



UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS, INDICADORES DE QUALIDADE DO
LEITE E PESQUISA DE LINHAGENS TOXIGÊNICAS DE
STAPHYLOCOCCUS EM PROPRIEDADES DE AGRICULTURA FAMILIAR
DE BOTUCATU, SP**

UBIRAJARA LEONCY DE LAVOR

Botucatu - SP

Julho/2014



UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS, INDICADORES DE QUALIDADE DO
LEITE E PESQUISA DE LINHAGENS TOXIGÊNICAS DE
STAPHYLOCOCCUS EM PROPRIEDADES DE AGRICULTURA FAMILIAR
DE BOTUCATU, SP**

UBIRAJARA LEONCY DE LAVOR

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni

Co-orientador: Prof. Ass. Dr. José Paes de A. N. Pinto

Botucatu - SP

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Lavor, Ubirajara Leoney de.

Aspectos socioeconômicos, indicadores de qualidade do leite e pesquisa de linhagens toxigênicas de *Staphylococcus* em propriedades de agricultura familiar de Botucatu, SP / Ubirajara Leoney de Lavor. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Helio Langoni

Coorientador: José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Capes: 50502034

1. Agricultura familiar. 2. Estafilococos. 3. Enterotoxinas. 4. Bovino de leite - Doenças. 5. Leite - Qualidade. 6. Mastite.

Palavras-chave: Agricultura familiar; Enterotoxinas; Estafilococos; Leite bovino.

Ubirajara Leoncy de Lavor. Aspectos socioeconômicos, indicadores de qualidade do leite e pesquisa de linhagens toxigênicas de *Staphylococcus* em propriedades de agricultura familiar de Botucatu, SP. Defesa: 18/07/14. Local: FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu, SP.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Helio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Adjunto Paulo Francisco Domingues

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu/SP

Profa. Assist. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

Membro Titular

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Adjunto Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Profa. Assist. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Membro Suplente

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu/SP

DEDICATÓRIA

***“Não me falta cadeira
Não me falta sofá
Só falta você sentada na sala
Só falta você estar...”***

(Arnaldo Antunes)

À minha “linda”, Gabriella Kopanny González, sem a qual nada disso seria possível. Obrigado por tudo. Te amo mais a cada dia...

AGRADECIMENTOS

À Família e amigos

Meus pais Guaracy e Eunice por tudo que me proporcionaram de “bens materiais” e, sobretudo ao imenso afeto.

Aos irmãos Janayna, Guarany e Mayra pelas quedas de bicicleta, lutinhas, pentelhices e infinita amizade. Devo muito do que sou a cada um de vocês.

À minha sobrinha preferida Inaê e aos pequeninos (por enquanto) da família, Peri e Iberê, por todo orgulho e alegria que trazem às nossas vidas.

Ao meu centenário avô Guarany e à amada “vó” Yeda (*in memoriam*) pelo exemplo de caráter e amor na criação de dez filhos.

À avó materna “Zozó” (*in memoriam*) por todo carinho, presentes, bombons em árvores de Natal e acirradas partidas de buraco, tão marcantes em minha vida.

Tios e primos que mesmo distantes geograficamente sempre foram fonte de felicidade e cumplicidade durante as férias, em especial, no Rancho Yara.

À “namorada” Gabriella e a toda sua família que me acolheu com grande alegria. Em especial à Cris por todo carinho e valiosa colaboração neste trabalho e ao recém-chegado Bernardo, que abençoou esta família.

Aos grandes amigos que fiz na vida, desde o ensino fundamental (Cahê, Di Deus, Fabitus, Ettore, Larissa, Juliana...), na passagem pela graduação em Botucatu (Dumbo, Flor, Kuna, Tele...) e mais recentemente nas andanças pelo mundão (Newton, Bola,...). Sei que não sou um amigo muito ativo, é grande minha dificuldade em cultivar amizades à distância, mas aproveito o momento para enfatizar a importância de todos vocês em minha vida. A frequência é muito menor do que a necessária, mas como é bom revê-los quando possível!

À FMVZ – Botucatu/SP

A todos os professores, funcionários e alunos que de maneira direta ou indireta contribuíram no meu desenvolvimento humano e formação profissional, além de propiciarem anos inesquecíveis em minha vida.

Aos maiores amigos-parceiros de pós-graduação Felipe Freitas Guimarães, Marcela de Pinho Manzi e Rodrigo Costa da Silva pela disponibilidade em me ajudar e colaborarem na execução das análises laboratoriais.

Aos amigos Guido, Anelise, Pâmela, Lucilene, Sâmea, Carla, Gustavo, Felipe Fornazari, entre outros tantos que convivi durante este período de grande aprendizado.

Ao técnico de laboratório Benedito Donizete Menozzi, cujo trabalho é fundamental no funcionamento do Nupemas e desenvolvimento das pesquisas.

Aos servidores José Roberto de Lalla Júnior e Carlos Pazini Júnior por todo suporte oferecido junto à seção de Pós-Graduação.

Aos orientadores

Ao professor Helio Langoni minha eterna gratidão pela oportunidade. Obrigado pelo acolhimento, conhecimento oferecido, sugestões e também pela paciência. Sua dedicação ao ensino da medicina veterinária é admirável, espero, no futuro próximo, fazer jus aos seus ensinamentos.

Ao meu grande tutor e amigo José Paes A. N. Pinto que acompanhou toda a minha trajetória acadêmica e tornou-se símbolo de caráter e amizade. Não há maneira de expressar meu agradecimento pelo que aprendi e compartilhei com você.

Aos colaboradores

Professores Márcio Garcia Ribeiro e José C. F. Pantoja pelas considerações e sugestões durante o exame geral de qualificação e outros momentos academicamente importantes.

Ao professor Fernando Ferrari do depto. de Estatística da Unesp (Ibilce – São José do Rio Preto, SP) pela colaboração na análise dos dados levantados durante o estudo.

À responsável técnica do laticínio Gegê, Maria João B. Serra, pelo colaboração no fornecimento de dados dos produtores rurais, que muito contribuiu nas análises e discussões realizadas.

Aos produtores rurais

Muito obrigado pela disponibilidade de me receber, com portas abertas, na casa de vocês e compartilhar, cada uma à sua maneira, sua cultura, suas histórias e expectativas em relação à atividade leiteira e à vida.

Em especial aos produtores José Correia Moraes Sobrinho (“Zuza”) e Marcos Locatelli, por toda colaboração e ajuda no desenvolvimento e execução deste trabalho.

Ao divino

À criação e à natureza por este mundo maravilhoso que nos é proporcionado a cada amanhecer.

SUMÁRIO

Lista de figuras e quadros.....	III
Lista de tabelas.....	IV
Lista de abreviaturas e símbolos.....	VII
Resumo.....	VIII
Abstract.....	X
1. Introdução e justificativa.....	01
2. Revisão de literatura.....	05
2.1. Leite: alimento e negócio.....	06
2.2. Perfil do produtor brasileiro.....	09
2.3. Qualidade do leite.....	11
2.4. Mastites.....	13
2.5. Estafilococos.....	15
2.6. <i>S. aureus</i> , enterotoxinas e a saúde pública.....	16
3. Objetivos.....	19
4. Material e métodos.....	22
5. Resultados e discussão.....	31
5.1. Perfil socio-econômico dos produtores.....	32
5.2. Prevalência das mastites.....	44
5.3. Etiologia das mastites.....	48
5.4. Qualidade do leite.....	55
5.5. Resistência aos antimicrobianos.....	64
5.6. Enterotoxinas.....	69
6. Conclusões.....	75
7. Referências bibliográficas.....	77

8. Trabalho científico.....	110
8.1. Instruções aos autores.....	111
8.2. “Perfil socioeconômico e indicadores de qualidade do leite bovino em propriedades da agricultura familiar de Botucatu, SP”	116
8.3. “Identificação bacteriana, contagem de células somáticas, perfil antimicrobiano e pesquisa de linhagens toxigênicas de <i>Staphylococcus</i> em amostras de leite bovino mastítico de pequenas propriedades”	125

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

- FIGURA 1. Critérios visuais utilizados na classificação do escore de tetos de bovinos, em propriedades da agricultura familiar. Botucatu, 2014.....25
- FIGURA 2. Média diária da produção de leite de vaca, em litros, entregues por pequenos produtores ao longo do ano de 2012. Fonte de dados: Laticínios Gege. Botucatu, 2014.....42
- FIGURA 3. Percentual de produtores de leite da agricultura familiar que atenderam as exigências da Instrução Normativa (IN) nº 62 com relação aos limites de Contagem Bacteriana Total (CBT). Botucatu, 2014.....58
- FIGURA 4. Percentual de produtores de leite da agricultura familiar que atenderam as exigências da Instrução Normativa (IN) nº 62 com relação aos limites de Contagem de Células Somáticas (CCS). Botucatu, 2014.....60
- FIGURA 5. Percentual de produtores de leite da agricultura familiar que atenderam as exigências da Instrução Normativa (IN) nº 62 com relação aos teores físico-químicos. Botucatu, 2014.....63
- QUADRO 1. Limites exigidos pela Instrução Normativa (IN) nº 62 quanto aos valores de Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS) para a região Sudeste. Brasil, 2011.....56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Sequência das bases e tamanhos previstos dos produtos amplificados pelos primers utilizados na reação de PCR para detecção de genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i>	29
TABELA 2. Resultado do inquério socio-econômico dos pequenos produtores da agricultura familiar de leite da Baixada Serrana de Botucatu, 2014.....	32
TABELA 3. Principais características técnico-econômicas de pequenos produtores rurais de leite. Botucatu, SP, 2014.....	37
TABELA 4. Resultados percentuais do escore dos tetos, e tipo de ordenha. Botucatu, SP, 2014.....	40
TABELA 5. Prevalência de mastite clínica e subclínica nos quartos de vacas leiteiras das propriedades avaliadas. Botucatu, SP, 2014.....	46
TABELA 6. Número de isolamentos por gênero microbiano nas ocorrências de mastites diagnosticadas em vacas leiteiras de pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.....	49
TABELA 7. Resultado da identificação de cepas de ECP e ECN isoladas do leite de vacas leiteiras de 21 pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.....	52
TABELA 8. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos do conjunto de latões de leite de vacas de pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.....	57

- TABELA 9. Média da CCS em leite oriundo do teto de vacas com mastite, de acordo com o gênero microbiano. Botucatu, SP, 2014.....61
- TABELA 10. Média da CCS em leite oriundo do teto de vacas com mastite, de acordo com o grupo de ECP e ECN. Botucatu, SP, 2014.....62
- TABELA 11. Perfil de sensibilidade de linhagens do gênero *Staphylococcus* frente a diferentes antimicrobianos. Botucatu, SP, 2014.....65
- TABELA 12. Perfil de sensibilidade de linhagens de estafilococos coagulase positivo (ECP) frente a diferentes antimicrobianos. Botucatu, SP, 2014.....67
- TABELA 13. Perfil de sensibilidade de linhagens de estafilococos coagulase negativo (ECN) frente a diferentes antimicrobianos. Botucatu, SP, 2014.....68
- TABELA 14. Presença dos genes que codificam a produção de enterotoxinas em ECP e ECN, isolados em amostras de leite de vacas obtidas de propriedades da agricultura familiar. Botucatu, SP, 2014.....70
- TABELA 15. Distribuição dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas nas linhagens de ECP e ECN isolados de leite de vacas de pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.....71
- TABELA 16. Frequência dos genes codificadores de enterotoxinas em espécies de ECP, isolados a partir de amostras de leite de vacas obtidas em pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.....73

TABELA 17. Frequncia dos genes codificadores de enterotoxinas em espécies de ECN, isolados a partir de amostras de leite de vacas obtidas em pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.....	73
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CBT – contagem bacteriana total

CCS – contagem de células somáticas

CMT – California Mastitis Test

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DNA – ácido desoxirribonucléico

DTA – doenças transmitidas por alimentos

ECN – estafilococo coagulase negativo

ECP – estafilococo coagulase positivo

FAO – Food and Agriculture Organization

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IN – Instrução Normativa

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAA – Programa de Aquisição de Alimentos

PCR – reação em cadeia pela polimerase

PIB – Produto Interno Bruto

PNAE – Programa Nacional de Alimentação Escolar

PNMQL – Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite

SE – enterotoxina estafilocócica

SIAL – Sistema Agroalimentar Local

UE – União Européia

UHT – ultra high temperature

RESUMO

A atividade leiteira na agricultura familiar é fundamental para sobrevivência e manutenção do homem no campo. A mastite bovina impacta negativamente a produção leiteira e oferece riscos à saúde pública. O presente estudo avaliou a qualidade do leite proveniente da agricultura familiar na região de Botucatu-SP, as dificuldades enfrentadas pelos produtores, a etiologia das mastites, e o perfil de sensibilidade dos patógenos aos antimicrobianos. Avaliou-se também a presença de genes produtores de enterotoxinas em linhagens de *Staphylococcus* isoladas. Objetivou também a recomendação de ações para melhoria na produção, visando a qualidade do leite. Aplicou-se um questionário socioeconômico aos produtores e foram coletadas amostras individuais do leite do conjunto de latões de cada propriedade e de vacas diagnosticadas com mastite pelo *California Mastitis Test* (CMT). Avaliou-se os teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco, extrato seco desengordurado, a contagem bacteriana total (CBT), e a contagem de células somáticas (CCS). Foram analisadas 21 propriedades onde constatou-se que a idade média dos produtores era de 59 anos. Apenas cinco deles (23,8%) tinham ensino médio completo ou superior, sendo que nenhum (0%) contava com assessoria veterinária. Quanto às instalações da sala de ordenha, apenas quatro (19,0%) possuíam estábulos com piso concretado e quatro (19,0%) utilizavam sistema de ordenha mecânica. Quanto ao manejo, apenas um (4,8%) realizava pré-*dipping* corretamente, nenhum (0%) realizava pós-*dipping*, dois (9,5%) utilizavam papel toalha descartável na ordenha e somente dois produtores (9,5%) utilizavam o CMT com periodicidade. Em contrapartida, 15 produtores (71,4%) revelaram terem utilizado antimastíticos para tratamento das vacas. Com relação aos animais, foram avaliadas 239 vacas (média = 11,4 animais/propriedade). A mastite clínica foi verificada em apenas duas vacas (<1%), enquanto que 86 animais apresentaram leite positivo ao CMT (35,9% de mastite subclínica). Foram cultivadas 177 amostras de leite, sendo que em 55 (31,1%) foram identificados estafilococos, em 25 (14,1%) estreptococos, em 45 (25,4%) corinebacterias e em 4 (2,3%) coliformes. A CBT de todas as propriedades apresentou média de 505×10^3 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL de leite. A CCS média das propriedades foi de 364×10^3 CS/mL. A

média da CCS das amostras procedentes de todos os tetos infectados avaliados foi de 1.598 CS/mL, enquanto que nos casos onde foram isolados *Staphylococcus* spp. foi de 1.362 CS/mL, *Streptococcus* spp. 2.857 CS/mL, *Corynebacterium* spp. de 976 CS/mL e nos casos de coliformes 1.161 CS/mL. As análises físico-químicas revelaram médias de 3,4% de gordura, 3,5 % de proteínas, 4,5% de lactose, 12,3% de sólidos totais e 8,9% de extrato seco desengordurado. Os estafilococos revelaram maior sensibilidade (>95%) à cefalotina, cotrimoxazol, enrofloxacina e gentamicina, com resistência à penicilina (41,2%) e oxacilina (11,8%). Tanto estafilococos coagulase positivos (ECP) e negativos (ECN) revelaram genes codificadores de enterotoxinas em 21,6% e 41,9%, respectivamente. O gene *sea* foi o mais detectado 45,8% (n=24), seguido pelo *seb* com 29,2% e *sec* com 25,0%. O gene codificador da SED não foi identificado nas amostras de *Staphylococcus* pesquisadas. Observou-se falta de conhecimento básico e técnico dos produtores leiteiros da agricultura familiar. A estrutura precária, a falta de investimentos materiais e tecnológicos e de assessoria veterinária prejudica a produtividade do homem no campo. Destaca-se ainda o risco potencial à saúde pública pela veiculação de genes produtores de enterotoxinas, que podem ocasionar toxi-infecções alimentares. Atividades de educação sanitária são necessárias para a obtenção higiênica do leite, controle de mastites, e produção de leite de melhor qualidade.

ABSTRACT

Dairy farming on family farms is critical for survival and maintenance of the rural worker. Bovine mastitis negatively impacts milk production and presents risks to public health. This study evaluated the quality of the milk from the family farm in the region of Botucatu-SP, the difficulties faced by producers, the mastitis etiology, and sensitivity profile of pathogens against antimicrobials. Also evaluated the presence of enterotoxin producing genes in isolated staphylococcal strains. Also aimed the recommendation of actions to improve the production, seeking the quality of the milk. A Socioeconomic questionnaire was applied to producers and individual milk samples were collected from the set of brasses of each property and from cows diagnosed with mastitis by California Mastitis Test (CMT). It was evaluated the levels of fat, protein, lactose, dried extract and nonfat dry extract, the total bacterial count (TBC) and the somatic cell count (SCC). Twenty one (21) properties were analyzed where it was found that the average of the farmers was 59 years. Only five of them (23.8%) had completed high school or higher, and none (0%) counted on veterinary advice. As for their facilities of milking parlor, only four (19.0%) had stables with concreted floor and four (19.0%) used mechanical milking system. As to the handling, only one (4.8%) performed pre-dipping correctly, none (0%) performed post-dipping, two (9.5%) used disposable paper for milking and only two producers (9.5%) used the CMT with periodicity. On the other hand, 15 producers (71.4%) stated that they used anti mastitis for treating the cows. Regarding the animals, 239 cows (average = 11.4 animals / property) were evaluated. The clinical mastitis was detected in only two cows (<1%), whereas 86 animals showed milk positive to CMT (35.9% of subclinical mastitis). One hundred seventy-seven (177) milk samples were cultured, on 55 (31.1%) of them it was identified staphylococci, on 25 (14.1%) streptococci, on 45 (25.4%) corynebacteria and on 4 (2.3%), coliforms. The CBT of all properties presented an average of 505×10^3 colony forming units (CFU) / mL of milk. The CCS average of all properties was 364×10^3 CS / mL. The CCS average of the samples from all infected ceilings evaluated was 1,598 CS / ml, while in cases where *Staphylococcus* spp. were isolated was 1,362 / ml, *Streptococcus* spp. 2857 CS / mL, *Corynebacterium* spp 976 CS / ml and in the cases of coliforms

1,161 CS / mL. The physicochemical analysis revealed averages of 3.4% of fat, 3.5% of protein, 4.5% of lactose, 12.3% of total solids and 8.9% of nonfat dry extract. The Staphylococci showed high sensitivity (> 95%) to cephalothin, cotrimoxazole, enrofloxacin and gentamicin with penicillin resistance (41.2%) and oxacillin (11.8%). Both coagulase-positive (SCP) and negative (SCN) staphylococci revealed genes coders of enterotoxins in 21.6% and 41.9%, respectively. The *sea* gene was the most detected – 45.8% (n = 24), followed by *seb* with 29.2% and *sec* with 25.0%. The gene coder of SED was not detected in the studied samples of Staphylococcus. It was noticed that there was a lack of basic and technical knowledge of the dairy family farmers. The precarious structure, the lack of material and technological investments and veterinary advice impair productivity of man in the field. It also stands out the potential risk to public health by the spread of genes producers of enterotoxin that can cause food toxi-infection. Health education activities are required to obtain hygienic milk, mastitis control and milk production of better quality.

Introdução e justificativa

1. Introdução e justificativa

Pinturas rupestres datadas com mais de dez mil anos evidenciam o uso do leite como alimento desde os primórdios da civilização. Sua composição rica em proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e sais minerais são essenciais para o desenvolvimento orgânico dos humanos e das demais espécies de mamíferos.

O leite é o primeiro alimento consumido após o nascimento, processo no qual ocorre aquisição, pelo colostro, de imunidade passiva. Importante também em todas as fases da vida para os humanos, em especial para crianças e idosos, e o notório valor nutricional dá-se tanto “in natura” quanto na forma de derivados (COSTA, 1991).

Nos últimos anos, a produção de leite no Brasil, cresceu de forma exponencial. O país assumiu a posição de exportador do produto e passou a ocupar a terceira posição no ranking mundial (IBGE, 2012). O setor movimenta anualmente cerca de R\$ 64 bilhões e contribui com 15% do produto interno bruto (PIB) agropecuário, ou seja, 1,3% do PIB nacional (Fundação Banco do Brasil, 2010).

A atividade também é responsável pela geração de quase quatro milhões de empregos diretos e é importante fonte de renda para diferentes segmentos produtivos. Além da importância econômica, a cadeia do leite tem destacada função social, pois gera renda para grande número de produtores rurais, contribui para a absorção de mão-de-obra e proporciona a fixação do homem no campo (GOMES et al., 2001).

Apesar de inúmeras propriedades atuarem profissionalmente na atividade, chegando a produzir 50 mil litros de leite diários, dos 1,3 milhão de produtores contabilizados no país, cerca de 85% podem ser classificados como pequenos criadores ou de agricultura familiar. Com produção diária variando entre 50 a 100 litros, este grupo caracteriza-se pela baixa tecnificação, deficiência no manejo, falta de controle sanitário, inadequadas condições higiênicas de ordenha, precário sistema de armazenamento e transporte do leite (ZOCCAL et al., 2004; Milkpoint, 2012a).

Este cenário contribui para a baixa produtividade do rebanho leiteiro, acarreta perdas de competitividade e prejudica a consolidação do setor

nacional na economia mundial. Enquanto no Brasil a produção anual média de uma vaca é de aproximadamente 1,3 mil quilos de leite, nos principais países produtores e exportadores do produto, como Israel e Nova Zelândia, esta média chega a nove mil kg/vaca/ano (MAGALHÃES et al., 2004; PONCHIO et al., 2005; Embrapa Gado de Leite, 2007).

A mastite, que compromete a fisiologia da glândula mamária, é um dos principais fatores responsáveis pela diminuição do volume de produção do rebanho leiteiro. Acarreta também perdas econômicas diretas pelo gasto com medicamentos, mão-de-obra, honorários de profissionais, descarte precoce de animais e pelo baixo valor comercial do produto (LANGONI et al., 1998).

