negativo.

7.5.3 Sequenciamento genético

Para confirmar a detecção dos genes PHO, ST e Eagg, os fragmentos com os respectivos tamanhos moleculares de 903 pb, 175 pb e 190 pb foram sequenciados. Os resultados obtidos no sequenciamento genético foram comparados às informações contidas no banco de genes da National Center for Biotechnology Information (NCBI), com auxílio da ferramenta BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool – NCBI). Somente o gene PHO foi confirmado devido à obtenção de similaridade de 99% entre estes e as sequências da cepa de *E. coli* RM45E registrada no banco de genes da NCBI como M29667.1.

Os demais fragmentos detectados com os tamanhos moleculares dos genes ST e Eagg, que seriam pertencentes aos respectivos patótipos Enterotoxigênico e Enteroagregativo, não apresentaram similaridade com as sequências genéticas registradas no banco de genes da NCBI. Ou seja, a partir da reação de PCR multiplex não foi possível detectar os genes de virulência, assim como a identificação de patótipos de *E. coli*.

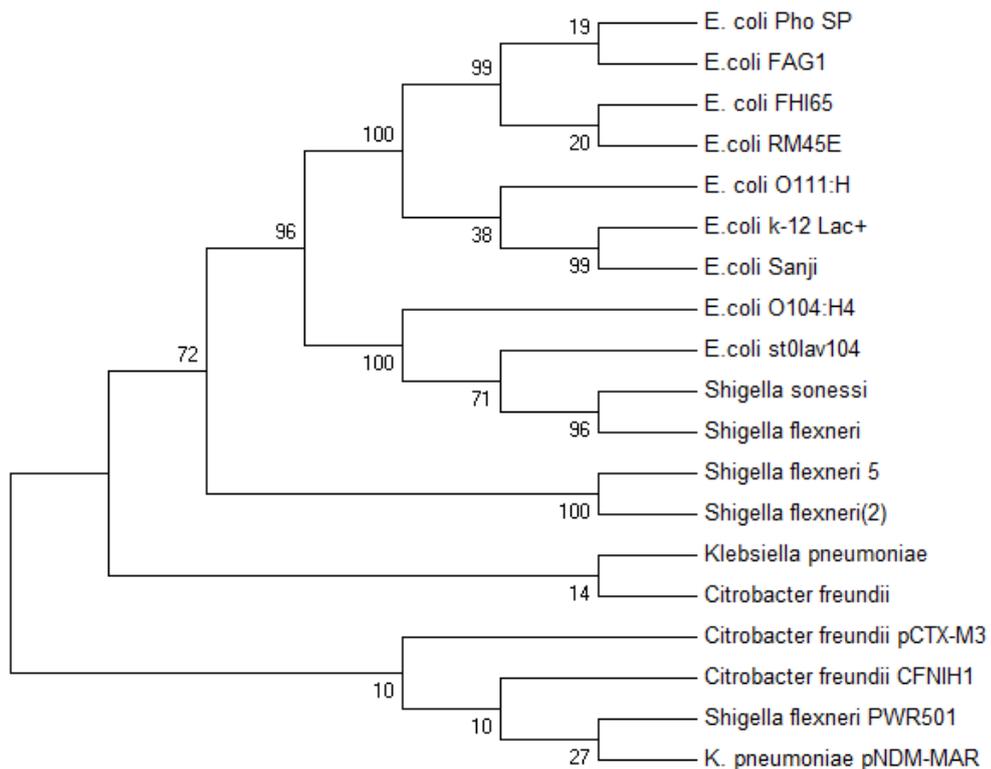
Segundo Casadevall (1999) e Kuhnert et al. (2000), o mecanismo responsável pela patogenicidade desta bactéria é considerado complexo devido à presença de

muitos fatores. Dessa forma, considera-se que a ausência destes genes de virulência específica não elimina a possibilidade das cepas de *E. coli* encontradas nos leite dos tanques de refrigeração e superfícies de equipamentos de ordenha e mãos dos ordenhadores carregarem outros genes de virulência e serem potencialmente patogênicas.

7.4.4 Estudo filogenético

Para confirmação do resultado obtido pelo sequenciamento genético, realizou-se a reconstrução filogenética, tomando como sequência o gene PHO contido no DNA das amostras isoladas ao longo do estudo. Utilizou-se para comparação, as sequências similares de *E. coli* contidas no GenBank da NCBI, e demais representantes da família *Enterobacteriaceae*. A Figura 19 demonstra que o gene PHO identificado pelo PCR multiplex, nas amostras obtidas dos leites refrigerados, e superfícies de equipamentos de ordenha e mãos dos ordenhadores, são originários de cepas de *Escherichia coli*.

Figura 19. Reconstrução filogenética pelo método de máxima verossimilhança com base no gene PHO de *Escherichia coli*.



O histórico evolutivo foi inferido utilizando o método de verossimilhança máxima de risco (*maximum likelihood*) baseado no modelo de 2 parâmetros Kimura, com auxílio do programa MEGA 7. A árvore apresentada é a que apresentou a maior probabilidade log (-6299.0087). A porcentagem de taxa associada aos grupos está demonstrada ao lado dos cladogramas. Foram obtidos algoritmos para uma matriz de distâncias entre pares, a qual foi estimada utilizando a abordagem de “máxima verossimilhança composite” (MCL), e selecionando a topologia com valor de log probabilidade superior. A análise envolveu 19 sequências de nucleotídeos e todas as posições contendo lacunas e dados em falta foram eliminados. Houve um total de 520 posições no conjunto de dados.

8 CONCLUSÃO

Considerando os limites para contagem de mesófilos estipulados na IN 62, a fazenda D foi a única propriedade que iniciou a educação sanitária com valor acima do permitido e apresentou redução contínua, até se adequar à legislação. As demais propriedades apresentaram reduções, mas não suficientes para estarem em conformidade com a IN 62. Com relação à CCS, a propriedade A não atendeu a legislação em nenhuma das fases do projeto educativo, apresentando também os maiores problemas com casos de mastite, a propriedade B esteve conforme durante todo o período e as demais propriedades apresentaram variações.

A não detecção dos genes de virulência da *E. coli* não elimina a possibilidade das cepas encontradas nas fazendas carregarem outros genes de virulência e serem potencialmente patogênicas.

Com base no controle de modificações realizadas por parte dos produtores, na infraestrutura e manejo de ordenha, e no monitoramento das contaminações por microrganismos, observou-se que a única propriedade que demonstrou índices reduzidos nas contaminações de modo geral foi a propriedade D. As demais propriedades não apresentaram modificações e investimentos em infraestrutura e

manejo de ordenha, fato que refletiu na manutenção da situação inicial diagnosticada nas propriedades antes do início do estudo.

REFERÊNCIAS

ABASCAL, F.; ZARDOYA, R.; POSADA, D. ProTest: selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, p. 2104-2105, 2005.

ALY, M. E. A. et al. Genotypic detection of enterohaemorrhagic E. coli (EHEC) among diarrheagenic patients in Egypt. **International Journal of Microbiological Research**, Tupe Nagar, v. 5, p. 61-64, 2014.

BEUTIN, L. et al. Virulence markers of Shiga-like toxin-producing Escherichia coli strains originating from healthy domestic animals of different species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 3, p. 631-635, 1995.

BLUM, S. E.; LEITNER, G. Genotyping and virulence factors assessment of bovine mastitis Escherichia coli. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 163, n. 3-4, p. 305-312, 2013.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 37, de 8 de abril de 2002. . **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 8 abr. 2002a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set. 2002b.

BRASIL. Portaria nº 1428, de 26 novembro de 1993. Estabelece a obrigatoriedade de todos os estabelecimentos que manipulam produtos alimentícios implantarem o Sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 2 maio. 1993. Seção 1, p.18415-18419.

BRASIL. Decreto nº 30.691, de 29 março de 1952. Aprova o novo regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal RIISPOA. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 7 jul. 1952.

BUCHHOLZ, U. et al. German outbreak of Escherichia coli O104:H4 associated with sprouts. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 365, n. 19, p. 1763-1770, Nov. 2011.

BYRNE, C. M. et al. Characterization of *Escherichia coli* O157 : H7 from downer and healthy dairy cattle in the upper Midwest region of the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 8, p. 4683-4688, Aug. 2003.

CABAL, A. et al. Detection of virulence-associated genes characteristic of intestinal *Escherichia coli* pathotypes, including the enterohemorrhagic/enteroaggregative O104:H4, in bovines from Germany and Spain. **Microbiology and Immunology**, Richmond, v. 59, n. 8, p. 433-442, Aug. 2015.

CARVALHO, G. R. A indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro. **Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 102**, Juiz de Fora, 2010. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BR20101870411>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. A. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 8, p. 3703-3713, Aug. 1999.

CASSOLI, D. L.; MACHADO, P. F. Amostragem de leite para pagamento por qualidade. In: MESQUITA, A. J.; DURR, J. W.; COELHO, K. O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006. p. 135-148.