Outro aspecto importante são os danos relativos à qualidade do produto, já que está diretamente associado à carga microbiana e à saúde da glândula mamária. A baixa qualidade do leite cru produzido no território nacional é notória e o beneficiamento resulta em produtos de qualidade insatisfatória e com menores tempos de prateleira (BELOTI et al., 1999; ROCHA et al., 2006).

Ainda que os dados epidemiológicos de enfermidades sejam subestimados, são frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite e de derivados contaminados. Soma-se a isto, estimativa do alto percentual de leite comercializado no mercado informal, que é estimada em patamares próximos à 30% resultando em perspectiva preocupante em relação à saúde pública (SCOT CONSULTORIA, 2011). Seja pelo risco de transmissão de agentes etiológicos de zoonoses ou das possíveis toxi-infecções provocadas pelo leite, são necessários cuidados para se assegurar a integridade e qualidade dos produtos lácteos destinados ao consumo humano (GUIMARÃES & LANGONI, 2009).

A etiologia das mastites é bastante variada, embora as causas bacterianas sejam responsáveis por aproximadamente 90% dos casos. O gênero *Staphylococcus* é o principal envolvido na prevalência e na persistência da mastite no rebanho leiteiro, sendo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) uma das espécies de maior importância.

S. aureus destaca-se pelo difícil tratamento devido à alta resistência aos antimicrobianos utilizados e pela presença de vários fatores de virulência, causando infecções de longa duração e com baixa taxa de cura. Outra característica importante é a capacidade de produção de exotoxinas, podendo

levar a quadros de intoxicação pela ingestão de toxinas termoestáveis produzidas e liberadas durante sua multiplicação no alimento.

Apesar da importância do gênero e de suas enterotoxinas, em saúde pública há pouca informação sobre a prevalência da incidência dos genes que as codificam, em *Staphylococcus* isolados de leite de animais em propriedades da agricultura familiar.

O presente estudo investigou a caracterização socioeconômica de pequenos produtores rurais do município de Botucatu - SP, abordou aspectos relativos à qualidade microbiológica e físico-química do leite produzido, bem como os riscos potenciais na disseminação de estafilococos toxigênicos e de toxinas. Informações e orientações técnicas foram transmitidas para esses produtores, com o objetivo de incrementar a produção e a qualidade do leite obtido.

Revisão da literatura

2. Revisão da literatura

2.1. Leite: alimento e negócio

O leite secretado pelas fêmeas dos animais mamíferos com finalidade de nutrir a cria é utilizado na alimentação humana há pelo menos oito mil anos, quando se intensificou o processo de domesticação dos animais. A fácil adaptação do organismo, pela produção de enzimas, para digerir o leite de diferentes espécies tornou-o um alimento universal, consumido pelos humanos durante toda a vida (RUSSI et al., 2011).

O leite é composto por sistema coloidal, mistura complexa e heterogênea, baseado na dispersão das partículas no meio que o compõe. Apresenta percentual de água da ordem de 87%, no qual os minerais dissolvidos caracterizam a solução. As proteínas se encontram em suspensão e as gorduras formam a emulsão (LEITE et al., 2006).

As proteínas do leite têm alta propriedade nutricional e fornecem aminoácidos essenciais para o desenvolvimento fisiológico do organismo. Podem ser divididas em duas subclasses denominadas caseína e o soro do leite. As caseínas são abundantes no leite bovino (representa 80% das proteínas), e por esse motivo relativamente indigestas. O soro do leite (20%) é rico em β -lactoglobulina que, por ser uma proteína ausente no leite humano, é grande causa de reações alergênicas. Outras proteínas como a α -lactalbumina, albumina, imunoglobulina e lactoferrina contribuem na proteção e manutenção da saúde (GONZÁLEZ, 2001).

As gorduras, ou lipídeos, são importantes no processamento e conservação do leite. Predominam os triacilgliceróis, composto por um glicerol e três resíduos de ácido graxo, além de fosfolipídeos, esteróis e ácidos graxos saturados como oléico, palmítico, esteárico e mirístico. A fração desses componentes no leite é diretamente influenciada pelo ambiente, estágio de lactação e dieta do animal (PERES, 2001).

A lactose é o carboidrato de maior proporção no leite. Pode atingir 5% da composição e é a maior fonte de energia deste alimento. No processo de digestão, a enzima lactase fragmenta este carboidrato em glicose e galactose para que ocorra a absorção pelo organismo. Pessoas que não produzem a lactase podem desenvolver intolerância ao leite, com variados sinais no trato

gastrintestinal devido ao acúmulo de lactose no trato gastrointestinal (GONZÁLEZ, 2001).

Em relação aos minerais, o leite é conhecida fonte de cálcio e fósforo, além de conter cloretos, citratos, potássio e magnésio. Já entre as vitaminas, possui quantidade significativa de vitaminas A, E, K e do complexo B. O leite é pobre em zinco, cobre e ferro, bem como em vitaminas do tipo C e D, que se perdem pela sensibilidade ao calor e à luz (LEITE et al., 2006).

Embora seja um alimento altamente nutritivo, ainda é muito baixa no Brasil a média de consumo *per capita* do leite. Enquanto a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda para adultos a ingestão de 216 litros/habitante/ano, no país essa média atinge somente 140 litros (COSTA, 2005; LEITE & CARVALHO et al., 2010).

Além de importante no aspecto nutricional e de preservação da saúde, o leite tem importância econômica mundial. Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO), a estimativa de produção mundial de leite bovino, para o ano de 2013, foi de aproximadamente 780 milhões de toneladas. Os Estados Unidos despontam como o principal produtor de leite no ranking mundial, com quase 15% do volume global. A Índia, segundo colocado, produz metade desse percentual, enquanto Brasil, Rússia, China, Alemanha e França seguem a lista de líderes mundiais na produção leiteira (FAO, 2013).

No entanto, este cenário está em constante dinâmica. Países membros da União Européia (UE), Ucrânia e até mesmo a Rússia perderam participação no mercado mundial, permitindo o estabelecimento de novos países produtores. No período entre 1995 e 2005 a produção mundial cresceu 14%, enquanto China, Nova Zelândia, Índia e Brasil cresceram, respectivamente, 303%, 58%, 44% e 37% (CARVALHO, 2006).

No âmbito comercial, o principal exportador mundial de lácteos é a Nova Zelândia. No continente europeu, destaca-se a Alemanha, que é também o maior produtor. País tradicional nas exportações de leite e creme de leite em pó, a Argentina lidera o comércio da América do Sul, exigindo pelo Brasil a imposição de barreiras à importação de produtos lácteos destes países. Importante ressaltar que o leite fluido e derivados frescos, pela alta perecibilidade, ainda têm baixa participação no comércio internacional (SIQUEIRA & PINHA, 2012).

Em contrapartida, no Brasil o principal produto do mercado interno (35% da produção anual de 30 bilhões de litros) é comercializado sob a forma fluida. O leite Longa Vida, ou UHT (*Ultra High Temperature*) representa mais de 80% do mercado formal deste segmento. Há, ainda, expectativas de maior crescimento, principalmente nos grandes centros urbanos, onde as famílias dedicam tempo cada vez menor à preparação de refeições e idas ao supermercado (GOMES et al., 2001).

O setor lácteo brasileiro, historicamente, sempre esteve voltado para atender a demanda interna, sendo recente sua inserção no mercado internacional. No início da década de 90, com o fim da regulamentação e tabelamento de preços, abertura de mercados e estabilização inflacionária, deu-se início a constante processo de transformações na atividade (BREITENBACH & SOUZA, 2011).

O aumento de competitividade exigiu ganhos em escala de produção, pois a margem de lucro unitário é baixa, levando à crescente concentração do mercado por processos de aquisições e fusões. Essa reorganização de mercados, aceleradas pelas exigências de qualidade criam barreiras intransponíveis para a pequena produção tradicional e tendem a deslocar a produção para médios e grandes produtores. A concorrência acirrada também contribui para manter uma pressão para baixo nas rendas obtidas pela produção agro-industrial (WILKINSON, 2003).

Dados revelaram que, no ano 2000, os dez maiores laticínios processavam 34% do leite inspecionado, enquanto que em 2009, esse percentual cresceu para 42% da produção. Ainda assim, as micro e pequenas empresas do setor de alimentos respondem por mais de 94% das indústrias no país (PONCHIO et al., 2005).

Além das mudanças econômicas, é importante pontuar outras transformações relevantes, como a forma de captação, com a granelização da coleta e fim do recebimento de leite não resfriado; início de políticas de pagamento por qualidade; incorporação de tecnologias no campo e desenvolvimento de novos produtos e processos industriais (CARVALHO, 2010).

A busca por ganhos em eficiência, diminuição de custos e aumento da lucratividade – tendência natural do mercado de *commodities* –, levou ao

incremento da produção de leite, apesar da diminuição do número de fornecedores. Mesmo assim, não houve melhoria relevante nos dados relativos à produtividade da pecuária leiteira. Dados de 2010 demonstraram que uma vaca nos Estados Unidos da América (EUA) produz diariamente quase 26 kg de leite, enquanto no Brasil essa média não atinge cinco quilos de leite diários por animal (JUNIOR & SANTOS, 2013).

No entanto, faz-se necessário considerar que os dados oficiais de produtividade devem ser analisados com cautela já que a metodologia censitária, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), incluem todos os domicílios pesquisados no heterogêneo universo das propriedades rurais brasileiras. Assim, fazendas com aptidão para corte que comercializam algum excedente de leite produzido para bezerros também são consideradas pelo censo, o que prejudica a precisão dos dados (RESENDE, 2010).

O atendimento de padrões sanitários e de qualidade e o estabelecimento de estratégias de promoção comercial, que despertem a confiança dos importadores, são também fundamentais na consolidação brasileira no mercado internacional de leite (BARROS, 2010).

2.2. Perfil do produtor brasileiro

A cadeia brasileira do leite é muito segmentada, com a participação distribuída entre pequenos, médios e grandes produtores e indústrias, resultando em uma heterogeneidade significativa de sistemas de produção. As recentes transformações vêm contrapondo, de maneira ainda mais evidente, os dois perfis básicos de produtores de leite: os produtores especializados e os não especializados (JANK et al. 1999).

O primeiro grupo caracteriza-se por produção de leite como a principal atividade. São especializados porque utilizam todo o *know how* disponível e, devido ao aprimoramento genético dos animais, melhoria na qualidade nutricional, adequações estruturais, tecnológicas e de manejo, controle sanitário e de higiene, conseguem importante diferenciação no volume e qualidade de leite produzido (VIANA et al., 2010).

No aspecto de gestão operacional, esses produtores especializados também buscam uniformizar os processos, controlar os custos de produção e otimizar a alocação dos recursos, promovem a qualificação dos colaboradores

e ampliam a participação em entidades que defendam seus interesses (SOUZA et al., 2011).

Em contraste, os produtores não especializados se caracterizam por um perfil extrativista, ou seja, com uso de técnicas ultrapassadas ou até mesmo rudimentares em uma atividade tipicamente de subsistência. Esse grupo, calculado em 90% das propriedades de leite no Brasil, se utiliza principalmente da mão-de-obra familiar e têm dificuldade na obtenção de recursos, financeiros e técnicos, para investirem na produção e gestão da produção leiteira (SILVA E TSUKAMOTO, 2001).

Apesar da dificuldade de inserção nesse recente ambiente competitivo, foi estimado no ano de 2006 que, do valor aproximado de R\$ 6,7 bilhões movimentados pela atividade leiteira no país, 59% foi oriundo da participação da agricultura familiar no segmento, enquanto os 41% restantes vieram dos grupos empresariais (CAMARGOS, 2003).

A existência de alternativas organizacionais, como associações e cooperativas, contribuíram no sinergismo operacional e econômico, permitindo a incorporação de novas tecnologias por pequenos produtores rurais. Os investimentos nas aquisições de tanques de resfriamento em atendimento aos novos parâmetros normativos, bem como a construção de sistemas agro-alimentares locais (SIALs), são exemplos concretos desses benefícios, possibilitando o acesso a novas oportunidades e a manutenção da agricultura familiar na atividade leiteira (WILKINSON, 2003; BREITENBACH & SOUZA, 2011).

Levantamentos realizados por Oliveira et al. (2000; 2002) no sul do país identificaram mais de mil pequenas agroindústrias rurais no estado de Santa Catarina e 1.528 cadastradas no Rio Grande do Sul, evidenciando a importância das experiências locais de produção agrícola para explorar o potencial competitivo do pequeno produtor.

Estudo realizado por Magalhães (2007), em cooperativas de agricultores familiares na região Sul, demonstrou que a habilidade na mobilização social e de capital, formando uma nova identidade social em torno da produção familiar de leite, foi capaz de confrontar estudos que apontaram como inexorável o processo de concentração de mercado e exclusão dos produtores mais pobres.

Alternativas apontam também para desenvolvimento de valores associados à pequena produção agrícola com combinação de conteúdos ambientais – sistemas agroecológicos e orgânicos – e sociais que proporcionam maior força mercadológica aos produtos ofertados ao consumidor. Entretanto, os custos de certificação tornam-se barreiras significativas na execução dessas políticas de valorização (WILKINSON, 2003; JANK JUNIOR, 2009).

O incremento de políticas públicas, como destacado por Paula et al. (2014), inserem a agricultura familiar no mercado institucional de produtos alimentícios. O Programa de Aquisição de Alimentos (PAA) e o Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) são exemplos dessa aproximação entre produção e consumo, que aliam o incentivo à produção de base familiar com melhoria nos aspectos nutricionais dos consumidores (BRASIL, 2009).

Por outro lado, se observa número elevado de produtores de leite que, pela impossibilidade de atender às pressões impostas pelo mercado ou desmotivação decorrente da pouca consolidação das políticas públicas no setor leiteiro, acabam aderindo ao mercado informal. Valendo-se do risco da ilegalidade, este produtor consegue agregar à sua produção parte da renda que seria apropriada pelos intermediários (SILVA E TSUKAMOTO, 2001).

No Brasil, a proibição da comercialização de leite cru está em vigor há mais de 60 anos. Entretanto, segundo dados obtidos entre 1998 e 2001 pelo IBGE (2004), de 35,6 a 42% do leite produzido no país não foi inspecionado por nenhum órgão oficial de fiscalização.

Como consequência, este leite comercializado de maneira informal expõe os consumidores a maiores riscos potenciais, com sérias implicações na saúde pública. O leite, pela sua composição rica em nutrientes, é um excelente meio para a multiplicação de diversos grupos de micro-organismos, fazendo-se necessário a implantação de ações para reduzir o número de produtores na informalidade e melhorar a qualidade do leite produzido no país (BELOTI et al., 1999; NERO et al., 2003).

2.3. Qualidade do leite

A qualidade do leite é fundamental para preservar a saúde de quem o consome e tem como principal parâmetro, o perfil microbiológico do produto. Este parâmetro está diretamente associado à carga microbiana inicial e à taxa

de multiplicação microbiana (COSTA, 2005). A qualidade depende fundamentalmente das fontes de contaminação do leite, que incluem a saúde da glândula mamária, condições de higiene na ordenha, limpeza dos equipamentos de ordenha e armazenamento do leite. O perfil microbiológico é dependente das variações nos parâmetros de tempo e temperatura durante o armazenamento do produto (GUIMARÃES, 2002).

Para obtenção de leite de boa qualidade é fundamental a realização de ordenha, adequada de animais saudáveis e limpos, obtidos com auxílio de equipamentos e utensílios higienizados. É necessário, ainda, que o produto sofra rápido resfriamento e seja corretamente armazenado. Nesse sentido, a grande diversidade de produtores e sistemas de produção acarreta em qualidade duvidosa do leite produzido no país (SANTOS & FONSECA, 2007).

A busca pela melhoria na competitividade e qualidade levou o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil a implementar, em 1998, o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), atribuindo índices e procedimentos mínimos para a produção de leite no território nacional.

Um marco desse programa foi a publicação, em 2002, da Instrução Normativa (IN) nº 51, na qual foram estabelecidos novos padrões microbiológicos e físico-químicos com índice rigorosos quanto à contagem de células somáticas (CCS), contagem bacteriana e detecção de resíduos de antimicrobianos. Também foi estabelecido que todo leite deveria ser imediatamente resfriado após a ordenha e entregue aos laticínios no prazo máximo de 48 horas (BRASIL, 2002).

No entanto, sua implementação, per si, não garante a melhoria na qualidade. É fundamental também a ampliação nos cuidados relacionados à higiene da ordenha, saúde e manejo do rebanho bovino (instrução, treinamento e qualificação de mão-de-obra) pelo desenvolvimento de programas regionais de assistência à cadeia leiteira, em especial para aqueles de baixa produção (OLIVEIRA & SILVA, 2012).

As principais ferramentas utilizadas na avaliação da qualidade microbiológica do leite são a contagem bacteriana total (CBT) e a contagem de células somáticas (CCS). A primeira é um indicativo da higiene do produto, isto é, sinaliza de forma indireta se a ordenha, armazenamento e transporte do

produto foram corretamente realizados e se os utensílios utilizados estavam adequadamente higienizados. Enquanto a CCS indica a saúde da glândula mamária, avaliando a quantidade de células inflamatórias presentes no leite. Na presença de agente infeccioso no interior do úbere ocorre resposta inflamatória, com influxo de leucócitos do sangue para o leite. Este processo inflamatório provoca alterações na composição do leite, reduzindo a qualidade (VARGAS et al., 2013).

Atualmente está em vigência, para a região Sudeste, a CBT com valor máximo de 300.000 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) e para a CCS a contagem máxima aceitável é de 500.000 células somáticas por mililitro de leite (CS/mL). A baixa contagem em ambos parâmetros resulta em produtos com maior rendimento industrial, com maior tempo de prateleira e, sobretudo, maior segurança para o consumidor final (BRASIL, 2011).

A obtenção higiênica do leite, além de impactar diretamente na qualidade do produto, aumenta a produtividade do rebanho como um todo pela diminuição da prevalência das infecções intramamárias – mastites –, resultando em ganhos econômicos diretos e indiretos para o produtor rural (LANGONI et al., 2011).

2.4. Mastites

A mastite, enfermidade mais prevalente em bovinos leiteiros, acomete a glândula mamária, órgão singular sob o ponto de vista da complexidade fisiológica, biofísica e anatômica (CUNNINGHAN, 1999). Trata-se de um processo inflamatório que pode ser de origem fisiológica, metabólica, alérgica, traumática ou infecciosa, levando a alterações físico-químicas e bacteriológicas do leite, sendo as causas infecciosas a mais significativa, tanto no aspecto econômico quanto no interesse para a saúde pública.

A etiologia das mastites é complexa devido à diversidade de micro-organismos envolvidos. Foram descritos aproximadamente 140 micro-organismos na gênese da mastite bovina, entre espécies, subespécies e sorovares. As bactérias são responsáveis por 90% dos casos, implicando em riscos devido à transmissão de agentes etiológicos de zoonoses tradicionais e emergentes (TOZZETI et al., 2008; GUIMARÃES & LANGONI, 2009).

Os patógenos envolvidos na mastite bovina são classificados em ambientais e contagiosos, dependendo da origem e modo que ocorre a transmissão. O primeiro grupo caracteriza-se por ser veiculado à glândula mamária no período entre ordenhas, a partir do solo, fezes, água e cama dos animais, como reflexo do manejo inadequado e falta de higiene do ambiente, dos animais e dos equipamentos de ordenha. Este grupo é composto principalmente por enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp.), *Pseudomonas* spp., fungos, leveduras, algas e certas espécies do gênero *Streptococcus*, considerados não *agalactiae*.

Já o grupo dos patógenos classificados como contagiosos, caracterizam-se pela própria vaca ser a fonte de infecção, recebendo denominação de “vaca dependentes”. A infecção ocorre principalmente durante a ordenha, de uma vaca contaminada a outra, pelas mãos dos ordenhadores, equipamentos de ordenha, panos de secagem dos tetos e outros fômites. Destacam-se neste grupo *Staphylococcus* spp., tanto os coagulase positiva como *S. aureus*, e os coagulase negativa, além de *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma* spp.

A diferenciação desta classificação dos patógenos é de extrema importância porque a adoção de medidas de prevenção e controle da enfermidade é distinta para cada grupo de micro-organismos (LANGONI et al., 1998; RYSER, 1998; RADOSTITS et al., 2007).

Outra diferença importante da enfermidade é a forma de apresentação, que pode ser clínica ou subclínica. A forma clínica é caracterizada por alterações na glândula mamária, na macroscopia do leite e, eventualmente, por sinais sistêmicos. Pode ser aguda, com sinais evidentes de inflamação – edema, dor, calor e rubor – ou crônica, na qual ocorre presença de grumos e coágulos, além de fibrose do tecido mamário (COSTA, 1998).

Também podem ocorrer alterações na composição do leite como o aumento de células somáticas e na concentração de teores de cloro e sódio, diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura, sem que sejam observados sinais de processo inflamatório. Neste caso, tem-se a forma subclínica da mastite, que é diagnosticada com base em testes indiretos como o *California Mastitis Test* (CMT), Whiteside, condutividade elétrica, CCS ou em lâmina pelo método de Prescott Breed (CUNHA et al., 2008).

O método mais utilizado para o diagnóstico da mastite subclínica é o CMT. Desenvolvido em 1957 por Schalm e Noorlander, indica o conteúdo celular do leite de maneira eficiente, com baixo custo e de fácil execução. A interpretação baseia-se na observação da mistura entre o leite e o reagente, que forma um gel de consistência proporcional ao número de células somáticas no leite. O grau de positividade varia entre os escores de uma cruz (1+) a três cruces (3+), devido à massa viscosa formada. O resultado negativo mostra mistura homogênea e normal após homogeneização da mistura entre leite e reagente.

2.5. Estafilococos

O gênero *Staphylococcus* foi descrito pela primeira vez por Rosenbach, no ano de 1884, e foi classificado na família Micrococcaceae. Entretanto, com os avanços nas áreas de genética, biologia molecular e, principalmente, estudos relacionados ao RNA ribossômico 16S, ocorreu a inclusão deste gênero em uma nova família: Staphylococcaceae (GARRITY & HOLT, 2001).