CEZARI, D. L.; NASCIMENTO, E. R. **Análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC**. Rio de Janeiro: SBTA, 1995. 29 p.

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, p. 11-20, 2001.

COBBAUT, K. et al. *Escherichia coli* O157 prevalence in different cattle farm types and identification of potential risk factors. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 9, p. 1848-1853, Sep. 2009.

CORTÉS, C. et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 110, n. 1-2, p. 67–76, 2005.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.

DUBREUIL, D. J. 7 Escherichia coli STb enterotoxin. **Microbiology**, p. 1783-1 795, 1997.

DURR, J. W. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite: uma oportunidade única. In: DURR, J. W.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. **O compromisso com a qualidade do leite**. Passo Fundo: Editora UFP, 2004. v.1, p. 38-55.

ELLIS-IVERSEN, J. et al. Farm practices to control E-coli O157 in young cattle - A randomised controlled trial. **Veterinary Research**, Paris, v. 39, n. 1, art. 3, 2008.

FARROKH, C. et al. Review of Shiga-toxin-producing Escherichia coli (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 162, n. 2, p. 190-212, 2013.

GULHAN, T. et al. Detection of heat-stabile and heat-labile enterotoxins of Escherichia coli strains isolated from healthy animals. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 8, n. 10, p. 2058-2062, 2009.

GILES, C. L. **Escherichia coli in domestic animals and humans**. Wallingford: CAB International, 1994.

_____. Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, n. 13, p. E45-62, 2006.

GILES, L. C.; BARNUM, D. A. A heat-labile enterotoxin from strains of Escherichia coli enteropathogenic for pigs on JSTOR. **The Journal of Infectious Diseases**, Cary, v. 120, p. 419-426, 1969.

HARRINGTON, S. M. et al. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative Escherichia coli. **Cellular Microbiology**, Chichester, v. 7, n. 11, p. 1565-1578, 2005.

HUNTER, P. R. **Waterborne disease**. Chichester: John Wiley & Sons, 1997.

HUSSEIN, H. S.; SAKUMA, T. Invited review: prevalence of shiga toxin-producing

Escherichia coli in dairy cattle and their products. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 88, n. 2, p. 450-465, Feb 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Indicadores IBGE**: Estatística da produção pecuária - março de 2016. Rio de Janeiro: IBGE, 2016.

JANK, M. S.; GALAN, V. B. **Competitividade do sistema agroindustrial do leite**. 1998. Disponível em:<
http://www.fundace.org.br/leite/arquivos/projetos_priorizados/elaboracao_competitividade_industrial/bibliot/vol_ii_Leite%20Competitividade_jank.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2015.

KAIPAINEN, T. et al. Virulence factors of Escherichia coli isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 37-46, 2002.

KARCH, H. et al. The enemy within us: lessons from the 2011 European Escherichia coli O104:H4 outbreak. **Embo Molecular Medicine**, Chichester, v. 4, n. 9, p. 841-848, 2012.

KARNS, J. S. et al. Incidence of Escherichia coli O157 : H7 and E-coli virulence factors in US bulk tank milk as determined by polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 90, n. 7, p. 3212-3219, 2007.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions though comparative studies of nucleotide sequences. **Journals of Molecular Evolution**, New York, v. 16, p. 111-120, 1980.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, 2016. (Epub ahead of print).

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. **Computer Applications in the Bioscience**, Oxford, v. 10, p. 189-191, 1994.

KONG, R. Y. C. et al. A sensitive and versatile multiplex PCR system for the rapid detection of enterotoxigenic (ETEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) strains of Escherichia coli. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 38, n. 12, p. 1207-1215, 1999.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of Escherichia coli isolates from water, food and the environment. **Fems Microbiology Reviews**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 107-117, 2000.

MACHADO, P. F. Pagamento por qualidade. In: BARBOSA, S. B. B.; BATISTA, A. M. V. et al. (Ed.). **Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 3**. Recife: CCS Gráfica e Editora, 2008. v.1, p.183-191.

MEAD, P. S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging**

Infectious Diseases, Atlanta, v. 5, n. 5, p. 607-25, 1999.

MILLER, A.; NESI, C. N. Prevalência de agentes causadores de mastite, qualidade do leite e conformidade com a in n. 51 **Unoesc & Ciência**, Joaçaba, v. 3, n. 2, p. 195-204, 2012.