Os micro-organismos desse gênero são classificados como cocos Gram-positivos, mesófilos, anaeróbios facultativos, imóveis, não formadores de esporos, não fotossintéticos, possuem diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm e se dividem em diferentes planos, que os conferem formato de “cachos de uva” na visualização microscópica. São, ainda, catalase-positiva, oxidase-negativa e apresentam metabolismo fermentativo com produção de ácido e não gás (KLOOS & BANNERMAN, 1999; GERMANO & GERMANO, 2001).

Os estafilococos crescem rapidamente na maioria dos meios bacteriológicos. Em meio sólido, as colônias são redondas, lisas, elevadas, brilhantes, com 2 a 3 mm de diâmetro. A capacidade de se desenvolverem em meios com alta concentração de NaCl, a relativa tolerância ao terulito de potássio e ao cloreto de lítio, possibilitam seu isolamento em meios seletivos como o ágar Baird Parker (CUNHA et al. 2007a).

Atualmente o gênero está subdividido em 46 espécies e 24 subespécies, classificadas em primeiro plano de acordo com a capacidade de síntese ou não da enzima coagulase, sendo a grande maioria estafilococos coagulase negativa (ECN). *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* são espécies classificadas como estafilococo coagulase positiva (ECP), característica que é considerada um fator de virulência já que o

coágulo fibrinoso dificulta o acesso das células do sistema imune ao local da infecção (BANNERMAN et al. 2003; KWOK & CHOW, 2003; MADIGAN et al., 2004; EUZÉBY, 2012).

A importância dos estafilococos na epidemiologia das doenças transmitidas por alimentos decorre de que, sob condições favoráveis, essas bactérias se multiplicam e são capazes de produzir enterotoxinas, levando à intoxicação alimentar estafilocócica, considerada a doença de origem alimentar mais comum em todo o mundo (BALABAN & RASOOLY, 2000). Este cenário agrava-se pelo fato de *Staphylococcus* serem agentes etiológicos de alta prevalência nas mastites, podendo contaminar o leite e seus derivados (LANGONI et al., 1998; RABELLO, 2003; QUINN et al. 2005; ZAFALON et al., 2007).

É estimado que nos EUA o número anual de casos de intoxicação alimentar ocasionada por este gênero bacteriano seja de 185 mil, sendo responsável por 1.750 hospitalizações que acarretam em custos médicos e perdas de produtividade na ordem de 1,5 bilhão de dólares (CENCI-CONGA et al., 2003). No entanto, é relatado que a real incidência dessas intoxicações é subestimada, pois como os sintomas geralmente são brandos e de curta duração, apenas 10% dos indivíduos acometidos procuram atendimento médico (SMYTH et al., 2004).

2.6. *S. aureus*, enterotoxinas e a saúde pública

Dentre o grupo de ECP, a espécie *S. aureus* é considerada a mais importante pela alta patogenicidade e riscos potenciais à saúde humana. Tem capacidade de multiplicar-se em condições ambientais adversas: temperaturas que variam de 7 a 48°C, faixa de pH entre 4 a 10, atividade de água (a_w) entre 0,83 e 0,99, além de serem halo-tolerantes em concentrações de cloreto de sódio compreendidas entre 7 e 10% (JAY, 1993; GERMANO & GERMANO, 2001).

A versatilidade nutricional e capacidade de crescerem em diferentes condições ambientais contribuem para que este micro-organismo se desenvolva com facilidade em vários alimentos, conferindo ao *S. aureus* a terceira posição em importância nas doenças transmitidas por alimentos (DTA),

depois de *Salmonella* e *Clostridium perfringens* (BEAN, et al., 1996; LOIR et al., 2003; NORMANNO et al., 2005;).

É um dos principais causadores de mastites em rebanhos leiteiros e, devido às características de virulência (como a produção de biofilme e cápsula), a capacidade de invasão das células epiteliais mamárias e comprovada resistência aos antimicrobianos, infecções mamárias provocadas por este agente são de difícil tratamento (SÁ et al. 2004; RUEGG, 2005). O principal reservatório de *S. aureus* são as próprias glândulas mamárias, a partir das quais ocorre a transmissão para outras vacas (ZAFALON et al., 2007).

Em humanos, é estimado que 60% da população é portadora intermitente e 20% são portadores persistentes de *S. aureus*, que é frequentemente isolado na nasofaringe. Estudo realizado no Brasil revelou que 30% dos manipuladores de alimentos possuíam o trato respiratório inferior colonizados por *S. aureus*, podendo facilmente contaminar as mãos dos indivíduos e alcançar os alimentos durante sua manipulação (MURRAY et al., 2000; ACCO et al., 2003).

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são um grupo de proteínas de cadeia simples, de baixo peso molecular, produzidas durante todas as fases de multiplicação bacteriana, mas especialmente durante a metade e o fim da fase exponencial (SORIANO et al., 2002). Apresentam resistência ao calor e às enzimas proteolíticas tripsina, pepsina, renina e papaína, o que permite a passagem pelo trato gastrintestinal sem perda de atividade (HUY, 1994). A produção de enterotoxinas não está restrita somente à espécie *S. aureus*, mas também a outras espécies de estafilococos como os ECNs (RADOSTITS et al., 2007).

Já foram descritos 22 tipos de enterotoxinas distintas e variantes que foram nomeadas com letras do alfabeto de acordo com a ordem cronológica de suas descobertas (MARTIN et al., 2001). Os tipos de SE conhecidos são A e B, C₁, C₂, C₃, D, E, G, H, I, J, K, L, M, entre outras. No entanto, as mais comuns em intoxicações alimentares são A, B, C, D e E, conhecidos como enterotoxinas clássicas (SÁ et al., 2004). Em condições favoráveis foi constatado que esses micro-organismos podem produzir mais de um tipo de enterotoxina (BERGDOLL, 1989).

A intoxicação alimentar estafilocócica em humanos é causada pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas pré-formadas por linhagens de

Staphylococcus enterotoxigênicos. O leite e derivados são ótimos substratos para a multiplicação destes micro-organismos e, por isso, são os alimentos mais presentes em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (CENCI-GOGA et al., 2003; FUEYO et al., 2005).

As toxinas podem ser excretadas no leite e permanecerem estáveis nos produtos oferecidos ao consumo mesmo após sofrerem tratamentos térmicos ou até mesmo fervura do leite por tempo superior a 15 minutos (BHATIA & ZAHOOR, 2007). São fatores contribuintes para a elevada frequência desses surtos a baixa qualidade do leite cru, além da sua manipulação indevida desde a fazenda produtora até o comércio varejista (Sena, 2000).

Os sinais iniciam após período curto de incubação (entre 2 a 6 horas), manifestados por náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, sudorese e cefaléia, e têm duração aproximada de 24 a 48 horas. Casos mais graves podem acometer recém-nascidos, idosos e pessoas portadoras de doenças imunossupressoras. Além de gastroenterites, pode causar baixa pressão sanguínea e edema pulmonar. Entretanto, a mortalidade nesse quadro é rara (BALABAN & RASOOLY, 2000; PINTO et al., 2005).

Para reduzir a presença do *S. aureus* e outros micro-organismos indesejáveis no leite cru é fundamental diminuir a prevalência das infecções intramamárias pelo desenvolvimento de atividades de orientação e apoio aos produtores. Para tal, recomenda-se o aprimoramento de técnicas de diagnóstico individual de mastite clínica e subclínica, identificação laboratorial dos agentes infecciosos envolvidos, tratamento antimicrobiano adequado dos quartos acometidos, limpeza e desinfecção dos tetos (pré e pós-dipping) e do ambiente, bem como provisão de água de boa qualidade, suficiente ao desenvolvimento das atividades inerentes da produção.

O presente projeto teve por objetivo caracterizar o perfil socioeconômico de pequenos produtores de leite e avaliar a qualidade do produto, no município de Botucatu, SP. Foram aplicados questionários, realizadas visitas técnicas, análises microbiológicas, físico-químicas, contagem bacteriana e contagem de células somáticas, além da detecção de genes codificadores de enterotoxinas em linhagens de *Staphylococcus* spp. A orientação aos produtores para a obtenção higiênica do leite, controle de mastites, com consequente melhoria de qualidade do leite também foi considerado objetivo nesse estudo.

Objetivos

3. Objetivos

3.1. Geral

Avaliar o perfil socioeconômico de produtores de leite na agricultura familiar e a qualidade do leite no município de Botucatu, SP, com ênfase na pesquisa de estafilococos enterotoxigênicos.

3.2. Específicos

3.2.1. Estabelecer o perfil socioeconômico de pequenos produtores de leite da Baixada Serrana do município de Botucatu, SP.

3.2.2. Avaliar a prevalência de mastite subclínica e clínica e o escore de tetos em rebanhos leiteiros bovinos de propriedades de agricultura familiar da referida região.

3.2.3. Investigar a microbiota aeróbica dos casos de mastites subclínicas e clínicas evidenciadas nas propriedades e sua relação com a CCS do leite dos respectivos tetos.

3.2.4. Avaliar a qualidade microbiológica de amostras de leite do conjunto de latões de cada propriedade pela CBT e a correspondência em relação à legislação vigente.

3.2.5. Realizar análises físico-químicas no leite de amostras do conjunto de latões oriundo de cada pequena propriedade e a correspondência com a legislação vigente.

3.2.6. Comparar os resultados obtidos (itens 3.2.2., 3.2.3., 3.2.4., 3.2.5.) em todas as propriedades e identificar os pontos (estruturais e de manejo) que mais influenciam nestes resultados, além de promover a orientação focada em resultados aos produtores de agricultura familiar.

3.2.7. Classificar as linhagens de ECPs e ECNs de amostras de leite oriundas dos tetos de vacas em lactação em pequenas propriedades rurais.

3.2.8. Estabelecer o perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” dos isolados em vacas com mastite das diferentes propriedades, visando o tratamento de casos de mastites clínicas agudas e no tratamento para secagem (terapia da vaca seca).

3.2.9. Detectar os genes responsáveis pela produção das enterotoxinas A, B, C e D em linhagens de ECPs e ECNs isoladas das diferentes propriedades, pesquisando o fator de risco do leite na transmissão de toxinfecção alimentar, nas propriedades estudadas.

Material e métodos

4. Material e métodos

A aplicação do questionário socioeconômico, observação do manejo, colheita de dados e amostras de leite bovino foi realizada em pequenas propriedades rurais localizadas na região de Botucatu-SP, no período entre março a julho do ano de 2012. As análises microbiológicas, contagem de células somáticas e os estudos moleculares foram realizados no Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites (NUPEMAS) do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Campus de Botucatu, SP. As análises físico-químicas foram realizadas pela Clínica do Leite da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ – Campus de Piracicaba, SP.

4.1. Seleção das propriedades

Foram utilizados para o presente estudo dados socioeconômicos e amostras de leite coletadas em propriedades de pequeno porte do município de Botucatu, SP. Os produtores selecionados pertenciam à “Associação dos Produtores Rurais da Baixada Serrana de Botucatu – Armando Carlos Oli” e forneciam o produto para um laticínio da região, o que possibilitou acesso, em caráter complementar ao experimento, aos registros de dados coletados pela empresa, além de colaborar na caracterização do perfil dos produtores.

As propriedades possuíam características muito semelhantes em relação à raça, número e manejo dos animais. Ao mesmo tempo estão localizadas em uma mesma região geográfica, fato que atenuou diversas variantes ambientais no processo de comparação entre os dados obtidos. O principal critério de seleção utilizado foi o volume de leite produzido, obrigatoriamente igual ou inferior a 100 litros diários.

4.2. Questionário social, técnico e produtivo:

Foram realizadas coletas padrão de dados com o objetivo de traçar o perfil dos produtores, sendo abordados os seguintes itens:

- 4.2.1. Idade, escolaridade e participação familiar na atividade.
- 4.2.2. Área da propriedade e importância econômica da produção.
- 4.2.3. Infraestrutura e condições de higiene das instalações e equipamentos de ordenha.
- 4.2.4. Número de vacas em lactação e no período seco.
- 4.2.5. Raça predominante e produção média de leite.
- 4.2.6. Variação anual da produção.
- 4.2.7. Manejo dos animais (fornecimento de ração, tipo e número de ordenhas, uso de pré e pós-dipping, método de secagem, bezerro ao pé, dados de produção).
- 4.2.8. Controle de mastites (detecção da infecção, tratamentos).
- 4.2.9. Assistência veterinária (serviço público ou privado).
- 4.2.10. Tipo e manejo de pastagem.
- 4.2.11. Cuidados na aquisição de animais.

4.3. Diagnóstico de Mastite

O diagnóstico de mastite clínica foi realizado com base nos sinais clínicos da inflamação mamária (dor, rubor, calor e edema), à inspeção e palpação da glândula, sinais sistêmicos (febre, taquicardia, dispnéia, decúbito) e/ou alterações na macroscopia do leite (grumos, pus, sangue ou filamentos) pela prova da caneca telada de fundo escuro ou Tamis (RADOSTITS et al., 2007). A mastite subclínica foi diagnosticada com o auxílio do CMT (SCHALM e NOORLANDER, 1957). Amostras de leite positivas para o Tamis e com escore de positividade no CMT (de 1+ até 3+) foram coletadas de maneira asséptica de acordo com procedimentos pré-estabelecidos (NMC, 1999).

4.4. Escore dos tetos

Nas propriedades, todas as vacas lactantes, aparentemente saudáveis, tiveram os tetos avaliados segundo o aspecto dos esfíncteres, de acordo com os escores estabelecidos na FIGURA 1 abaixo, como preconizado por Ruegg (2005):



FIGURA 1. Critérios visuais utilizados na classificação do escore de tetos de bovinos, em propriedades da agricultura familiar. Botucatu, 2014.

Escore N (No ring): sem alteração no esfíncter, considerado normal = N.

Escore S (Smooth or Slight ring): leve alteração e textura macia, considerado leve = L.

Escore R: alterações visíveis, alteração de textura, considerado áspero = A.

Escore VR: alterações graves no esfíncter, com possível eversão = E.

4.5. Coleta do leite dos animais

Antes da ordenha, durante a triagem realizada com todas as vacas em lactação foram coletadas amostras de leite, de cada quarto mamário, com diagnóstico de mastite clínica ou subclínica. Para tanto, foi realizada a antissepsia do óstio do teto com álcool iodado a 2,5% e a amostra, de aproximadamente 15 mL, foi acondicionada em tubos previamente esterilizados. Até a realização dos exames microbiológicos, imediatamente após a chegada no laboratório, as amostras foram mantidas sob refrigeração (4 a 7°C) em caixas isotérmicas com gelo reciclável.

4.5.1. CCS dos animais

Coletou-se aproximadamente 50 mL de leite em frasco de plástico contendo o conservante celular bronopol (BERTRAND, 1996), de quartos mamários positivos aos teste CMT, bem como de uma amostra composta (“pool”) de cada animal com pelo menos um quarto mamário positivo. A CCS foi realizada em equipamento Somacount 300[®] (Bentley, UK) por citometria de fluxo.

4.6. Coleta do leite do conjunto dos latões

Foram coletadas amostras de leite do conjunto dos latões das propriedades com o objetivo de realizar as seguintes provas descritas a seguir:

4.6.1. Análise físico-química

As técnicas e interpretações dos resultados seguiram o preconizado pela IN nº 68 (BRASIL, 2006). Foram avaliados os seguintes índices: teor de gordura, teor de proteína e sólidos totais.

4.6.2. CBT

As técnicas seguiram o preconizado pela IN nº 62 (BRASIL, 2011) com o objetivo de realizar a CBT de micro-organismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos de amostras de leite do conjunto de latões de cada propriedade. A partir da amostra de leite foram realizadas diluições decimais, empregando-se a solução salina (0,85%) estéril. Em seguida, 1 mL de cada diluição foi transferido para placas de Petri estéreis vertendo-se cerca de 15 a 20 mL de ágar contagem padrão (Merck – Cód. 1.05463), previamente fundido e aquecido a 45°C. Após homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas, sendo então realizada a contagem de colônias. O número de colônias foi multiplicado pelo fator de diluição correspondente, resultando no número de micro-organismos mesófilos por mL de leite. Além desta contagem foram realizadas culturas após diluição 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , em placas de ágar sangue ovino (8%) e ágar MacConkey para a caracterização da microbiota presente em cada propriedade.

4.6.3. Contagem de células somáticas do leite dos latões

Com técnica semelhante à descrita no item 4.5.1 foi realizada a CCS referente ao rebanho de cada propriedade.

4.7. Identificação microbiológica

As técnicas de cultivo microbiológico foram realizadas de acordo com procedimentos padrão (NMC, 1999). Inicialmente foram cultivados 10 microlitros de cada amostra, em meios de ágar sangue ovino a 8%, ágar MacConkey, incubando-se a 37° C, com observação do desenvolvimento microbiano a cada 24 horas, durante 3 dias. As colônias isoladas foram repicadas, estudadas morfológicamente quanto às características fenotípicas (pigmentação e hemólise), bem como morfológicamente pela técnica de Gram, e classificadas de acordo com a capacidade de sintetizar a enzima coagulase (QUINN et al., 2005).

4.8. Classificação de ECNs e ECPs

As colônias bacterianas sugestivas do gênero *Staphylococcus* foram coradas pelo método de Gram e, no caso de cocos positivos pela análise morfo-tintorial, foram submetidas à prova da catalase e coagulase (KONEMAN et al., 2008). A diferenciação do gênero *Staphylococcus* em relação ao *Kocuria* ocorreu com base nas provas de oxidação e fermentação da glicose, pela resistência a bacitracina (0,04 U) – indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm – e pela sensibilidade à furazolidona (100 mg) – caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro (BAKER, 1984). Para diferenciação entre espécies de ECN foi utilizado o método proposto por Cunha et al. (2004), baseado na fermentação dos açúcares xilose, sacarose, trealose, maltose e manitol, produção de hemolisina e multiplicação, em condições de anaerobiose, no caldo tioglicolato. Para complementar a classificação das demais espécies e subespécies de ECN foram também utilizadas outras provas bioquímicas, como a redução de nitrato, produção de urease e/ou ornitina descarboxilase, fermentação de β -D-frutose e resistência à novobiocina.

4.9. Perfil de sensibilidade microbiana

Todos os patógenos isolados dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* foram submetidos à prova de sensibilidade microbiana pelo método de difusão em discos preconizado por Bauer et al. (1966), em placas de Ágar Mueller Hinton dispostas com os seguintes antimicrobianos: neomicina (30 µg), gentamicina (10 µg), penicilina (10 UI), oxacilina (10 µg), cefalotina (30 µg), enrofloxacina (5µg) e cotrimoxazol (25µg), disponíveis comercialmente e amplamente utilizados na profilaxia e terapia de mastite bovina, além da vancomicina (30 µg) e polimixina B (300 UI). A interpretação dos halos de inibição seguiu a referência do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

4.10. Extração do DNA

As linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas em cada propriedade, foram inoculadas, individualmente, em caldo Brain Heart Infusion (BHI), incubando-se a 37°C por 24 horas. O ácido nucléico foi extraído utilizando o Kit Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin® da GE Healthcare, conforme recomendações do fabricante. A digestão inicial das células de estafilococos deu-se com lisozima (10 mg/mL) e proteinase (20mg/mL), com posterior adição de 400 µL do tampão de extração. A seguir, a mistura foi centrifugada a 11.000 g por 1 min. e o sobrenadante transferido para a coluna, e novamente centrifugado com parâmetros semelhantes. O sobrenadante foi descartado e novamente 500 µL de tampão de extração foi adicionado à coluna. Após nova centrifugação e descarte do líquido, 500 µL da solução de lavagem foi adicionada à coluna, submetendo-se o material a nova centrifugação, desta vez a 11.000 g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e 200 µL de tampão de eluição aquecido a 70°C foi adicionado. O produto obtido foi centrifugado a 5.000 g por 1 minuto para recuperar o DNA, e foi mantido a -20°C, e a coluna foi desprezada.

4.11. Detecção de genes codificadores das enterotoxinas

Foram utilizados *primers* específicos para os genes codificadores das enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, de acordo com Johnson et al. (1991), conforme descrito na TABELA 1.

TABELA 1. Sequência das bases e tamanhos previstos dos produtos amplificados pelos primers utilizados na reação de PCR para detecção de genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*.

Gene	Primer	Seqüência	Tamanho do produto (bp)	Referências
<i>sea</i>	SEA-1	ttggaaacggttaaacgaa		
	SEA-2	gaacctcccatcaaaaaca	120	JOHNSON et al. (1991)
<i>seb</i>	SEB-1	tcgcatcaaactgacaaacg		
	SEB-2	gcaggtactctataagtgcc	478	JOHNSON et al. (1991)
<i>sec</i>	SEC-1	gacataaaagctaggaattt		
	SEC-2	aaatcggattaacattatcc	257	JOHNSON et al. (1991)
<i>sed</i>	SED-1	ctagtttgtaatatctct		
	SED-2	taatgctatatcttataggg	317	JOHNSON et al. (1991)

As reações em cadeia pela polimerase (PCR) foram realizadas em microtubos de 0,5 mL, em volumes totais de 25 µL, com 10 pmol de cada primer, 1,0 U de *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen), 200 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, PCR buffer 1X, 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL da amostra. Em todas as reações foram utilizados controles negativos com a substituição do ácido nucléico por água. A incubação foi realizada no termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), seguindo os parâmetros descritos por Johnson et al. (1991) com modificações de padronização e adaptação para o laboratório.

4.12. Visualização dos produtos amplificados

Os géis de agarose foram preparados em concentração de 2,0% em tampão de TBE 1X, corados com 1,0 µL/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) com o objetivo de atestar a eficiência das amplificações. O tamanho dos produtos foi comparado com o padrão 100 pb e posteriormente fotografado sob transiluminação UV.