MUHLDORFER, I.; HACKER, J. Genetic-aspects of Escherichia-coli virulence. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 16, n. 3, p. 171-181, 1994.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 2, p. 403-403, 1998.

NOGUEIRA NETTO, V.; GOMES, A. T. **Especialização da pecuária leiteira**. 2005. Disponível em:<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_34_217200392358.html >. Acesso em: 12 fev. 2016.

OLIVAL, A. D. A. et al. Implementação e avaliação de um programa educativo sobre qualidade do leite: aspectos culturais, sociais e tecnológicos. **Extensão Rural**, Santa Maria, n. 10, p. 1-15, 2003.

PAIVA, C. A. V. et al. Annual evolution of raw milk quality processed in a dairy industry of Minas Gerais state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, Belo Horizonte, v. 64, p. 471-478, 2012.

PASS, M. A.; ODEDRA, R.; BATT, R. M. Multiplex PCRs for identification of Escherichia coli virulence genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 5, p. 2001-2004, 2000.

PAULA, M. C. D. et al. Somatic cell count in milk samples. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 5, p. 1303-1308, 2004.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Jaguariúna: Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002.

RANGEL, J. M. et al. Epidemiology of Escherichia coli O157:H7 outbreaks, United States, 1892-2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, n. 4, p. 603-609, 2005.

RIBAS, N. P. Importância da contagem de células somáticas para a saúde da glândula mamária e qualidade do leite. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUCAO INTENSIVA DE LEITE, 1999, Caxambu. **Anais...** Caxambu, 1999. p. 36-43.

RILEY, L. W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, n. 12, p. 681-685, 1983.

ROSA, D. C. et al. Milk quality in samples from individual dairy cows and milk tanks. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, p. 485-493, 2012.

- SANTANA, E. H. W. et al. Contaminação do leite em diferentes pontos da produção leiteira: ii) microrganismos mesófilos, psicrotróficos e proteolíticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, p. 349-358, 2004.
- SANTOS, M. V. D.; FONSECA, L. F. L. D. **Estratégias para prevenção e controle da mastite**. Pirassununga: Manole, 2007.
- SAXENA, S. K.; O'BRIEN, A. D.; ACKERMAN, E. J. Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 1, p. 596-601, 1989.
- SCHMIDT, H.; BEUTIN, L.; KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 63, n. 3, p. 1055-1061, 1995.
- SHULMAN, S. T.; FRIEDMANN, H. C.; SIMS, R. H. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? **Clinical Infectious Diseases**, Cary, v. 45, n. 8, p. 1025-1029, 2007.
- SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010.
- SOARES, J.; BENNITEZ, L. B.; TERRA, N. N. Análise de pontos críticos no abate de frangos, através da utilização de indicadores microbiológicos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, p. 53-61, 2002.
- SOUZA, E. C. et al. Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em São Paulo. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p. 31-38, 2002.
- SPEXOTO, A. A.; OLIVEIRA, C. A. F.; OLIVAL, A. D. A. Application of hazard analysis and critical control points system in a grade A dairy farm. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1424-1430, 2005.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. Brazil dairy and products: annual dairy report. **Global Agricultura Information Network Online**, 2015.
- VALLIN, V. M. et al. Milk quality improvement after implantation of good manufacturing practices in milking in 19 cities of the central region of Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, p. 181-188, 2009. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2661>>. Acesso em: 10 nov. 2015.
- VILELA, D. LEITE, J. L. B.; RESENDE, J. C. de. Políticas para o leite no Brasil: passado, presente e futuro. In: SANTOS, G. T. dos et al. **Anais do Sul- Leite: simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil**. Maringá:

UEM/CCA/DZO-NUPEL, 2002. p.1-26.

WINCK, C. A.; THALER NETO, A. Diagnóstico da adequação de propriedades leiteiras em Santa Catarina às normas brasileiras de qualidade do leite. **Revista Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 8, n. 2, p. 167-172, 2009.

YAMAZI, A. K. et al. Práticas de produção aplicadas no controle de contaminação microbiana na produção de leite cru. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 4, p. 610-618, 2010.

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)

Contato: andrezzaf@usp.br / (19) 3565-4108

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

Contato: marisa.franca@usp.br / (19) 98219-5200

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

Contato: r.contero@usp.br / (19) 99671-7628

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 divulgados.

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:

Profª. Drª. 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 / (19) 3565-4108

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

Contato: marisa.franca@usp.br / (19) 98219-5200

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

Contato: r.contero@usp.br / (19) 99671-7628

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 que 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 Antibiograma
 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 _____