4.13. Análise estatística

Estatísticas descritivas foram produzidas para caracterizar as propriedades e descrever as variáveis estudadas; modelos de regressão logísticas foram usados para estimar a probabilidade de mastite subclínica nos rebanhos em função de práticas de manejo adotadas; modelos mistos lineares foram usados para comparar a média da CCS no leite entre glândulas mamárias infectadas com diferentes patógenos, associar entre a média dos indicadores de qualidade do leite (CCS, CBT, características físico-químicas) no conjunto de latões de cada propriedade e diferentes práticas de manejo e estrutura das mesmas. Modelos de regressão logísticas ou testes de Qui-quadrado foram usados para testar a associação entre a homogeneidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. e práticas de manejo e estrutura das propriedades.

Resultados e discussão

5. Resultados e discussão

5.1. Perfil sócio-econômico dos produtores

Foi realizado levantamento dos membros da “Associação dos Produtores Rurais da Baixada Serrana de Botucatu”, pelo qual foi obtida listagem de 33 produtores de leite que abasteciam o tanque de expansão comunitário localizado no bairro botucatuense “Santo Antônio de Sorocaba”.

A produção diária superior a 100 litros foi fator de corte para realização da pesquisa laboratorial, excluindo quatro produtores rurais da pesquisa. Durante a coleta de dados a campo, período com cinco meses de duração, foi constatado que seis produtores abandonaram a atividade leiteira, e outros dois produtores optaram por não participar do estudo. Por fim, o questionário foi aplicado a 25 produtores, mas a avaliação estrutural, dos procedimentos e a coleta de amostras, inerentes ao estudo proposto, totalizou 21 participantes, cujos resultados estão apresentados na TABELA 2.

TABELA 2. Resultado do inquério socio-econômico dos produtores da agricultura familiar de leite da Baixada Serrana de Botucatu, 2014.

Produtor	Idade	Escolaridade	N° de filhos	Filho na atividade?	Pretende investir?
1	54	Médio completo	2	Não	Não
2	52	Fundamental completo	3	Sim	Sim
3	66	Não frequentou a escola	5	Não	Não
4	58	Fundamental completo	2	Não	Não
5	67	Fundamental incompleto	1	Não	Não
6	73	Fundamental completo	3	Não	Não
7	51	Médio completo	2	Não	Não
8	67	Superior completo	2	Não	Não
9	52	Fundamental incompleto	3	Não	Não
10	40	Médio incompleto	2	Não	Sim
11	70	Fundamental incompleto	4	Não	Não
12	46	Fundamental incompleto	3	Não	Não
13	45	Superior incompleto	3	Não	Sim
14	68	Fundamental incompleto	2	Sim	Não
15	43	Fundamental incompleto	2	Não	Não
16	67	Fundamental completo	1	Não	Não
17	52	Fundamental incompleto	0	Não	Não
18	63	Fundamental incompleto	4	Não	Não
19	71	Não frequentou a escola	5	Não	Não
20	45	Médio incompleto	0	Não	Não
21	84	Médio completo	3	Não	Não

Os produtores apresentaram idades que variaram entre 40 a 84 anos de idade e a média calculada foi de 59 anos. Quando questionados sobre o tempo em que estavam envolvidos na atividade leiteira, 15 (71,4%) declararam período superior a 15 anos, evidenciando o caráter familiar da produção. No entanto, é visível que a grande maioria deles, apesar de se dedicarem à produção leiteira a bastante tempo, parecem não encará-la como um negócio, mantendo-se na atividade por subsistência.

Em estudo realizado por Rodrigues et al. (2011), no qual foi analisada eficiência produtiva de produtores de leite no estado de Rondônia, 83,12% (n=112) dos produtores foram considerados economicamente ineficientes. Os autores consideraram que a permanência desses produtores na atividade ocorria em função do alto custo, econômico e social, que inviabilizava a mudança de atividade.

Ao realizar a comparação entre variados sistemas de produção e estabelecer coeficientes de desempenho para indicadores técnicos e econômicos, Krug (2001) apontou que não há viabilidade em sistemas de produção extensivos, no qual estão enquadrados todos os produtores do presente estudo.

Em contrapartida, para Abramovay (2000) a produção na agricultura familiar – baseada na relação entre propriedade, trabalho e família – não possui fins lucrativos e tem objetivo fundamental de atender as necessidades de consumo do conjunto familiar. Nesse contexto, percebeu-se que mais relevante que a viabilidade econômica, a diversidade dos produtores da agricultura familiar traz benefícios sócioeconômicos e ambientais e viabilizou o papel social da terra (ZOCCAL et al., 2004).

No presente estudo, foi evidente o baixo nível de escolaridade dos produtores da agricultura familiar. Apenas cinco (23,8%) produtores completaram ou foram além do nível médio enquanto o grupo restante, formado por 16 (76,2%) indivíduos, nem sequer completaram o ensino médio.

Ao caracterizar 96 propriedades leiteiras na região do alto Rio Grande, MG, Paixão (2013) evidenciou que produtores com menores faixas etárias possuíam maior nível de escolaridade. Entretanto, essa característica não foi constatada

neste estudo já que a média de idade dos produtores com maior escolarização foi igual a 61 anos, enquanto para os menos escolarizados foi de 58 anos.

Em termos gerais, durante as visitas técnicas realizadas no presente estudo, os produtores de menor faixa etária foram mais participativos e interessados frente às orientações técnicas fornecidas após o fim da ordenha. Outra dificuldade observada, referente a baixa escolarização dos produtores, foi a elaboração de material informativo no qual fosse possível o entendimento dos resultados obtidos em cada propriedade.

Em concordância, Pereira (2010) apontou dificuldades na inovação tecnológica e na tomada de decisões para produtores com idades mais avançadas e limitado grau de instrução. Esses fatos demonstram o quão grande são as dificuldades para implementar e executar programas de capacitação técnica, tão importantes ao desenvolvimento do setor leiteiro.

Apesar de a maioria possuir dois filhos ou mais (média = 2,5 filhos), em somente duas propriedades (9,5%) foi observada a participação dos descendentes na atividade. É importante ressaltar que a totalidade dos produtores com filhos declararam que os mesmos freqüentam ou freqüentaram a escola. Os produtores declararam ainda que os filhos mais velhos migraram, em sua maioria, para a zona urbana na busca por aprimoramento profissional ou melhores oportunidades de renda.

Estudo realizado por Mello & Schmidt (2002), em propriedades leiteiras da agricultura familiar no oeste catarinense, também retrataram que o distanciamento entre o mundo social, econômico e cultural da cidade, aliado à falta de oportunidades que despertassem nos jovens rurais o interesse de construir seu futuro no campo, levaram ao êxodo do jovem rural para a zona urbana. Salientaram que a visão de que esse seria um processo natural, e até positivo, seria o primeiro obstáculo na promoção da atividade leiteira como propulsora de desenvolvimento regional. Também apontaram a necessidade de elaboração de políticas públicas que propiciem à população rural a capacidade de enxergarem o campo como ambiente propício ao desenvolvimento de projetos de vida.

Quanto ao futuro a curto e médio prazo, apenas três produtores (14,3%) declararam a pretensão de investir na atividade. Nota-se que estes possuem idade abaixo da média geral, dos quais dois produtores estão a menos de cinco anos na atividade leiteira. Assim como relataram Parré et al. (2010; 2011), em estudo similar realizado no sudoeste do Paraná, foi possível inferir que produtores com mais tempo na atividade não acompanham e evolução do setor e “perpetuam uma tecnologia e/ou sistema produtivo menos eficiente”.

O grau de otimismo e a vontade de permanecerem na atividade são quase inexistentes em produtores pouco tecnificados. O abandono da atividade, observado em seis propriedades neste estudo, concorda com as tendências apontadas por Oliveira & Silva (2012) de que, em virtude da implantação da IN nº 51, haveria restrições para a participação não especializada e de baixa escala, levando à exclusão de muitos agricultores a médio e longo prazo.

A análise do questionário revelou que todos os pequenos produtores visitados possuíam energia elétrica. Em relação à moradia, apenas dois (9,5%) produtores declararam que não residiam efetivamente na propriedade rural e realizavam visitas semanais ao local, contratando mão-de-obra local para exercer a produção leiteira.

O abastecimento de água das propriedades era proveniente de mina d' água ou poço artesiano, com exceção de 1 (4,8%) produtor que fazia a captação pela rede hídrica da SABESP. Nenhum dos proprietários realizava acompanhamento periódico da qualidade da água utilizada. Havia sistema de coleta de lixo municipal em apenas nove deles (42,9%), enquanto o restante declarou que realizava a queima dos resíduos sólidos.

A atividade leiteira foi declarada a principal fonte de renda por 16 produtores (76,2%). Outros três (14,3%) declararam que a aposentadoria constituía o rendimento mais importante e a produção de leite um complemento financeiro. Apenas dois produtores (9,5%) apontaram outras atividades econômicas – arrendamento de parte da propriedade e bovinocultura de corte – como a principal fonte de sustento.

Nesse contexto, Testa et al. (1996) já discutiam e propunham que o incremento da produção agropecuária deveriam advir de sistemas

diversificados de produção, no qual o leite representaria apenas um componente do sistema, sendo explorado, de forma combinada, com outras atividades comerciais. Paixão (2013) revelou que os produtores de leite mais jovens se preocupavam em possuir outras fontes extras de renda fora da atividade leiteira.

Neto & Lima (2006) avaliaram que a comercialização informal é uma alternativa para pequenos produtores obterem melhor preço pelo produto. Para Bem & Fabrini (2005) o mercado clandestino constitui até um mecanismo de resistência camponesa ao modelo imposto pelo sistema capitalista de produção, apesar de não entrarem no mérito dos riscos potenciais à saúde pública. De qualquer modo, foi constatado que pelo menos 5 (23,8%) produtores recorrem com constância ao comércio informal, via venda direta ao consumidor final de leite ou queijos, na tentativa de agregar valor a produção e obter maior ganho financeiro.

Em relação à mão-de-obra utilizada durante os procedimentos de ordenha, 16 (76,2%) delas eram estritamente familiares enquanto em duas (9,5%) propriedades foi observado mão-de-obra familiar trabalhando em conjunto com mão-de-obra contratada. Em apenas 3 (14,3%) propriedades a ordenha era realizada somente por funcionários contratados.

Foi também abordada a participação das mulheres na atividade. E em apenas uma (4,8%) propriedade rural o gerenciamento era de responsabilidade feminina. Em outras 5 (23,8%) propriedades foi observada a participação da mulher no auxílio aos procedimentos de ordenha. Apesar da evidente participação feminina, para Magalhães (2009) a modernização da produção e reestruturação do mercado lácteo reforçam o domínio masculino sobre a produção familiar, cabendo a eles o poder de decisão sobre a atividade.

A conjunção dos dados obtidos mediante aplicação do questionário com os observados *in loco* durante a realização das coletas realizadas permitiram a caracterização das propriedades sob aspectos técnico-econômicos, conforme TABELA 3, a seguir.

TABELA 3. Principais características técnico-econômicas de pequenos produtores rurais de leite. Botucatu, SP, 2014.

Produtor	Área total / leite (ha)	Nº vacas lactação / secas	Média diária de leite (L)	Litros leite / dia / vaca	Estrutura	Pré dipping*
1	12 / 12	11 / 9	69	6,2	Estábulo sem piso	SD + PT
2	34 / 22	17 / 8	77	4,5	Estábulo sem piso	Não
3	6 / 6	3 / 4	29	9,6	Estábulo sem piso	Não
4	11 / 11	9 / 2	34	3,8	Estábulo com piso	Pano + SD
5	13 / 13	8 / 4	16	2,0	Estábulo sem piso	Não
6	7 / 7	6 / 2	30	5,0	Estábulo com piso	Não
7	11 / 11	12 / 2	58	4,8	Estábulo sem piso	PT
8	145 / 80	21 / 6	97	4,6	Estábulo com piso	SD
9	43 / 43	10 / 3	45	4,5	Curral sem piso	Não
10	23 / 23	15 / 5	87	5,8	Estábulo com piso	Não
11	85 / 85	20 / 3	73	3,7	Estábulo sem piso	SD
12	55 / 55	15 / 11	70	1,7	Estábulo sem piso	Não
13	12 / 12	14 / 6	19	1,3	Estábulo sem piso	SD
14	35 / 30	18 / 9	70	3,9	Estábulo sem piso	Não
15	35 / 35	10 / 6	77	7,7	Estábulo sem piso	Pano + SD
16	12 / 12	12 / 13	48	4,0	Estábulo sem piso	Não
17	23 / 20	8 / 5	41	5,1	Curral sem piso	Pano
18	15 / 8	7 / 4	16	2,3	Curral com piso	Não
19	30 / 30	14 / 2	18	1,3	Estábulo sem piso	Não
20	26 / 26	5 / 4	19	3,7	Curral com piso	Não
21	80 / 35	4 / 3	11	2,8	Curral sem piso	Pano

* SD = solução desinfetante, PT = papel toalha descartável, Pano = pano não descartável, ha = hectare

Para ser definida como uma pequena propriedade o imóvel rural deve ocupar de 1 a 4 módulos fiscais de área. O valor deste módulo é fixado pelo município e, em Botucatu, corresponde a 20 hectares (ha). Tem-se, portanto, no presente estudo 19 (90,5%) propriedades classificadas como pequenas, enquanto duas (9,5%) foram consideradas como médias propriedades.

O questionário revelou que a média da área total das propriedades foi igual a 34 hectares, enquanto para a atividade leiteira foi de 27,4 ha. Constatou-se, também, que 17 (81,0%) produtores utilizam mais de 80% da área total da propriedade para a produção leiteira. Durante as visitas nas propriedades não foi evidenciada exploração comercial de nenhuma outra espécie animal, sendo constatadas apenas algumas criações de aves e suínos para consumo familiar.

Quanto à produtividade, a melhor relação entre área destinada ao leite e volume produzido foi 5,8 L/ha, apresentado pelo produtor número 1. A média deste indicador foi de 2,5 L/ha e, neste sentido, é possível afirmar que há um imenso potencial produtivo a ser desenvolvido na região.

Em relação ao número de animais foi constatada grande variação, não sendo este valor diretamente proporcional à área disponível para a atividade nem com a média de produção diária de leite, que foi de 47,8 L/propriedade. A média diária de produção por animal foi de 4,4 L/vaca, valor muito abaixo do desejável.

Estudo realizado por Carvalho et al. (2007) no estado de Minas Gerais apontou que no ano de 2005 a produção diária de leite por vaca foi de 8,1 litros. No Rio Grande do Sul, onde a agricultura familiar tem importante destaque no agronegócio do estado, a produção com gado holandês a pasto pode atingir patamares superiores a 22 L/vaca/dia (Fontaneli, 2005).

Outro aspecto preocupante foi a relação entre o número de vacas em lactação e as secas. Enquanto a literatura preconiza valores próximos a 85%, no presente estudo este índice médio foi de 68,3% (MILKPOINT, 2012b).

O rebanho leiteiro, em sua maioria, era constituído por cruzamento de holandês-zebu, mas foi possível observar em algumas propriedades a presença da vacas da raça nelore, de aptidão para corte. Apenas a propriedade número seis apresentou rebanho com valor genético apurado, da raça jersey. Entretanto, a produção média diária não se mostrou significamente maior, fato explicado pela necessidade de alimentação de alto valor nutricional para incrementar o volume de leite produzido.

Quanto à estrutura física e equipamentos utilizados para a realização da ordenha foi constatado grande precariedade. Em 5 (23,8%) propriedades os procedimentos ocorriam a céu aberto, enquanto em 15 (71,4%) não havia piso de concreto. Não foi observado sistema adequado de abastecimento de água para higienização do ambiente, utensílios e dos tetos dos animais apesar de cinco propriedades (23,8%) apresentarem ponto de água próximo ao local da ordenha.

Durante a ordenha, alguns produtores forneciam uma pequena quantidade de concentrado com o objetivo principal de facilitar o manejo dos animais. Foi evidenciado também o fornecimento de cama de frango – proibido pela IN nº 08 do MAPA (BRASIL, 2003) – prática perigosa devido aos riscos de transmissão da encefalopatia espongiforme bovina (“vaca louca”) e do botulismo, que se comprovada por órgãos de defesa pode acarretar em multa e no abate sanitário de todo rebanho.

O acompanhamento dos procedimentos revelou que o *pré-dipping* é um procedimento pouco utilizado pelos produtores. Em geral, o ordenhador faz a retirada mecânica do excesso de sujidades dos tetos, ofertando-os em seguida ao bezerro. Tal prática favorece a liberação de ocitocina e consequente liberação do leite para a cisterna da glândula mamária, facilitando a ordenha.

Apenas 1 (4,8%) produtor limpava os tetos com solução desinfetante (SD) e realizava a secagem com papel toalha (PT) descartável, enquanto 8 (38,1%) produtores adotavam alguma medida de higiene, mesmo que de forma equivocada. O restante (57,1%) não adotava nenhum procedimento antes do início da ordenha. Foi observado que todos os produtores não realizaram a antisepsia dos tetos após a ordenha (*pós-dipping*). Ao término da ordenha, o bezerro tinha acesso aos tetos para mamar o leite residual.

Estudo realizado por Faccioli (2010) em grupo heterogêneo de produtores de leite, também em Botucatu, revelou que 23,5% deles não realizavam nenhum tipo de procedimento antes da ordenha e 55,8% dos produtores realizam alguma prática de forma irregular. A rotina regular de *pré-ordenha* foi observada em apenas 17,5% dos produtores, demonstrando que este problema não se restringe apenas a pequenos produtores e possuem índices alarmantes na região.

Foram poucos os indícios da busca por tecnificação dos pequenos produtores de leite. A literatura científica relata que propriedades com ordenha mecânica são maiores em relação àquelas com ordenha manual, o que indica uma propriedade com melhores animais e mais recursos disponíveis para investimento em melhorias.

Conforme a TABELA 4, a mecanização da ordenha foi observada, no presente estudo, em apenas 4 (19,0%) propriedades, nas quais o sistema era o balde ao pé. Foi evidente também a precariedade nos procedimentos de limpeza e higienização da ordenhadeira, assim como foi relatado que estes equipamentos nunca haviam sido submetidos a manutenções especializadas e/ou calibrações dos sistemas de vácuo.

TABELA 4. Resultados percentuais do escore dos tetos e tipo de ordenha. Botucatu, SP, 2014.

Produtor	N° tetos avaliados	% normal	% leve	% áspero	% eversão	Tipo de ordenha
1	44	95,5%	4,5%	-	-	manual
2	68	86,8%	8,8%	-	-	manual
3	12	91,7%	8,3%	-	-	manual
4	36	69,4%	19,4%	2,8%	-	balde ao pé
5	32	81,3%	6,3%	3,1%	-	manual
6	24	91,7%	4,2%	-	-	manual
7	48	75,0%	16,7%	6,3%	-	balde ao pé
8	84	84,5%	15,5%	-	-	manual
9	40	90,0%	7,5%	-	-	manual
10	60	83,3%	13,3%	1,7%	-	manual
11	80	83,8%	12,5%	-	1,3%	manual
12	60	95,0%	3,3%	-	-	manual
13	56	66,1%	26,8%	3,6%	1,8%	balde ao pé
14	72	86,1%	8,3%	2,8%	-	manual
15	40	92,5%	7,5%	-	-	manual
16	48	83,3%	6,3%	10,4%	-	balde ao pé
17	32	100,0%	-	-	-	manual
18	28	89,3%	7,1%	-	-	manual
19	56	83,9%	16,1%	-	-	manual
20	20	85,0%	10,0%	-	-	manual
21	16	56,3%	12,5%	6,3%	-	manual
Média	-	84,3%	10,2%	1,8%	0,1%	-

Estudo realizado por Taffarel et al. (2012), no qual foram realizadas onze visitas a propriedades leiteiras e entrevistados 172 produtores de leite para avaliar questões referentes à utilização de sistema mecânico de ordenha, concluíram que a maioria não realizava adequada manutenção e não

conheciam o correto processos de funcionamento, higienização e manutenção das ordenhadeiras.

Guerreiro et al. (2005) avaliaram os índices de contaminação bacteriana no leite em diferentes propriedades e concluíram que o nível tecnológico empregado na ordenha não implica, necessariamente, em leite de melhor qualidade microbiológica. A mecanização da ordenha facilita o manejo na propriedade, mas a precariedade na higiene e na manutenção do equipamento traz muito mais problemas que benefícios. Teteiras e tubulações sujas acumulam bactérias e favorecem a ocorrência de mastites, já que a ordenha é o principal momento de transmissão de micro-organismos (HOGAN & SMITH, 1998).

Para a realização de um adequada ordenha mecanizada são necessários diversos cuidados: secagem apropriada dos tetos para evitar o deslizamento das teteiras; não deixar que ocorra a entrada de ar e conseqüente flutuações de vácuo; rotina bem estabelecida para aproveitar o efeito da ocitocina; evitar a sobreordenha e preversar o esfíncter do teto (SANTOS & FONSECA, 2007). Posto isso, infere-se que a utilização inadequada do sistema balde ao pé pelos pequenos produtores rurais afeta negativamente a produção, diminuindo o volume de leite ordenhado e aumentando riscos de infecção na glândula mamária.

Nos percentuais obtidos da avaliação do escore dos tetos percebeu-se maiores valores de lesões nas propriedades com sistema mecanizado de ordenha. O teste Qui-quadrado revelou associação significativa entre o tipo de ordenha e o escore do teto, que indicou má utilização desta tecnologia pelos pequenos produtores de leite.

Todos os produtores visitados ordenhavam os animais uma vez por dia, no período da manhã e armazenavam o leite em latões até a entrega na sede da associação dos produtores, onde é localizado o tanque de expansão comunitário. Neste local, o produto sofria resfriamento térmico, e era armazenado sob temperatura aproximada de 4°C, até o momento da coleta granelizada, que ocorria a cada 48 horas.

A distância do trajeto das propriedades até o tanque variou de 1,5 até 29 quilômetros e era realizada por automotores ou até mesmo cavalo. Quanto ao tempo decorrido do fim do procedimento de ordenha até o início da refrigeração, constatou-se variação de 15 minutos até 4,5 horas, fato que influi diretamente na qualidade final do produto e contraria normativa federal que determina intervalo máximo de três horas (BRASIL, 2011).

Outra importante constatação no presente estudo foi o fato de nenhum produtor possuir levantamento ou registro de dados zootécnicos dos animais e da produção como: datas de partos, dias em lactação, diagnósticos de mastite, aplicação de tratamentos, produção diária por animal, entre outros. O único registro disponível é o volume diário entregue ao laticínio, que é fornecido no momento da entrega do leite na associação.

A grande maioria dos produtores também declarou grande sazonalidade da produção de leite, conforme FIGURA 2. A produção de silagem, fundamental para que no período seco – do mês de maio até novembro – o volume de leite produzido pelas vacas não diminua de maneira drástica, não era realizada em nenhuma propriedade.

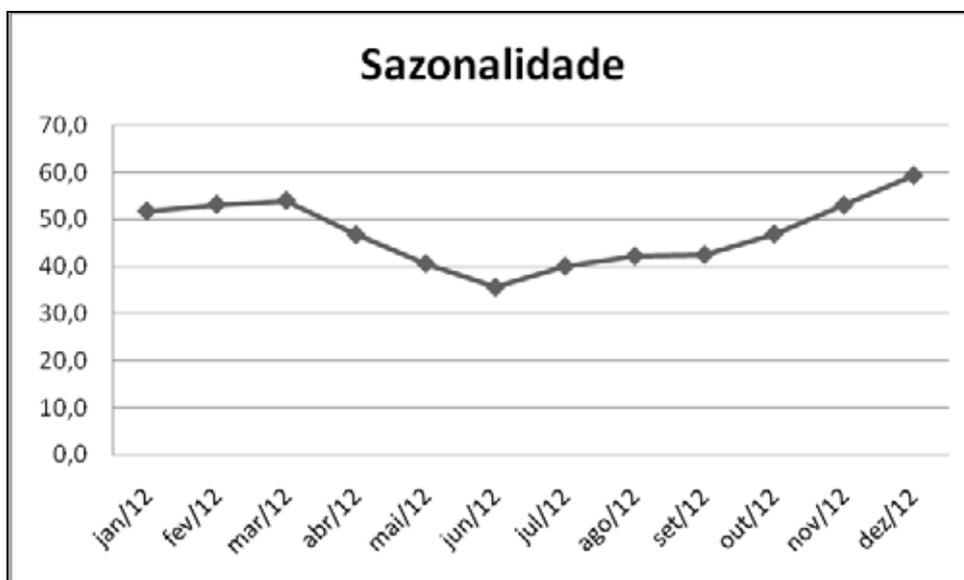


FIGURA 2. Média diária da produção de leite de vaca, em litros, entregues por pequenos produtores ao longo do ano de 2012. Fonte de dados: Laticínios Gege. Botucatu, 2014.

A abordagem sobre o manejo sanitário revelou que 14 (66,7%) produtores faziam uso rotineiro de ivermectina para controle de endo e ectoparasitas no

rebanho. Todos relataram também a vacinação para febre aftosa. Entretanto, a imunoprofilaxia contra a brucelose, raiva e o carbúnculo sintomático foi de 57,1%, 33,3% e 9,5%, respectivamente.

Quanto à realização da secagem dos animais para o período seco, nenhum produtor relatou a utilização da terapia da vaca seca. Do total, 16 (76,1%) produtores declararam que realizam a secagem gradual, ordenhando em dias alternados e cada vez mais espaçados, até que a glândula mamária não produza mais leite. Este procedimento afeta na qualidade de leite obtida do rebanho, pois a terapia da vaca seca é uma importante ferramenta para o controle e prevenção de mastites (LANGONI, 2013).

A retirada da produção sem nenhum tipo de tratamento, como observado no estudo, pode levar à presença de leite residual nos quartos mamários que contribui na multiplicação de patógenos contagiosos e/ou ambientais, levando à mastite já no início da próxima lactação (DOMINGUES & LANGONI, 2001).

Foi verificada grande comercialização de animais entre os produtores associados e produtores de outras regiões, mas não foi relatado, por nenhum proprietário, a aplicação de quarentena ou qualquer outro teste diagnóstico prévio para evitar a possível introdução de novos agentes de doenças infectocontagiosas nos rebanhos.

Nenhum produtor teve acesso aos serviços de assistência veterinária, público ou privado, nos últimos seis meses anteriores ao inquérito. Isso revelou que as dificuldades dos produtores da agricultura familiar vão além dos problemas estruturais. Santos et al. (2009) comprovaram, em assentamento coletivo localizado no estado do Paraná, importância da assistência técnica e da extensão rural como ferramenta no desenvolvimento dos pequenos produtores. A falta de acesso a profissionais capacitados e da continuidade de programas de educação sanitária no campo dificultam a ocorrência de melhorias concretas no manejo sanitário e na produção de leite.

Todos eles adotavam o sistema de produção à pasto, porém não foi relatado ou evidenciado nenhum tipo de manejo ou adubação do solo, bem como a aplicação de técnicas de rotação de pastagem com o objetivo de melhorar o suporte nutricional oferecido aos animais.

Foi relatada a realização de dias de campo e palestras coordenadas pela FMVZ – Unesp / Botucatu, SP e pela Secretaria de Agricultura do Município de Botucatu, mas segundo os próprios produtores associados a adesão era sempre baixa. Ponsano et al. (2011) também relataram dificuldades na elaboração de metodologias extensionistas eficazes para estimular os pequenos produtores de leite a abandonar práticas inadequadas e implantar inovações na atividade.

Estudo realizado por Bertollo (2002) no município de Erval Grande, RS, buscou avaliar fatores condicionantes para adoção pelos agricultores familiares de leite de métodos de produção mais limpa. Os resultados revelaram que a faixa etária, grau de instrução e disponibilidade de recursos são importantes características na busca pela melhoria de qualidade do leite.

Assim como observado em diversos estudos, os produtores de leite da agricultura familiar se mantêm no setor por tradição e não possuem uma boa organização de classe, sendo evidentes baixo número e apuração genética dos animais, pouco ou nenhum conhecimento de boas práticas de produção e higiene, bem como a falta de acesso a recursos (financeiros e técnicos) que permitam o aumento da produtividade e rentabilidade que afetem positivamente a cadeia produtiva do leite (ZOCCAL et al., 2004; LOPES et al., 2009).

5.2. Prevalência das mastites

A mastite é a principal enfermidade dos rebanhos bovinos leiteiros devido à alta prevalência, patogenicidade e etiologia complexa. A inflamação do tecido mamário é facilmente diagnosticada por métodos diretos e indiretos, difundidos e pouco onerosos, aplicados à atividade leiteira.

A detecção da mastite clínica, antes do início da ordenha, pelo uso adequado do teste da caneca telada de fundo escuro foi observada em somente quatro (19,4%) produtores. Outros declararam que avaliavam os primeiros jatos de leite ordenhados dos tetos. No entanto, não utilizavam a caneca telada, fato que prejudica a eficiência do diagnóstico da inflamação da glândula mamária.

Em relação à mastite subclínica, somente 2 (9,5%) produtores declararam a realização periódica do CMT, apesar de ter sido constatado que pelo menos 8 (38,0%) possuíam a raquete e o reagente para execução do teste. Em contrapartida, 15 (71,4%) produtores declararam ter realizado, nos seis meses anteriores à visita, o tratamento de tetos acometidos por mastite utilizando antimastíticos disponíveis no mercado. Tal achado indicou que a atenção dos produtores está voltada principalmente para a cura da mastite e não na prevenção da enfermidade.

Nesse sentido o produtor é triplamente punido: o uso sem critérios de antimicrobianos aumenta a pressão seletiva para micro-organismos multirresistentes; os custos com tratamento e possível mão-de-obra especializada são mais onerosas do que gastos com procedimentos preventivos; diminuição do volume de produção do quarto mamário acometido, além do descarte de leite devido ao período de carência preconizado pelo tratamento.

A TABELA 5 apresenta o percentual de mastite clínica ou subclínica, pela aplicação do CMT em todas as vacas em lactação de cada propriedade.

TABELA 5. Prevalência de mastite clínica e subclínica nos quartos de vacas leiteiras das propriedades avaliadas. Botucatu, SP, 2014.

Produtor	N° quartos ^(*)	% negativo	% subclínica	% clínica	N° quartos perdidos
1	44	88,6%	9,1%	2,3%	-
2	65	83,1%	16,9%	-	3
3	12	58,3%	41,7%	-	-
4	33	81,8%	18,2%	-	3
5	29	62,1%	37,9%	-	3
6	23	87,0%	13,0%	-	1
7	47	80,9%	19,1%	-	1
8	84	83,3%	16,7%	-	-
9	39	76,9%	23,1%	-	1
10	59	81,4%	18,6%	-	1
11	78	88,5%	11,5%	-	2
12	59	88,1%	11,9%	-	1
13	55	83,6%	16,4%	-	1
14	70	84,3%	15,7%	-	2
15	40	62,5%	35,0%	2,5%	-
16	48	83,3%	16,7%	-	-
17	32	78,1%	21,9%	-	-
18	27	77,8%	22,2%	-	1
19	56	83,9%	16,1%	-	-
20	19	57,9%	42,1%	-	1
21	12	66,7%	33,3%	-	4
Total	931	77,8%**	21,8%**		25

* foram considerados para cálculo somente os tetos submetidos ao CMT; ** média dos percentuais

Considera-se que níveis aceitáveis de prevalência de mastite subclínica nos rebanhos são entre 15 a 25% (FONSECA & SANTOS, 2000). Ao adotar esse critério foi constatado que cinco propriedades (23,8%) apresentaram prevalência elevada, acima de 25%, para este tipo de inflamação mamária.

Em estudo realizado por Langoni et al. (2011) foi observado que 19,2% dos quartos mamários avaliados estavam acometidos pela forma subclínica da mastite, valor muito próximo ao revelado pelo presente estudo. Enquanto Oliveira et al. (2011), em estudo com pequenos produtores pouco especializados, obtiveram uma prevalência de apenas 6,6%.

A grande variação na prevalência das mastites subclínicas relatadas pode ser explicada pelo caráter interpretativo e subjetivo do CMT. Para ser realizada

uma comparação mais fidedigna faz-se necessário a utilização de outras técnicas de maior precisão, como a CCS.

Quanto à apresentação clínica da enfermidade, foram observados apenas dois casos, com prevalência de 0,2%. Os mesmos estudos de Langoni et al. (2011) e Oliveira (2011) apresentaram prevalência com valores de 0,73% e 1,3%, respectivamente, para casos de mastite clínica. Neste caso, as alterações no leite e no tecido mamário são muito evidentes, facilitando a interpretação e realização do diagnóstico.

A correlação, pelo teste Qui-quadrado, das condições estruturais (presença ou ausência de cobertura; presença ou ausência de piso concretado) e procedimentos (pré-dipping) observados durante a ordenha com os resultados prevalentes de mastite nos rebanhos não apresentaram significância.

A análise do percentual de “tetos perdidos” detectados em cada propriedade rural permitiu inferir que a secagem permanente de quartos com mastite crônica é alta, com prevalência igual a 2,6%. Na propriedade nº 21 foi de 25% e apenas em seis (28,6%) rebanhos não foram evidenciados nenhum teto permanentemente seco. Isso evidencia a ocorrência de perdas diretas e indiretas relacionadas à saúde da glândula mamária, custos terapêuticos e descarte prematuro de animais.

Destacou-se negativamente a propriedade nº 5 que apresentou percentual de tetos perdidos igual a 9,4% e, ao mesmo tempo, ostentou prevalência de 37,9% de mastite subclínica. Após análise laboratorial foi constatado que em 6 amostras de leite oriundas de quartos com mastite dessa propriedade foi caracterizado o gênero *Staphylococcus* spp. Fato que justifica o ocorrido uma vez que o gênero, como avaliado em diversas pesquisas, não responde bem às terapias antimastíticas devido a sua resistência a antimicrobianos (BALDASSI et al.; LANGONI et al., 1991; MORENO et al., 1997; NADER FILHO et al., 2007).

De maneira geral foi constatado que a maioria das pequenas propriedades rurais que exploram a atividade leiteira não possui estrutura adequada para realizar a ordenha e não adota medidas higiênico-sanitárias nas operações. No entanto, devido à rusticidade do rebanho que as compõem, a prevalência das

infecções mamárias não foram superiores às observadas em diversos outros estudos.

5.3. Etiologia das mastites

Foi realizado o cultivo microbiológico de 177 amostras de leite de vacas em lactação, que demonstrou a ocorrência de importantes agentes patogênicos de mastite. Houve predominância do gênero *Staphylococcus* (n = 55; 31,1%), seguido pelos gêneros *Corynebacterium* (25,4%), *Streptococcus* (n = 25; 14,1%), infecções mistas (n = 14; 7,9%) e os coliformes (n = 4; 2,3%) como agentes da mastite. Foi alto o percentual de cultivos microbiológicos que não apresentou crescimento ou que foram considerados contaminados – três ou mais tipos diferentes de colônias no cultivo –, totalizando 19,2% (n = 34). Os resultados desses cultivos são apresentados na TABELA 6.

TABELA 6. Número de isolamentos por gênero microbiano nas ocorrências de mastite diagnosticada em vacas de leite de pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.

Produtor	Staph	Strep	Cory	Colif.	Staph /Strep	Cory /Staph	Cory /Strep	Sem crescimento/contam.*
1	2	1	1	-	-	-	-	1
2	2	-	6	-	-	-	-	3
3	1	1	2	-	-	-	-	1
4	3	-	3	-	-	-	-	-
5	6	1	1	-	2	-	-	1
6	2	-	1	-	-	-	-	-
7	2	1	5	-	-	-	-	1
8	3	5	3	-	-	1	-	2
9	2	-	1	3	-	1	-	2
10	3	2	-	-	-	-	1	5
11	4	-	2	-	-	-	-	3
12	3	1	3	-	-	-	-	-
13	2	1	2	1	-	1	-	2
14	3	-	4	-	-	1	-	3
15	4	4	3	-	3	1	-	-
16	2	-	3	-	-	1	-	2
17	-	2	3	-	-	-	-	2
18	3	3	-	-	-	-	-	-
19	3	1	1	-	-	1	-	3
20	2	1	1	-	-	1	-	3
21	3	1	-	-	-	-	-	-
N	55	25	45	4	5	8	1	34
%	31,1	14,1	25,4	2,3	2,8	4,5	0,6	19,2

Staph = *Staphylococcus*, Strep = *Streptococcus*, Cory = *Coryne*, Colif = grupo dos coliformes; * amostras sem crescimento ou contaminadas

O predomínio do gênero *Staphylococcus* concorda com diversos estudos de prevalência realizados tanto em rebanhos brasileiros, quanto em propriedades leiteiras de outros países (BALDASSI et al., 1991; COSTA et al. 1996, 2000; LANGONI et al., 1998, 2001, 2004; NADER FILHO et. al, 2007; BOLANÕS et al., 2014). É também relatada participação deste gênero como agente etiológico da mastite em variadas espécies de exploração comercial, como em rebanhos de ovinos e de búfalas (VASIL, 2004; CUNHA et al., 2006).

Na região sudeste, Lamaita et al. (2005) pesquisaram *Staphylococcus* spp. em tanques de expansão de propriedades do estado de Minas Gerais e evidenciaram linhagens do micro-organismo em todas as amostras coletadas. Estudo realizado por Guimarães et al. (2013) relatou prevalência média de 36,4%, em amostras coletadas em rebanhos de dez propriedades leiteiras do estado de São Paulo.

Corynebacterium spp. também apresenta participação importante na etiologia das mastites. A espécie *C. bovis* é responsável por redução significativa na produção de leite de quartos mamários infectados. Domingues et al. (1998) avaliaram perda de produção de até 27,6%, enquanto Zafalon et al. (1999) relataram redução na faixa de 30,9%, além de observarem aumento significativo na CCS.

Streptococcus agalactiae (*S. agalactiae*) é a principal espécie do gênero na etiologia da mastite bovina. É um patógeno intramamário obrigatório de alta contagiosidade. Logo, é comum altas taxas de prevalência em rebanhos infectados por esta espécie (GONZALEZ et al., 1986). Em um levantamento realizado por Tenhagen et al. (2006) em 80 rebanhos, na Alemanha, ocorreu a presença de *S. agalactiae* em 29% das amostras. Elias (2007) observou prevalência de 39,7% de *S. agalactiae* em amostras de tanques de expansão.

No presente estudo, 31 linhagens classificadas como pertencentes ao gênero *Streptococcus* foram submetidas ao teste de CAMP e ao teste da bile esculina, resultando em 21 (67,7%) isolados de *S. agalactiae*, 8 (25,8%) de *S. dysgalactiae* e 2 (6,5%) de *S. bovis*.

O grupo dos coliformes, da família Enterobacteriaceae, é formado principalmente pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. É dividido em dois tipos, dependendo da capacidade de sobreviver em temperaturas superiores a 40°C e, neste último caso, são denominados termotolerantes. São importantes indicadores da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos e participam com frequência nas infecções mamárias. Estudo de Guimarães et al. (2013) no Estado de São Paulo relatou prevalência de 6,7% dos casos de mastite em vacas leiteiras relacionados à família Enterobacteriaceae.

No presente estudo foram constatadas apenas quatro (2,3%) amostras cujo agente responsável pela mastite foi coliforme. Resultado que concorda com Ribeiro et al. (2009) no qual não foi observado participação de *E. coli* em quatro pequenas propriedades orgânicas do interior paulista, indicando baixa participação deste grupo em sistemas familiares de produção leiteira.

O alta prevalência de isolamento de micro-organismos dos gêneros contagiosos – *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium* – deve-se ao habitat deste grupo ser constituído pele mucosa e pele dos animais. Como evidenciado nos resultados, as infecções mamárias ficam geralmente restritas a forma subclínica pela provável adaptação destas bactérias a mucosa da glândula mamária, ao contrário dos agentes ambientais que normalmente exteriorizam sinais de mastite clínica (RIBEIRO, 2008).

A identificação dos agentes bacterianos causadores de mastite são essenciais, pois de acordo com a característica epidemiológica e a fisiopatologia da infecção, os agentes da mastite podem ser classificados em contagiosos, oportunistas ou ambientais (RADOSTITS et al., 2007).

As principais bactérias isoladas foram causadoras de mastites contagiosas, o que indica problemas relacionados a higiene operacional da ordenha e possível cronicidade da infecção mamária. Como observado durante as visitas às propriedades, os procedimentos adotados são inadequados e propiciam a ocorrência de transmissão de agentes patogênicos entre as vacas no momento da ordenha.

Entre as 68 cepas de *Staphylococcus* spp., 37 (54,4%) foram classificadas como ECP e o restante (45,6%) como ECN, o que concorda com estudos recentes nos quais foram observadas a emergência do ECN como agente patogênico importante na mastite (FERGUNSON et al.; MOON et al.; PIEPERS et al.; 2007). Já foi evidenciado também a capacidade desse grupo de micro-organismos provocarem relevantes prejuízos à cadeia leiteira devido as alterações nos teores constituintes do leite e capacidade de elevar a CCS (GENTILINI et al., 2002).

S. aureus foi a espécie mais isolada entre as 133 amostras de leite analisadas, ocorrendo em 21 (14,7%) delas. Outros estudos apontaram a

espécie como o principal patógeno envolvido nas infecções mamárias em ruminantes produtores de leite. Foi apontada, ainda, como a principal causa de infecções nosocomiais em humanos (AARESTRUP et al., 2001; ASPERGER & ZANGERL, 2003).

Na TABELA 7 são apresentadas contagens absolutas e percentuais das espécies isoladas nas amostras de leite das 21 propriedades rurais visitadas.

TABELA 7. Resultado da identificação de cepas de ECP e ECN isoladas do leite de vacas leiteiras de 21 pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.

Grupo	Espécie	N	% no grupo	% no gênero	% nos isolados
ECP	<i>S. aureus</i>	21	56,8%	30,9%	14,7%
	<i>S. hyicus</i>	4	10,8%	5,9%	2,8%
	<i>S. intermedius</i>	2	5,4%	2,9%	1,4%
	<i>S. schleiferi</i>	1	2,7%	1,5%	0,7%
	<i>Staphylococcus spp.</i>	9	24,3%	13,2%	6,3%
	Subtotal		37	100,0%	54,4%
ECN	<i>S. xylosus</i>	9	29,0%	13,2%	6,3%
	<i>S. epidermidis</i>	6	19,4%	8,8%	4,2%
	<i>S. chromogenes</i>	5	16,1%	7,4%	3,5%
	<i>S. warneri</i>	2	6,5%	2,9%	1,4%
	<i>S. simulans</i>	1	3,2%	1,5%	0,7%
	<i>Staphylococcus spp.</i>	8	25,8%	11,8%	5,6%
Subtotal		31	100,0%	45,6%	21,7%
Total		68	-	100,0%	47,6%

S. aureus e *S. intermedius* são espécies prevalentes na causuística de mastite bovina (RADOSTITS et al, 2007) sendo, no presente estudo iguais a 14,7% e 1,4%, respectivamente. Ambas espécies são associadas em surtos de intoxicação alimentar (KHAMBATY et al., 1994).

Oliveira et al. (2009) isolaram, em propriedades localizadas no estado de Sergipe, 21,6% de *S. aureus* em amostras de leite de vacas com mastite. Siqueira (2011), em estudo realizado em propriedades leiteiras que adotavam o sistema orgânico de produção, identificou que 22,4% das linhagens de

Staphylococcus isoladas pertenciam à espécie *S. aureus*. Estudos realizados em outras regiões do mundo também demonstraram a importância deste patógeno na etiologia das mastites em rebanhos leiteiros: na Turquia foi relatada prevalência de 21,9% de amostras de leite (KIRKAN et al., 2005), na Itália prevalência de 20,6% (FERGUSON et al., 2007), no Paquistão 28,3% (MONIRI et al. 2007). Resultados reforçam não haver diferença, em relação à participação deste micro-organismo como agente causador de mastite, em relação ao tamanho, localização da propriedade ou tipo de sistema de produção adotado.

A análise do gênero *Staphylococcus* permitiu detectar que no grupo dos ECP 30,9% foram identificados como *S. aureus*, com diferença estatística significativa em relação às outras espécies identificadas: *S. hyicus* (5,9%), *S. intermedius* (2,9%) e *S. schleiferi* (1,5%).

A literatura científica aponta *S. hyicus* como agente responsável, pela produção de exotoxinas, da Síndrome da Pele Escaldada em porcos (TANABE et al., 1996). Chenier & Lallier (2012) apontaram esta espécie como causadora de infecções em galinhas poedeiras. Nesse sentido, a presença de outros animais, como suínos e aves, nas propriedades familiares pode ter contribuído na participação deste gênero nas mastites observadas. Importante destacar que *S. hyicus* é relatado em muitos estudos como pertencente ao grupo dos ECN, mas sua capacidade de síntese de coagulase é variável, sendo neste estudo, caracterizado como ECP (COSTA et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2013).

S. schleiferi foi descrito como nova espécie no início dos anos 90, sendo isolado da orelha externa de cães acometidos com otite (IGIMI et al., 1990). Há participação desta espécie como agente etiológico em mastites, mas assim como evidenciado no presente estudo (1,5% no gênero), sua prevalência foi baixa. Lamaita et al. (2005) relataram a sua participação em 5,7% (n=80) dos casos de mastites avaliados.

Em relação as espécies de ECN, o presente estudo apontou que os principais agentes envolvidos na prevalência de mastites observadas em propriedades da agricultura familiar foram *S. xylosus* (29,0%), *S. epidermidis* (19,4%), *S. chromogenes* (16,1%), *S. warneri* (6,5%) e *S. simulans* (3,2%).

Dados que concordaram com a literatura científica que apontaram participação frequente destas espécies em adição a *S. hominis* e, em menor frequência, de *S. scuri*, *S. capitis*, entre outros (NICKERSON et al., 1995; BRABES et al., 1999; RADOSTITS et al., 2007).

S. epidermidis é a mais prevalente e persistente na pele e membranas mucosas de humanos. É possível inferir que a prevalência observada no presente estudo (8,8% em relação ao gênero) tem relação direta com a precariedade nos procedimentos de ordenha nas propriedades visitadas.

S. simulans são menos frequentes, com baixa frequência de isolamento na pele do úbere ou do teto de bovinos, apesar de encontram-se transitoriamente na pele de humanos (CORDEIRO, 2007). Ao analisarem 127 amostras de leite, Brabes et al. (1999) identificaram 11,8% como *S. chromogenes*, 9,5% como *S. scuri*, 7,8% como *S. simulans*, 6,3% como *S. hyicus*, 4,7% como *S. xyloso*, 2,4% como *S. warneri*, entre outras espécies.

S. xyloso era considerado não patogênico até a última década, porém já foi relatado seu isolamento na microbiota da pele de bovinos (KLOOS, 1980), no ambiente bovino (MATOS et al., 1991) e recentemente vem sendo identificados como agentes patogênicos em casos de mastite (RADOSTITS et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2013).

Estudo realizado por Fontana et al. (2012) avaliou as bactérias isoladas de tetos positivos ao CMT e de suabe das mãos de ordenhadores. Das 83 linhagens de *Staphylococcus* identificadas 31 (37,4%) foram *S. aureus*, 29 (35,0%) *S. saprophyticus* (ECN), 17 (20,5%) *S. xyloso*, 4 (4,8%) *S. epidermidis*, 2 (2,4%) *S. intermedius*. Evidenciaram, também, similaridade genética entre cepas encontradas em diferentes animais e nas mãos dos ordenhadores, que sugeriu contaminação cruzada entre cepas de origem humana e animal.

A grande variação na etiologia das mastites observadas nas propriedades leiteiras da agricultura familiar reforçam a importância da avaliação microbiológica de amostras de leite. A adoção de programas de monitoramento, com o auxílio de assistência técnica qualificada, tem papel fundamental na diminuição da prevalência e persistência das infecções

mamárias na produção leiteira que tem papel fundamental na melhoria da qualidade do leite obtido em pequenas propriedades rurais.

5.4. Qualidade do leite

O leite de boa qualidade é obtido quando provém de vacas sadias e limpas, ordenhadas em ambiente lavado, com mãos ou equipamentos higienizados e, imediatamente após a ordenha seja armazenado em reservatório inócuo e resfriado. Deve apresentar ausência de micro-organismos patogênicos, resíduos químicos e medicamentosos, baixa contagem bacteriana e de células somáticas, sabor agradável e alto valor nutritivo.

Além do controle da mastite nos rebanhos, muitos esforços vem sendo empregados para melhorar a qualidade do leite e garantir um alimento seguro e de alto valor nutricional (LANGONI et al., 2011). O estabelecimento de legislações voltadas ao desenvolvimento da cadeia leiteira a partir da instituição do PNMQL foi o principal deles.

Em 2002 entrou em vigor a IN nº 51, política pública regulatória que estabeleceu normas para a cadeia leiteira e propiciou mudanças profundas no setor (BRASIL, 2002). Afora padrões de produção, identidade e qualidade, foi regulamentada a coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Entre os benefícios decorridos destacam-se o resfriamento obrigatório do leite em até 3 horas após a ordenha e o estabelecimento de pagamento por qualidade com base na redução nas contagens de CCS.

Apesar de positiva, a normatização pressionou os produtores de leite, principalmente de agricultura familiar, a buscarem a modernização. Em muitos casos, a baixa organização do setor aliada à escassez de recursos para investimento, inviabilizou a manutenção dos pequenos produtores na atividade. Em outros, como observado nesta pesquisa, foram instituídas parcerias entre produtores e os laticínios, que possibilitaram a aquisição de tanques comunitários e de outras benfeitorias necessárias ao exercício da atividade leiteira.

Contudo, foram grandes as preocupações diante das dificuldades impostas pelo novo modelo institucional obrigando o MAPA a revisar normas e

prorrogar os prazos para adaptação de produtores e indústrias (MAPA, 2011). A IN n° 62 estabelece requisitos físicos e químicos para garantir a qualidade do leite cru refrigerado, dentre os quais limites mínimos de: 3,0 g / 100 g de gordura, 2,9 g / 100 g de proteína, 8,4 g / 100 g de extrato seco desengordurado (ESD).

Em relação ao aspecto microbiológico, a normativa estabelece limites para a CBT e CCS que variam de acordo com a região produtora, em tentativa de respeitar as diferenças tecnológicas regionais, e possuem limites progressivos para permitir adequação dos produtores de leite aos novos parâmetros preconizados (BRASIL, 2011).

Na região Sudeste, onde foi realizado o presente estudo, O MAPA estipulou limites para CBT e CCS de acordo com o QUADRO 1.

QUADRO 1. Limites exigidos pela Instrução Normativa (IN) n° 62 quanto aos valores de Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS) para a região Sudeste. (Brasil, 2011).

Período	Valores máximos permitidos	
	CBT	CCS
De janeiro de 2012 a junho de 2014	6 x 10 ⁵ UFC/mL	6 x 10 ⁵ CS/mL
De julho de 2014 a junho de 2016	3 x 10 ⁵ UFC/mL	5 x 10 ⁵ CS/mL
A partir de julho de 2016	1 x 10 ⁵ UFC/mL	4 x 10 ⁵ CS/mL

Os resultados obtidos da avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos das amostras de leite oriundas das propriedades de leite da agricultura familiar estão apresentados na TABELA 8.

TABELA 8. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos do conjunto de latões de leite de vacas de pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.

Produtor	CBT x 10 ³ (UFC/mL)	CCS x 10 ³ (CS/mL)	Físico – químico (g/100mL)				
			Gordura	Proteína	Lactose	EST	ESD
1	70	479	2,13	3,21	4,51	10,73	8,6
2	85	255	2,4	3,28	4,42	10,99	8,59
3	98	144	3,94	3,33	4,39	12,63	8,69
4	172	149	3,61	3,24	4,56	12,36	8,75
5	653	470	2,91	3,36	4,59	11,84	8,93
6	19	240	2,08	3,77	4,53	11,36	9,28
7	6	226	3,03	3,41	4,52	11,9	8,92
8	79	754	4,2	3,41	4,4	13,04	8,84
9	3	238	3,92	3,59	4,52	13,02	9,1
10	325	263	2,44	3,27	4,32	10,95	8,51
11	64	182	4,48	3,79	4,45	13,62	9,14
12	16	374	4,08	3,49	4,65	13,13	9,05
13	323	202	3,34	4,01	4,48	12,78	9,44
14	464	81	3,39	3,69	4,57	12,67	9,28
15	6700	2413	4,00	3,61	3,81	12,44	8,44
16	122	112	5,18	3,85	4,51	14,63	9,45
17	139	93	2,87	3,34	4,76	11,97	9,1
18	61	123	2,45	3,46	4,74	11,64	9,19
19	165	101	3,21	3,23	4,67	12,13	8,92
20	149	147	3,25	3,25	4,48	11,94	8,69
21	890	601	3,87	3,02	4,55	12,46	8,59
Média	505	364	3,37	3,46	4,50	12,30	8,93
Mediana	122	226	3,34	3,41	4,52	12,36	8,92

CBT = contagem bacteriana total, UFC = unidade formadora de colônia, CCS = contagem de céls. somáticas, EST = extrato seco total, ESD = extrato seco desengordurado.

Para avaliar as condições de higiene nas operações de ordenha e dos equipamentos utilizados, a CBT é um importante procedimento diagnóstico. Os valores obtidos no presente estudo oscilaram bastante e ultrapassaram os valores máximos preconizados pelo MAPA. A FIGURA 3 apresenta o percentual das propriedades (n=21) que atenderiam os parâmetros da CBT de acordo com os períodos estipulados pela IN n° 62.

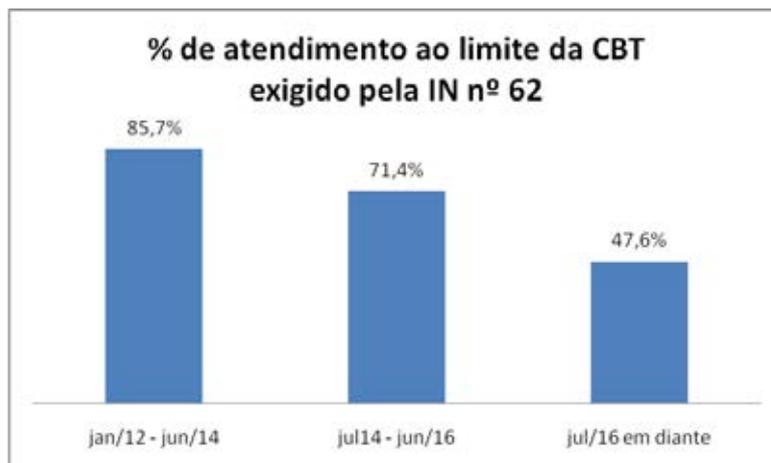


FIGURA 3. Percentual de produtores de leite da agricultura familiar que atenderam as exigências da Instrução Normativa (IN) nº 62 com relação aos limites de Contagem Bacteriana Total (CBT). Botucatu, 2014.

A higiene do ambiente e equipamentos de ordenha, antes do início dos procedimentos, é extremamente importante para obtenção de um produto de qualidade, pois eliminam grande quantidade de micro-organismos que podem ser veiculados pela contaminação do leite.

A implementação das IN nº 51 foi importante nos aspectos relativos ao resfriamento e transporte do produto, que diminuíram significativamente as taxas de multiplicação microbiana. No entanto, para a melhoria efetiva na qualidade do leite é fundamental esforços na diminuição da contaminação inicial do leite provenientes da própria glândula mamária, exterior do úbere, equipamentos e utensílios da ordenha e também da qualidade da água e saneantes utilizados durante o processo (PINTO & IZIDORO, 2007; FACCIOLI, 2010).

Os dados demonstraram que as falhas relacionadas à higiene inadequada das instalações, dos animais, equipamentos, bem como procedimentos operacionais observados durante as visitas às pequenas propriedades de leite da agricultura familiar, resultaram em prejuízos para os produtores e o laticínio devido à alta contaminação bacteriana do leite.

Importante ressaltar que os valores encontrados seriam ainda maiores caso a coleta ocorresse no momento da chegada do leite ao laticínio, pois haveria período propício à multiplicação bacteriana desde o final da ordenha, momento

no qual foi realizada a coleta das amostras no presente estudo, até o transporte do leite para o tanque de expansão e daí o transporte a cada 48 horas, até a indústria. Em concordância com o estudo, Souza et al. (2009a) sugeriram que a boa qualidade do leite, com contagens de mesófilos entre $2,1 \times 10^5$ e $3,3 \times 10^5$ UFC/mL, obtidos em tanque comunitário deu-se também pela proximidade deste com as propriedades estudadas, permitindo entrega e resfriamento rápidos.

A perspectiva desenhada a partir dos parâmetros estabelecidos a partir de julho de 2016 é preocupante uma vez que nem metade dos produtores pesquisados atenderia o valor de 100.000 UFC/mL de leite. Ao avaliarem os resultados obtidos em seis diferentes laboratórios integrantes da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL), Pinto & Izidoro (2007) concluíram que a contaminação bacteriana, evidenciada pela CBT, é o grande problema a ser enfrentado. Para Cerqueira et al. (2010) este parâmetro pode ser modificado com rapidez e facilidade, pelo fato de estar relacionado a falhas na limpeza e desinfecção, e nesse sentido deve haver a adoção de práticas de educação sanitária. O estabelecimento de programas de educação sanitária para os produtores de leite, principalmente aos da agricultura familiar, que possuem maior limitação técnica e financeira e constituem o maior número de trabalhadores no campo, é fundamental.

A CCS do leite reflete a intensidade de resposta inflamatória frente à infecção no tecido mamário. Células de defesa, principalmente neutrófilos, migram para o interior do úbere visando eliminar o patógeno. Admite-se que o leite com contagens iguais ou inferiores a 200.000 CS/mL são oriundos de glândulas mamárias saudáveis. Nessa perspectiva, foi observado que o rebanho de apenas 9 (42,9%) produtores apresentaram valores inferiores ao admitido, caracterizando-se como adequados.

Quando avaliados sob os critérios estabelecidos pela legislação brasileira foi constatado que atualmente 17 (85,7%) pequenos produtores atenderiam os valores preconizados para a CCS. Conforme representado pela FIGURA 4, esse número cairia para 16 (76, 2%) produtores a partir de julho de 2016.

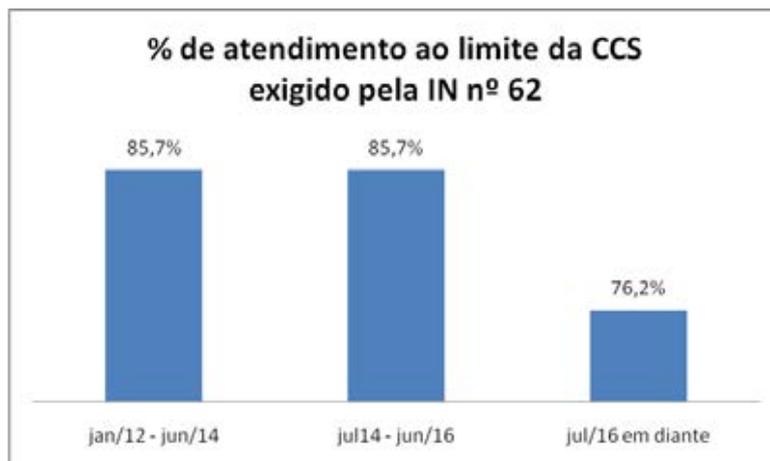


FIGURA 4. Percentual de produtores de leite da agricultura familiar que atenderam as exigências da Instrução Normativa (IN) nº 62 com relação aos limites de Contagem de Células Somáticas (CCS). Botucatu, 2014.

Apesar de parecer contraditório em relação ao observado nas atividades de ordenha das propriedades, esses resultados podem ser justificados pela maior rusticidade do rebanho. O gado mestiço, com baixa produção de leite, é mais resistente à mastite, enquanto animais de maior produção são mais susceptíveis às infecções mamárias (PRESTES et al., 2002).

Em estudo realizado na região do Alto Rio Grande, MG, Paixão (2013) evidenciou que 38% dos produtores estavam fora do padrão preconizado para a CCS e 13% não atenderam o limite da CBT. Apontou, também, que os principais fatores de risco para elevada CTB estava relacionado à ausência de água quente para limpeza do equipamento de ordenha e ausência do bezerro junto à vaca após a ordenha. Para a CCS os riscos relacionaram-se a presença de mão de obra contratada na ordenha, limpeza dos tetos com água antes da ordenha e não realização das análises de água.

Ao avaliarem a qualidade microbiológica de produtores da agricultura familiar no estado do Paraná, BADARÓ et al. (2010) evidenciaram que apenas 34,9% (n=962) atenderam o limite preconizado de CBT, enquanto 60,9% (n=1.679) se adequaram ao parâmetro de CCS. Quando avaliados ambos os parâmetros o percentual de produtores familiares considerados satisfatórios foi de apenas 24% (n=663).

Além das características genéticas e da capacidade imunológica dos animais, a CCS é diretamente influenciada pelo período de lactação, mês e estação do ano, ordem de parto, entre outros. Entretanto, o efeito específico dos patógenos e o estado da infecção mamária são os principais fatores responsáveis por suas variações. Nesse contexto, na TABELA 9 são apresentados os resultados médios da CCS obtidas de vacas com mastite clínica e subclínica de acordo com o patógeno responsável pela infecção mamária.

TABELA 9. Média da CCS em leite oriundo do teto de vacas com mastite, de acordo com o gênero microbiano. Botucatu, SP, 2014.

CCS x 10 ³ (CS/mL)	Gênero bacteriano						
	Staph	Strep	Cory	Colif.*	Staph / Strep	Cory / Staph	Cory / Strep
Média	1362	2857	976	1161	3707	1904	-
Mediana	579	1456	501	465	4501	934	608
Máximo	7357	9999	6554	3396	9999	4655	-
Mínimo	124	175	42	319	375	539	-
N	55	25	45	4	5	8	1
%	38,5	17,5	31,5	2,8	3,5	5,6	0,7

Staph = *Staphylococcus*, Strep = *Streptococcus*, Cory = *Coryne*, Colif. = grupo dos coliformes

Os patógenos classificados como principais (*S. aureus*, *S. agalactiae*, coliformes) causam mastites que resultam em grandes variações na composição do leite e na CCS, enquanto os patógenos secundários (ECN e *C. bovis*) causam processo inflamatório moderado (HARMON, 1994). Essa variação na CCS também pôde ser constatada no presente estudo.

Estudo realizado por Souza et al. (2009b) evidenciou que o *S. agalactiae* foi o micro-organismo responsável pelo maior aumento da CCS de vacas leiteiras. O que concorda com resultados do presente estudo, já que a maioria (67,7%) dos isolados do gênero *Streptococcus* foi caracterizada como *S. agalactiae*, havendo diferença estatística em relação aos outros gêneros

Além da comparação entre gêneros bacterianos, foi realizado confronto entre os valores de CCS obtidos dentro do gênero *Staphylococcus*, para os

grupos de ECP e ECN. Os resultados médios são apresentados na TABELA 10, a seguir.

TABELA 10. Média da CCS em leite oriundo do teto de vacas com mastite, de acordo com o grupo de ECP e ECN. Botucatu, SP, 2014.

CCS x 10 ³ (CS/mL)	Grupo de <i>Staphylococcus</i>	
	ECP	ECN
Média	1632	1060
Mediana	981	460
Máximo	7139	7357
Mínimo	288	124
N	29	26
%	52,7	47,3

A comparação das médias para CCS obtidas pelos ECP e ECN revelou que o valor do primeiro grupo foi significativamente superior à média observada nos casos de ECN. Entretanto, a comparação dos valores máximos observados para a CCS demonstrou a capacidade dos ECN suscitarem processos inflamatórios de intensidade elevada.

De todo modo, a redução da CCS nas propriedades leiteiras está necessariamente vinculada à adoção de programas de controle e prevenção de mastite, ferramentas que não foram implementadas nesta pesquisa junto aos produtores familiares (LANGONI, 2013).

Além do comprometimento microbiológico na qualidade do leite, a CCS elevada provoca aumento na atividade proteolítica, que compromete a qualidade físico-química de derivados lácteos, especialmente queijos (SEEGERS et al. 2003).

O teor de sólidos do leite determina o seu valor industrial, já que quanto maiores os percentuais de gordura e proteína, maior será o rendimento durante o processamento industrial. Em contrapartida, leite com deficiências importantes na composição podem ser rejeitados para beneficiamento na indústria leiteira (DÜRR, 2005).

Os parâmetros físico-químicos revelaram que 7 (33,3%) amostras não atingiram o percentual mínimo de 3,0% de gordura, estabelecido pela legislação atual (BRASIL, 2002). Fato que pode ser influenciado por diversos fatores como o padrão racial do animal, estação do ano e relação entre fornecimento de volumoso:concentrado.

O teor mínimo de proteína (2,9%) foi alcançado por todos os produtores. O extrato seco total é obtido pela soma dos percentuais de gordura, proteína, lactose e sais minerais, sendo considerado normal em valores acima de 11,4%. Já o extrato seco desengordurado (ESD) é obtido pela mesma soma anterior, sem contabilizar a gordura, isto é, 8,4%.

A FIGURA 5 apresenta o percentual de atendimento dos produtores de leite avaliados em relação a aspectos físico-químicos do produto.

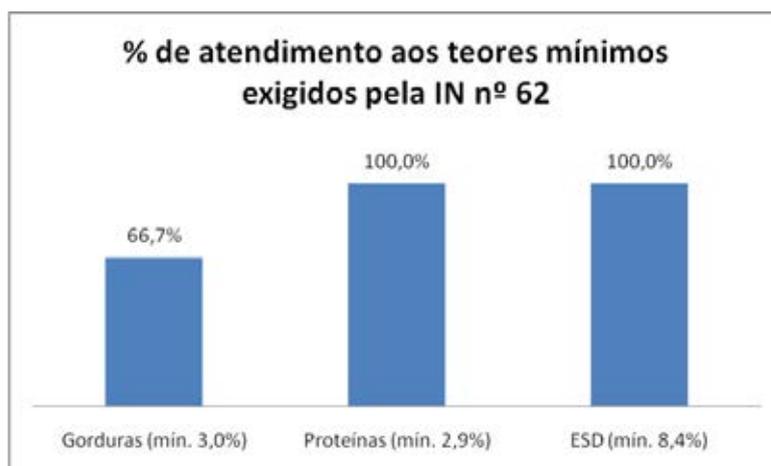


FIGURA 5. Percentual de produtores de leite da agricultura familiar que atenderam as exigências da Instrução Normativa (IN) nº 62 com relação aos teores físico-químicos. Botucatu, 2014.

No contexto da agricultura familiar, infere-se que o déficit nos percentuais de gordura ocorreu pela baixa qualidade genética dos animais explorados na atividade leiteira e pelo baixo valor nutricional da alimentação fornecida, já que os rebanhos eram criados à pasto, com pouca ou nenhuma suplementação. Em concordância, Toledo et al. (2001) relataram que o teor de gordura do leite é primariamente determinado pela combinação entre raça e regime alimentar.

Segundo Bueno et al. (2005) quando há elevada contaminação bacteriana é possível observar alterações significativas no teor de lactose do leite. O resultado observado na propriedade 15 concorda com esta afirmativa, pois apresentou a maior CBT (6700×10^3 UFC/mL) e menor percentual de lactose (3,81 g/100mL), apesar de não haver correlação estatística significativa entre esses parâmetros.

Os dados revelaram que os produtores da agricultura familiar estão vulneráveis à imposição de penalidades pelo laticínio por não atenderem os parâmetros microbiológicos e físico-químicos. Tal fato pode tornar o preço do litro do leite menor e dificultar, ainda mais a sobrevivência dos pequenos produtores na atividade leiteira.

5.5. Resistência aos antimicrobianos

Entre as estratégias mais importantes para controlar as infecções mamárias no rebanho leiteiro está o tratamento precoce dos casos clínicos e a terapia de vacas secas (SANTOS & FONSECA, 2007). Os resultados do presente estudo mostraram que nenhum produtor realiza tratamento para secagem, embora tenha sido relatada a utilização corriqueira de antimicrobianos sem a prescrição de profissional habilitado. De qualquer modo, é fundamental conhecer o perfil de resistência dos patógenos envolvidos para possibilitar tratamento mais rápido e adequado (RABELLO, 2003).

A resistência bacteriana está relacionada à existência de genes capazes de codificarem diferentes mecanismos bioquímicos que conferem ao micro-organismo capacidade de resistirem à ação de diversos fármacos. É resultado da pressão seletiva sobre agentes patogênicos que ocorre pela utilização, necessária ou não, do medicamento (TAVARES, 2000).

O aumento dessa resistência, tratado com preocupação no meio científico, pode ser explicado devido ao uso intenso e/ou indevido dos antimicrobianos. A pressão seletiva induzida pela presença do fármaco aumenta o número relativo dos micro-organismos resistentes, facilitando a transferência dos genes de resistência, por meio de transmissões cruzadas, às bactérias da microbiota normal ou às potencialmente patogênicas. Também merece destaque, o risco à

saúde pública da transferência de resistência, via alimentação, por meio de produtos alimentares contaminados com micro-organismos resistentes (TEUBER, 1999; WITTE, 2000; STÖHR & WEGENER, 2001).

Além de consistir em sério problema de sanidade animal e à saúde pública, a resistência aos antimicrobianos resultam em prejuízos financeiros diretos aos produtores de leite pelos gastos com medicamentos e descarte do leite durante o tratamento. Perdem também os laticínios e consumidores finais, na medida em que se não forem respeitados os períodos de carência recomendados para os antimastíticos, a qualidade e segurança dos produtos lácteos são comprometidas.

Dessa forma, o monitoramento da resistência é importante para minimizar falhas terapêuticas e riscos de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. A TABELA 11 apresenta os resultados percentuais da resistência das linhagens dos gêneros *Staphylococcus* frente a oito diferentes antimicrobianos.

TABELA 11. Perfil de sensibilidade de linhagens do gênero *Staphylococcus* frente a diferentes antimicrobianos. Botucatu, SP, 2014.

Antimicrobiano	<i>Staphylococcus spp.</i>					
	Sensível		Sens. Interm.		Resistente	
	N	%	N	%	N	%
Cefalotina (30 µg)	67	98,5%	1	1,5%	0	0,0%
Cotrimoxazol (25 µg)	66	97,1%	1	1,5%	1	1,5%
Enrofloxacina (5 µg)	65	95,6%	1	1,5%	2	2,9%
Gentamicina (10 µg)	66	97,1%	2	2,9%	0	0,0%
Neomicina (30 µg)	64	94,1%	2	2,9%	2	2,9%
Oxacilina (10 µg)	60	88,2%	5	7,4%	3	4,4%
Penicilina (10 UI)	40	58,8%	27	39,7%	1	1,5%
Vancomicina (30 µg)	9	13,2%	54	79,4%	5	7,4%

N = número, % = porcentagem

O gênero *Staphylococcus* apresentou alta sensibilidade frente a maioria dos antimicrobianos. Cefalotina, cotrimoxazol, enrofloxacina e gentamicina foram os antimicrobianos mais efetivos (>95,0%). No entanto, notaram-se índices

preocupantes de sensibilidade intermediária ou resistência completa frente a alguns fármacos, com destaque para a penicilina (41,2%), oxacilina (11,8%) e neomicina (5,8%) e a vancomicina (86,8%).

Em amplo estudo realizado no estado de Minas Gerais, Costa et al. (2013) avaliaram o perfil antimicrobiano de 352 isolados de *S. aureus* obtidos em 35 diferentes propriedades leiteiras. Os percentuais de resistência obtidos frente à cefalotina (0,28%), gentamicina (1,69%), neomicina (3,35%), enrofloxacina (<1,0%) e penicilina (34,1%) foram muito concordantes com os resultados do presente estudo.

Em relação à penicilina, as linhagens estafilocócicas mostraram alto percentual (41,2%) classificado com sensibilidade intermediária ou resistência ao fármaco. Este resultado pode ser explicado pelo fato deste antimicrobiano ser o primeiro utilizado em escala comercial, e ser amplamente difundido no tratamento de mastite em rebanhos leiteiros.

Da classe dos betalactâmicos, a penicilina provoca danos às bactérias pela inativação de enzimas essenciais à montagem da parede celular, tornando-a fraca e susceptível à lise osmótica (PINHO et al., 2001). Entretanto, acredita-se que nos dias atuais mais de 90% dos estafilococos são capazes de produzir penicilinase (β -lactamase), que degrada o anel betalactâmico e confere resistência do micro-organismo ao fármaco (BASSO, 2013).

São numerosos, no Brasil e no mundo, os relatos de linhagens de *Staphylococcus* resistentes à penicilina (LANGONI et al. 1991; DONATELE et al. 2002; VINVOT et al., 2003; PITKALA et al., 2004; RABELLO et al., 2005). Destaca-se também na literatura científica, estudos da modificação das proteínas ligantes de penicilina, que é sintetizada pelo gene *mecA*, conferindo resistência do gênero, e principalmente de *S.aureus*, à meticilina (AARESTRUP et al., 1998). No entanto, a pesquisa de características referentes a este antimicrobiano e ao referido gene não foi objeto de estudo.

Quanto à oxacilina, o percentual de 11,8% de resistência observado é similar aos obtidos por Siqueira (2011) em bactérias desse gênero isoladas de amostras de leite orgânico na região de Botucatu, no qual 88,0% foi sensível ao fármaco.

É emergente, em estafilococos isolados a partir de infecção das glândulas mamárias de vacas, a resistência à vancomicina. Fato merecedor de grande preocupação em saúde pública já que este é o fármaco de escolha no tratamento de infecções nosocomiais provocadas por micro-organismos com resistência à meticilina (COSTA et al., 2004; NADER FILHO et al., 2007).

No presente estudo, o gênero *Staphylococcus* apresentou sensibilidade igual a 13,2%, resistência intermediária de 79,4% e resistência de 7,4% frente à vancomicina. Entretanto, a revisão na literatura sobre estes resultados revelou que, assim como relatado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), o método de difusão em discos não é apropriado para verificação de sensibilidade deste gênero porque não apresentam resultados confiáveis. O CLSI aconselha para *Staphylococcus* spp. utilização de antibiograma quantitativo pelo método de concentração inibitória mínima (MIC), entretanto não foi possível a realização desta prova no presente estudo.

Foi objeto deste estudo a caracterização do perfil de sensibilidade microbiana dos grupos de ECP e ECN, como apresentado nas TABELAS 12 e 13 a seguir.

TABELA 12. Perfil de sensibilidade de linhagens de ECP frente a diferentes antimicrobianos. Botucatu, SP, 2014.

Antimicrobiano	ECP					
	Sensível		Sens. Interm.		Resistente	
	N	%	N	%	N	%
Cefalotina (30 µg)	37	100,0%	0	0,0%	0	0,0%
Cotrimoxazol (25 µg)	35	94,6%	2	5,4%	0	0,0%
Enrofloxacina (5 µg)	35	94,6%	1	2,7%	1	2,7%
Gentamicina (10 µg)	37	100,0%	0	0,0%	0	0,0%
Neomicina (30 µg)	35	94,6%	2	5,4%	0	0,0%
Oxacilina (10 µg)	34	91,9%	3	8,1%	0	0,0%
Penicilina (10 UI)	18	48,6%	0	0,0%	19	51,4%
Vancomicina (30 µg)	5	13,5%	29	78,4%	3	8,1%

N = número, % = porcentagem

TABELA 13. Perfil de sensibilidade de linhagens de ECN frente a diferentes antimicrobianos. Botucatu, SP, 2014.

Antimicrobiano	ECN					
	Sensível		Sens. Interm.		Resistente	
	N	%	N	%	N	%
Cefalotina (30 µg)	30	96,8%	1	3,2%	0	0,0%
Cotrimoxazol (25 µg)	31	100,0%	0	0,0%	0	0,0%
Enrofloxacina (5 µg)	30	96,8%	1	3,2%	0	0,0%
Gentamicina (10 µg)	29	93,5%	2	6,5%	0	0,0%
Neomicina (30 µg)	29	93,5%	1	3,2%	1	3,2%
Oxacilina (10 µg)	26	83,9%	3	9,7%	2	6,5%
Penicilina (10 UI)	22	71,0%	1	3,2%	8	25,8%
Vancomicina (30 µg)	4	12,9%	25	80,6%	2	6,5%

N = número, % = porcentagem

O uso indiscriminado e sem critérios definidos da penicilina, como relatado pelos produtores avaliados, pode ter contribuído para na pressão seletiva de cepas resistentes ao antimicrobiano. Os perfis obtidos dos grupos de ECP e ECN apontam nessa direção. No primeiro grupo 48,6% dos isolados foram considerados sensíveis e 51,4% foram resistentes ao fármaco, enquanto os micro-organismos do grupo de ECN apresentaram 71,0% de sensibilidade e 25,8% de resistência. Infere-se pelo fato dos ECP induzirem maior resposta inflamatória, que os micro-organismos desse grupo são alvos de tratamentos antimastóticos com maior frequência que os ECN, levando à pressão seletiva e consequente resistência frente ao fármaco.

A maior resistência dos isolados de *S. aureus* frente à penicilina e ampicilina foi relatada por Nader Filho et al. (2007), enquanto que a maior taxa de sensibilidade foi para a gentamicina.

Guimarães et al. (2009) e Guimarães et al. (2013) avaliaram a resistência de grupos de ECN isolados a partir de mastite bovinas e verificaram, assim como no presente estudo, que as maiores taxas de resistência foram relacionadas à penicilina e oxacilina, além da ampicilina. Por outro lado, evidenciaram grande eficácia da cefalotina e enrofloxacina frente a este grupo.

A multirresistência ocorre quando determinado isolado apresenta resistência a pelo menos dois diferentes grupos farmacológicos de antimicrobianos ou a três antimicrobianos diferentes do mesmo grupo (SIEGEL et al., 2006). Nesse contexto com a exclusão dos resultados frente à vancomicina, sete (10,3%) isolados foram considerados multirresistentes, sendo quatro do grupo ECP (5,9%) e três do grupo ECN (4,4%).

Diante desta perspectiva é possível inferir que as características das propriedades leiteiras e a região onde se encontram tem pouca relevância no perfil de resistência aos antimicrobianos, sendo este relacionado diretamente com a intensidade e eficiência do uso de antimicrobianos nos tratamentos de mastite. Nesse sentido, é fundamental o acesso dos produtores de leite da agricultura familiar a assistência técnica que garanta maior eficiência nos tratamentos das mastites do rebanho por meio da implantação de programas de controle e prevenção de mastite.

5.6. Enterotoxinas

Em todo o mundo há relatos da participação das enterotoxinas estafilocócicas e do risco à saúde pública em virtude das intoxicações alimentares que provocam (Silva et al., 2005). Da família dos super antígenos pirogênicos, as enterotoxinas estafilocócicas são proteínas termoestáveis com capacidade de resistirem ao processo de pasteurização e outros tratamentos térmicos (BHATIA & ZAHOOR, 2007).

Diversos estudos reportaram *Staphylococcus* sp. isolados a partir amostras de leite provenientes de glândulas mamárias acometidas por mastite com capacidade de produzir enterotoxinas, sendo que em 2/3 dos casos de surtos alimentares são relatados o envolvimento do leite e seus derivados (LOIR et al., 2003).

Os sinais característicos da intoxicação estafilocócica podem ocorrer pela ingestão de menos de 1 mg de toxina, sendo curto o período de incubação. As enterotoxinas agem no trato gastrointestinal e provocam vômitos intensos, sintoma observado com maior frequência nas intoxicações. Já a toxi-infecção,

pode ocorrer pela ingestão de 10^5 UFC de *Staphylococcus* por grama ou mililitro de alimento (BERGDOLL, 1989).

Um grave surto de intoxicação alimentar ocorrido em Minas Gerais foi relatado por Carmo et al. (2004), ocasião em que por volta de 8.000 pessoas foram acometidas e 16 vieram a óbito. Entretanto, assim como em outras DTAs, a mortalidade é rara e os sintomas variam de acordo com a susceptibilidade individual, sendo mais preocupante em crianças, idosos e portadores de doenças imunossupressoras (CLIVER, 1994).

Nesse contexto foi realizada a detecção dos genes codificadores dos tipos clássicos da enterotoxinas estafilocócicas (SEA, SEB, SEC, SED). Das 37 amostras de ECP submetidas ao PCR, oito (21,6%) foram positivas para pelo menos um gene codificador de enterotoxinas clássicas. Enquanto que para as 31 amostras de ECN, 13 (41,9%) amostras foram positivas. Os resultados são apresentados na TABELA 14 a seguir.

TABELA 14. Presença dos genes que codificam a produção de enterotoxinas em ECP e ECN, isolados em amostras de leite de vacas obtidas de propriedades da agricultura familiar. Botucatu, SP, 2014.

Grupo	Genes codificadores de enterotoxinas				Total
	Positivos		Negativos		
	N	%	N	%	
ECP	8	21,6%	29	78,4%	37
ECN	13	41,9%	18	58,1%	31
Total	21	30,9%	47	69,1%	68

Em estudo realizado em dez propriedades leiteiras do Estado de São Paulo, Guimarães et al. (2013) relataram que em 66,4% dos ECN e 34,8% dos ECP isolados dos casos de mastite bovina foram detectados genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas. Evidenciaram, também, a positividade significativamente maior dos ECN em relação aos ECP, quanto à presença desses genes, assim como foi constatado no presente estudo.

No presente estudo, das 68 amostras submetidas à pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas, 21 (30,9%) foram positivas para pelo menos um

tipo de gene codificador de enterotoxina clássica. Este resultado é similar ao obtido por Oliveira et al. (2011), que evidenciaram 19,0% das 574 amostras de *Staphylococcus* com potencial enterotoxigênico, isoladas em rebanhos nacionais. A TABELA 15 apresenta os tipos e prevalência dos genes clássicos (A, B, C, D) detectados.

TABELA 15. Distribuição dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas nas linhagens de ECP e ECN isolados de leite de vacas de pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.

Genes	ECP		ECN		Total	
	N	%	N	%	N	%
<i>sea</i>	5	20,8%	6	25,0%	11	45,8%
<i>seb</i>	1	4,2%	6	25,0%	7	29,2%
<i>sec</i>	3	12,5%	3	12,5%	6	25,0%
<i>sed</i>	-	0,0%	-	0,0%	-	0,0%
Total	9	37,5%	15	62,5%	24	100,0%

Ao considerar somente amostras positivas à detecção de genes codificadores de enterotoxinas foi verificado que o gene *sea* foi prevalente com percentual de 45,8%, seguidos pelo *seb* com 29,2% e *sec* com frequência de 25,0%. O gene *sed* não foi evidenciado em nenhuma das amostras. Esses resultados concordam parcialmente aos encontrados na literatura científica, Zoli et al. (2002) apontaram que a enterotoxina expressada pelo *sed* é o segundo principal tipo envolvido em surtos alimentares, sendo mais frequente a intoxicação pela SEA. Pinchuk et al. (2010) também associaram as intoxicações de origem alimentar com a detecção da SED.

Em estudo realizado no estado de São Paulo, Guimarães et al. (2013) verificaram entre os ECN isolados que o gene *sea* apresentou o maior índice de detecção com 35,1% enquanto o *sed* o menor, com 1,8%. Na Palestina, Adwan et al. (2005) encontraram nas linhagens de *S. aureus* isoladas de leite cru convencional 10,8% carreando *sea*, 54,1% *seb*, 10,8% *sec* e 16,2% *sed*. Na Turquia, Karahan et al. (2009) detectaram em 29,3% dos isolados de *S. aureus* pelo menos um gene codificador de enterotoxina, enquanto no Brasil, o percentual obtido por Cardoso et al. (2000) foi de 47%.

Além da constante detecção dos genes codificadores de enterotoxinas em linhagens de *Staphylococcus*, são frequentes os relatos da participação da SEA como principal causa de intoxicações estafilocócicas (DINGES et al., 2000; ARGUDÍN et al., 2010). Estudo realizado por Fagundes e Oliveira (2004) também apontou a enterotoxina do tipo como A como a mais frequentemente associada à gastroenterite estafilocócica. Sua produção pelo *S. aureus* foi evidenciada em 37% dos isolados, seguida pelos tipos B (17,7%), SED (11,8%) e SEC (10,6%).

Estudo realizado por Pimentel et al. (2002) em pools de amostras de leite revelou possibilidade de síntese de algum tipo de enterotoxina, em 24,6% das amostras de ECP e 41,3% das amostras de ECN. Nesse sentido, fica evidente o atraso da legislação brasileira – RDC nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) – que preconiza apenas a contagem de ECP na avaliação do risco de produção de enterotoxinas (BRASIL, 2001).

Apesar disso, como relatado por Faccioli (2010), uma alta prevalência dos genes responsáveis pela produção de enterotoxinas não corresponde, necessariamente, à expressão elevada de enterotoxinas. Carmo et al. (2009) evidenciaram a presença de mecanismos naturais capazes de inibir a produção de enterotoxinas em leite contaminado com linhagens de *S. aureus* enterotoxigênicas. Fatores como condições de crescimento bacteriano, presença de glicose, pH do meio e até mesmo sistemas regulatórios do próprio micro-organismo interferem na expressão dos genes (CAL SOLARI, 2006; CUNHA et al. 2007b).

Estudo do potencial enterotoxigênico de estafilococos em produtos lácteos foi realizado por Martins (2011), e das 111 amostras pesquisadas, apenas uma (0,9%) produziu enterotoxina e a tentativa de detecção de genes pela PCR, logrou-se negativa.

Outra dificuldade encontrada no meio científico para relacionar a detecção de genes codificadores com a produção efetiva das enterotoxinas é o fato dos métodos imunológicos produzirem resultados falso-positivos por reações cruzadas entre antígenos, anticorpos monoclonais e pela ocorrência de reações inespecíficas, o que prejudica a análise de dados (SPERO et al., 1978; EDWIN et al., 1986; CUNHA et al., 2007b).

Os resultados da pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas entre as ECP e ECN, são apresentados nas TABELAS 16 e 17.

TABELA 16. Frequência dos genes codificadores de enterotoxinas em espécies de ECP isolados a partir de amostras de leite de vacas obtidas em pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.

ECP	Enterotoxinas					
	Resultado da amostra		Gene			
	Negativos	Positivos	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>
<i>S. aureus</i>	17	4	3	-	2	-
<i>S. hyicus</i>	2	2	1	1	-	-
<i>S. schleiferi</i>	-	1	-	-	1	-
<i>S. intermedius</i>	2	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus spp.</i>	8	1	1	-	-	-
Total	29	8	5	1	3	0

TABELA 17. Frequência dos genes codificadores de enterotoxinas em espécies de ECN isolados a partir de amostras de leite de vacas obtidas em pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.

ECN	Enterotoxinas					
	Resultado da amostra		Gene			
	Negativos	Positivos	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>Sed</i>
<i>S. chromogenes</i>	2	3	-	2	1	-
<i>S. xylosum</i>	6	3	1	2	-	-
<i>S. epidermidis</i>	4	2	2	-	1	-
<i>S. warneri</i>	1	1	1	-	-	-
<i>S. simulans</i>	1	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus spp.</i>	4	4	2	2	1	-
Total	18	13	6	6	3	0

Os resultados mostram que, tanto nas linhagens de ECP como nas de ECN, há cepas que apresentam genes codificadores para dois tipos diferentes de enterotoxinas estafilocócicas. Em linhagens de *S. aureus* foi evidenciada a presença de dois genes codificadores de enterotoxinas, *sea* e *sec*. Já na linhagem de ECN, *S. epidermidis* revelou o gene *sea* em conjunto com o *sec*. Outra cepa, cuja caracterização bioquímica não foi conclusiva, apresentou os

genes *seb* e *sec*, reforçando que é possível determinadas linhagens de estafilococos expressarem concomitantemente mais de um gene produtor de enterotoxinas.

Considerando o total de linhagens de *Staphylococcus* pesquisadas, o gene codificador da enterotoxina SEA foi o mais frequente nas espécies de ECP, com 13,5% (5/37) de positividade. Enquanto nos ECN foram detectadas 19,4% (6/31) de positividade para *sea* e *seb*. Nas linhagens de ECP *seb* apresentou 2,7% (1/37) de positividade. Em relação ao *sec*, foi detectada prevalência igual a 8,1% (3/37) nos ECP e 9,7% (3/31) nas espécies de ECN.

Constatou-se a importância do leite na circulação de linhagens estafilocócicas com potencial enterotoxigênico que podem, sob condições favoráveis, levar a quadros de intoxicação alimentar. No âmbito da agricultura familiar, este risco potencial é ainda mais preocupante pelo fato de ser frequente a ingestão leite e derivados “in natura” pelos próprios produtores e seus familiares, além do comércio clandestino do leite informal.

Conclusões

6. Conclusões

1. O perfil dos produtores de leite da agricultura familiar revelou média de idade de 59 anos, baixa escolaridade, baixo otimismo e perspectivas de investimentos em relação à atividade, apesar desta ser a principal fonte de renda familiar;
2. Há grande potencial para o incremento da produção e melhoria na qualidade do leite, pois o rebanho apresenta baixa aptidão leiteira (não especializado), é baixo o grau de tecnificação e as áreas disponíveis nas propriedades são subaproveitadas;
3. Há grande precariedade na infraestrutura e deficiência nos procedimentos de boas práticas de ordenha. A utilização da ordenha mecânica provocou lesões nos óstios dos tetos;
4. Devido à baixa aptidão leiteira do rebanho, a prevalência de mastite e a CCS apresentaram índices satisfatórios;
5. Valores obtidos para CBT demonstraram a necessidade de implantação de políticas públicas que priorizem a educação sanitária e disseminem a implementação de boas práticas de ordenha;
6. Os teores dos principais constituintes do leite atendem a legislação vigente;
7. A alta frequência do isolamento de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., e *Corynebacterium* spp. no leite dos animais evidenciam a maior participação de micro-organismos contagiosos na etiologia da mastite;
8. A presença de *sea*, *seb* e *sec* nas linhagens de *Staphylococcus* spp. demonstra os riscos potenciais para a saúde pública devido à possibilidade de intoxicação alimentar pelo consumo de leite oriundo dessas propriedades.

Referências Bibliográficas

7. Referências bibliográficas

AAERESTRUP, F.M.; BAGER, F.; JENSEN, N.E.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H.C. Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic, zoonotic and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: A baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v.106, p.745-70, 1998.

AARESTRUP, F.M.; SAYFARTH, A.M.; EMBORG, H.D.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R.S.; BAGER, F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal Enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2054-2059, 2001.

ABRAMOVAY, R. Funções e medidas da ruralidade no desenvolvimento contemporâneo. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**. Rio de Janeiro, 2000.

ACCO, M.; FERREIRA, S. F.; HENRIQUES, J. A. P.; TONDO, E. C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food microbiology**, v.20, n.5, p. 489-493, Out 2003.

ADWAN, G.; ABU-SHANAB, B.; ADWAN, K. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk in the North of Palestine. **Turkey Journal of Biology**, v.29, p.229-232, 2005.

ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v.2, n.7, p.1751-1773, 2010.

ASPERGER, H.; ZANGERL, P. Staphylococcus aureus. In: ROGINSKY, H.; TUQUAY, J.W.; FOX, P.F. (Eds). Encyclopedia of dairy sciences. v.4. **Academic Press and Elsevier Science**: Amsterdam, p.2563-2569, 2003.

BADARÓ, A. C. L.; ARMENDARIS, C. R.; MARCHI, J. F. Parâmetros microbiológicos do leite cru resfriado proveniente da agricultura familiar da região do sudoeste do Paraná. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, PR, 2010. <<http://www.sovergs.com.br/site/higienistas/trabalhos/9964.pdf>>. Acesso em 15/10/13.

BAKER, J.S. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.19, p.875-79, 1984.

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

BALDASSI, L.; FILHO, M. F.; HIPÓLITO, M.; MOLIN, A. A. P.; CALIL, E.M.B.; PIRES, D.C. Etiologia da mastite subclínica na Bacia Leiteira de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. **Arquivo Instituto Biológico**, v.58, p.29-36, 1991.

BANNERMAN, T.L.; MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER M.A.; YOLKEN, R.H. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically. **American Society Microbiology**, p.384-404, 2003.

BARROS, F. L. A.; LIMA, J. R. F.; FERNANDES, R. A. S. Análise da estrutura de mercado na cadeia produtiva do leite no período de 1998 a 2008. **Revista de economia e agronegócio**, vol. 8, n. 2, 2010.

BASSO, A. P. Resistência a antimicrobianos, genes de enterotoxinas e formação de biofilme em *Staphylococcus* spp. isolados do arroio Dilúvio. **Instituto de Ciências básicas da Saúde** (dissertação de mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BEAN, N. H.; GOULDING, J. S.; DANIELS, M. T.; ANGELO, F. J. Surveillance for food borne disease outbreaks - United States, 1988-1992. **Journal of Food Protection**, v.60, p.1265-1286, 1996.

BELOTI, V; BARROS, M.A.F.; SOUZA, J.A.; NERO, L.A.; SANTANA, E.H.W.; BALARIN, O.; CURIKI, Y. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procopio, Paraná – Controle do consumo e da comercialização. **Semina**, v.20, p.12-15, 1999.

BEM, A.; FABRINI, J. E. A comercialização informal de leite como componente de resistência camponesa em Marechal Cândido Rondon, PR. **Revista Nera**, ano 8, n. 6, jan-jun, 2005.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, p.463-523, 1989.

BERTOLLO, V. L. Condicionantes para a adoção da produção mais limpa pelos agricultores familiares produtores de leite no município de Erval Grande, RS. Centro de Estudos em Pesquisas em Agronegócios (Dissertação de Mestrado). Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, 2002.

BERTRAND, J.A. Influence of shipping container preservative and breed on analysis of milk components of shipped samples. **Journal of Dairy Science**, v.6, n.1, p.145-148,1996.

BHATIA, A.; ZAHOR, S. Staphylococcus aureus Enterotoxins: A Review **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.1, n. 3, p. : 188 – 197, 2007.

BOLANÇOS, C. A. D.; PANTOJA, J. C. F, ALVES, A. C., RISSETI R. M., LISTONI, F. J. P.; RIBEIRO, M. G. Qualidade do leite de vacas criadas no sistema silvopastoril no Vale do Cauca, Colômbia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, [2]: 134-140. Fev 2014.

BRABES, K.C.S.; CARVALHO, E.P.; DIONÍSIO, F.L.; PEREIRA, M.L.; GARINO Jr, F.; COSTA, E.O. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero Staphylococcus na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Napgama**, n.2, p. 4-11, 1999.

BRASIL. Lei nº 11.947, de 16 de junho de 2009. Dispõe sobre o atendimento da alimentação escolar e do Programa Dinheiro Direto na Escola aos alunos da educação básica... e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 17 jun. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de Setembro de 2002. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológica para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Instrução Normativa 62**, Brasília, DF, 26 ago. 2003

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 08, de 25 de março de 2004. **Art. 1º Proibir em todo o território nacional a produção...**, Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Instrução Normativa 68**, Brasília, DF, 14 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62**, de 29 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo... Diário Oficial da União, Brasília, 27 de Dezembro de 2011. Seção 1.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos**. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2001. 18p.

BREITENBACH, R. & SOUZA, R. S. Caracterização de mercado e estrutura de governança na cadeia produtiva do leite na região noroeste do Rio Grande do Sul. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v. 13, n. 1, p. 77-91, 2011.

BUENO, V.F.F.; et al. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.848-854, 2005.

CALSOLARI, R.A.O. Determinação do perfil toxigênico em *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos pela técnica de RT-PCR. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual de Paulista, Botucatu.

CAMARGOS, C. R. M. Os novos tempos da produção leiteira nacional. ANUALPEC. São Paulo: **FNP Consultoria e Agroinformativos**, p. 213-14, 2003.

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 1, p.7-10, 2000.

CARMO, L. S.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V. R.; DIAS, R. S.; SOUZA, J. M.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; SHUPP, J. W.; PEREIRA, R. K. P.; JETT, M. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incidente. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.1, n.4, p.241-246, 2004.

CARMO, L.S.; GUEDES, L.G.; BAMBIRRA, L.H.S.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; NICOLI, J.R. Produção de enterotoxina SEA e SEB em leite contaminado com as linhagens (FRI 722 e FRI S-6) produtoras respectivamente de enterotoxina SEA e SEB e uma linhagem de *Lactobacillus*. Revista da Fundação Ezequiel Dias – Gestão, Ciência e Saúde, v.4, n.1, 2009.

CARVALHO, G. R., CARNEIRO, A. V., STOCK, L. A. O Brasil no cenário mundial de lácteos. **Comunicado técnico**. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG, v. 51, 2006

CARVALHO, M.P.; MARTINS, P.C.; WRIGHT, J.T.C.; SPERS, R.G. Cenários do leite no Brasil em 2020. Juiz de Fora: **EMBRAPA Gado de Leite**, 2007.190p.

CARVALHO, G.R. A indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro. **Circular técnica**. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG, v. 102, 2010.

CENCI-GOGA, B.T.; KARAMA, M.; ROSSITTO, P.V.; MORGANTE, R.A.; CULLOR, J.S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis cows. **J. Food Prot.**, v.66, p.1693-1696, 2003.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; PAIVA, C. A. V.; LEITE, M. de O.; FONSECA, L. M. da; SOUZA, R. M. de; PENNA, C. F. de A. M. Impacto da qualidade da matéria-prima na indústria de laticínios. [2010]. Disponível em: http://solutions.3m.com.br/wps/portal/3M/pt_BR/Microbiology/FoodSafety/news-events/ >. Acesso em: 15/10/13.

CHENIER, S. & LALLIER, L. Acantholytic folliculitis em epidermitis associated with *Staphylococcus hyicus* in a line of white leghorn laying chickens. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 2, p. 284-287, Mar 2012.

CLIVER, D.O. Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria. New York: **Marcel Dekker**, 1994. 613p

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second Informational Supplement. M100–S22. CLSI, Wayne, PA, 2012.

CORDEIRO, D. N. G. Significância clínica da presença de *Staphylococcus* coagulase-negativo isolados de recém-nascidos de uma unidade de terapia intensiva neonatal em Brasília – DF. Brasília: UnB, 2007, 142p (Dissertação de Mestrado), Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, 2007.

COSTA, E.O. Importância econômica da mastite infecciosa bovina. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.15, n.1, p.21-26, 1991.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; VIANNI,F.C.; WHITE, C.R. Prevalence of intramammary infections in primigravid Brazilian dairy heifers. **Preventive Veterinary Medicine**, v.29, p.151-55,1996.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista Educação Continuada**, v.1, n.1, p.3-9, 1998.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; GUERRA, J. L.; MELVILLE, P. A. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 47, p. 99-103, 2000.

COSTA, E.O.; GARINO JR, F.; RIBEIRO; AR.; WATANABE, E.T .; BUENO; J.A. Resistência aos antimicrobianos de microrganismos do gênero *Staphylococcus* isolados de mastite bovina no decênio de 1992 a 2001, **Revista Napgama**, São Paulo, V.7, n.2, p.-13-20, 2004.

COSTA, E.O. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite (PNMQL). **Revista Napgama**, São Paulo, v.8, n.2, p.18-21, 2005.

COSTA, M. C.; BARROS, R. A.; CUSTÓDIO, D. A. C.; PEREIRA, U. P.; FIGUEIREDO, D. J.; SILVA, D. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados em mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013

CUNHA, M.L.R.S., SINZATO, Y.K., SILVEIRA, L.V.A. Comparison of Methods for the Identification of Coagulase-negative Staphylococci. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.8, p.855-60, 2004.

CUNHA, M.L.R.S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R.A.O.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.1, p.70-74, 2006.

CUNHA, M. L. R. S. *Staphylococcus aureus*: TOXINAS E SAÚDE PÚBLICA. In: LANGONI, H., RIBEIRO, M. G., SANTOS, M. V., DOMINGUES, P. F., PINTO, J. P. A. N., NADER FILHO, A. **Anais do 4º Encontro de pesquisadores em Mastites. Botucatu** : FMVZ – UNESP, 2007 (a). p. 56-63.

CUNHA, M.L.R.S., PERESI, E., CALSOLARI, R.A.O., ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 genes in *Staphylococcus* with emphasis in coagulase-negative staphylococci. **Microbiology and Immunology**, v.51, n.4, p.381-390, 2007 (b).

CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.19-24, 2008.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap. 38: A glândula mamária, p. 385-396, 1999.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Review**, v.13, p.16-34, 2000.

DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H.; PADOVANI, C. R. Influência da mastite subclínica sob a produção de leite. **Vet. Zootec.** p. 99-106, 1998.

DOMINGUES, P. F.; LANGONI, H. Manejo sanitário Animal. **Editora de publicações Biomédicas**, EPUB, 209p. Rio de Janeiro, 2001

DONATELE, D. M.; MOTTA, O. V.; FOLLY, M. M. Perfil antimicrobiano de linhagens de *Staphylococcus* spp.coagulase positiva na mastite subclínica de vacas leiteiras nas regiões norte e noroeste do Estado do Rio de Janeiro. **Revista NAPGAMA**, v.5, n.2, p.3-6, 2002.

DÜRR, J. W. Como produzir leite de alta qualidade. Brasil: **SENAR**, p. 32, 2005.

EDWIN, C.; TATINI, S.R.; MAHESWARAN, S.K. Specificity and cross-reactivity of staphylococcal enterotoxin A monoclonal antibodies with enterotoxins B, C1, D, and E. **Applied and Environmental Microbiology**, v.52, n.6, p.1253-1257, 1986.

ELIAS, A. O. Detecção molecular de *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite bovino obtidas em tanques de expansão (Dissertação de doutorado). Botucatu, 2007.

EMBRAPA. GADO DE LEITE. **Estatísticas do leite**. Juiz de Fora, 2007. Disponível em: <<http://www.cnpgl.embrapa.br>>. Acesso em: 23 de janeiro de 2012.

EUZÉBY, J. P. M. List of Prokaryotic Name with standing in nomenclature. 2012. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 25 de agosto de 2013.

FACCIOLI, P. Y. Detecção molecular de *Staphylococcus aureus* e de suas toxinas no leite de tanque de rebanhos bovinos, em condições de refrigeração e sob temperatura ambiente. 134p. (Tese de Doutorado). **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2010.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FARBER, J.M.; GENDEL, S.M.; TYLER, K.D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W.; FRITSCHER, S.; BARRETT, T.J. Molecular typing and differentiation. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, APHA, 2001. Chap.11, p.127-158.

FERGUSON, J.D.; AZZARO, G.; GAMBINA, M.; LICITRA, G. Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.12, p.5798-5813, 2007.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do Leite e Controle de Mastite. São Paulo: **Lemos Editorial**, 2000.

FONTANA, V. L. D. S.; GIANNINI, M. J. S. M.; FONTANA, C. A. P.; LEITE, C. Q. F.; STELLA, A. E. Caracterização molecular de estafilococos isolados de vacas com mastite subclínica e ordenhadores. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 469-476, out/dez., 2012.

FONTANELI, R.S. Produção de leite de vacas holandesas em pastagens tropicais perenes no planalto médio do Rio Grande do Sul. 2005. 172f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2013. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/panorama/previsoes-da-fao-para-o-mercado-mundial-de-lacteos-86407n.aspx>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2014.

FUEYO, J.M.; MENDOZA, M.C.; MARTIN, M.C. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. **Microbes Infect.**, v.7, p.187-194, 2005.

FUNDAÇÃO BANCO DO BRASIL. Desenvolvimento Regional Sustentável. **Série cadernos de propostas para atuação em cadeias produtivas – Bovinocultura de leite**. Vol.1, 57 p. Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.bb.com.br/docs/pub/inst/dwn/Vol1BovinoLeite.pdf> Acesso em: 12 de outubro de 2013.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the manual. In: Boone, DR, Castenholz, RW (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, New York: Berlin: Springer- Verlag, v.1, p.119-166, 2001.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.; BETANCOR, A. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1913-1917, 2002.

GERMANO P. M. L.; GERMANO M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 629p.

GOMES, S.T.; VILELA, D.; BRESSAN, M.; CUNHA, A.S. Diagnóstico e perspectivas da produção de leite no Brasil. In: **Cadeia de lácteos no Brasil: restrições ao seu desenvolvimento**. EMBRAPA Gado de Leite: Juiz de Fora, p.21-37, 2001.

GONZÁLEZ, R.N.; JASPER D.E.; BUSHNELL R.B.; FARVER T.B. Relationship between mastitis pathogen numbers in bulk tank milk and bovine udder infections in California dairy herds. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.189, n.4, p.442-445, 1986.

GONZÁLEZ, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo das vacas leiteiras**. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.S.M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência Agrotécnica**, v.29, n.2, p.216-222, 2005.

GUIMARÃES, F. F.; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, p.38-5, 2009.

GUIMARÃES, F. F., SANTOS, F., G. B.; ARCARO, J.; PERES, A. A.; LANGONI, H.; CUNHA, M. L.; COSTA, E. O. CNS isolates from bovine mastitis antimicrobians susceptibility. **Proceedings Latin-American Buiatric Congress**, Lima, Perú. 2009.

GUIMARÃES, F. F.; NÓBREGA, D. B.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; MARSON, P. M.; PANTOJA, J. C. F.; LANGONI, H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2866-2872, 2013.

GUIMARÃES, R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. **Higiene Alimentar**, v.16, p.25-34, 2002.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2113, 1994.

HOGAN, J. S.; SMITH, K. L. Risk factors associated with environmental mastitis. (disponível em: <http://www.nmconline.org/articles/riskfactors.htm>. Acesso em: 18 de maio de 2014.

HUI, Y. H.; GORHAM, J. R.; MURREL, K. D.; CLIVER, D. O. **Foodborne diseases handbook: diseases caused by bacterias**. New York: Marcel Decker Inc., 1994. 613p

IBGE. **Produção leiteira brasileira**, 2010. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/producao_mundial.htm.> Acesso em: 27 de maio de 2013

IBGE. **Produção da pecuária Municipal**, 2012. Disponível em:
<ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2012/ppm2012.pdf> Acesso em: 27 de maio de 2013

IGIMI, S.; TAKAHASHI, E.; MITSUOKA, T. *Staphylococcus schleiferi* subsp *coagulans* subsp-nov, isolated from external auditory meatus of dogs with external ear otitis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n, 4, p. 409-411, Out 1990.

JANK, M.; FARINA, E.; GALAN, V. B. *O agribusiness do leite no Brasil*. São Paulo: **Milkbizz**, 1999.

JANK JUNIOR, R. Avaliação do impacto econômico de tecnologias de produção de leite na agricultura familiar. Problemas da transição à agricultura sustentável – A importância econômica, social e nutricional do leite. Atualidades e perspectivas para o mercado lácteo. 2009. [HTTP://www.samvet.com.br/site/palestras/jank.pdf](http://www.samvet.com.br/site/palestras/jank.pdf) Acesso em 18 de agosto de 2013.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 804p.

JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, E.P.; ASHTON, F.E.; POLLARD, D.R.; ROZEE, K.R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.3, p.426-430, 1991.

JUNIOR, G.N.; SANTOS, E.B. Evolução da produção leiteira do Brasil. **Revista Veterinária e Zootecnia**, vol 20, p. 216-217, jun. 2013. Disponível em: <<http://www.universidadedoleite.com.br/mercado-evolucao-da-producao-leiteira-do-brasil>> Acesso em 15 janeiro de 2014.

KARAHAN, M.; AÇIK, M.N.; ÇETINKAYA, B. Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.8, 1029-1035, 2009.

KHAMBATY, F. M.; BENNETT, R. W.; SHAH, D. B. Application of pulsed-field gel-electrophoresis to the epidemiologic characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. **Epidemiology and Infection**, v. 113, n. 1, p. 75-81, Ago 1994.

KIRKAN, S.; GOKSOY, E.O.; KAYA, O. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative from bovine mastitis in the Aydin region of Turkey. **Turkey Veterinary Animal Science**, v.29, p.791-796, 2005.

KLOOS, W.E. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. **Annual Review of Microbiology**, p.34559-592, 1980.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus* In: MURRAY, P. R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, 7. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1999, p. 264.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. **Diagnóstico Microbiológico- Texto e Atlas colorido**. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 2008. 1760p.

KRUG, E. E. B. Estudo para identificação de *benchmarking* em sistemas de produção de leite no Rio Grande do Sul. Faculdade de Administração (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2001.

KWOK, A.Y.C.; CHOW A.W. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. **Int. Evol. Microbiol.**, v. 53, p.87-92, 2003.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e contagem de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; PINTO, M. P.; LISTONI, F.J. P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.43, p.507-515, 1991.

LANGONI, H.; SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, n.5, p.204-209, 1998.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; FILHO, J.R.M.; BALDINI, S. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Brasil. **ARS Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 213-217, 2001.

LANGONI, H.; ARAÚJO, W. N.; VICTÓRIA, C. Contribuição ao estudo das mastites ovinas: aspectos microbiológicos. **Revista Napgama**, v. 7, n.1, p.3-6, 2004.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesq. Vet. Bras.** 31(12):1059-1065, dez. 2011.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 620-626, 2013.

LEITE, Z. T. C., VAITSMAN, D. S., DUTRA, P.B. Leite e alguns de seus derivados – da antiguidade à atualidade. **Química Nova**, 2006, v. 29, n. 4, p. 876-880.

LEITE, J. L. B.; CARVALHO, G. Brasil e o mercado internacional de lácteos. **Balde Branco**, São Paulo, a. 46, n. 549, p. 78-83, jul. 2010.

LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, [s.i], v. 2, n. 1, p. 63-76, Mar 2003.

LOPES, M. A.; DIAS A. S.; CARVALHO, F. M.; LIMA, A. L. R.; CARDOSO, M. G.; CARMO, E. A. Resultados econômicos de sistemas de produção de leite com diferentes níveis tecnológicos na região de Lavras MG nos anos de 2004 e 2005. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 252-260, jan/fev. 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J.; KYAW, C. M. **Microbiologia de Brock**. 10 ed., Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2004.

MAGALHÃES, H.; FARO, L.; CARDOSO, K.; PAZ, C.; MACHADO, P. Perdas econômicas decorrentes da contagem de células somáticas. In: *V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal*, 2004, Pirassununga. **Anais...Pirassununga**, SP, 2004.

MAGALHÃES, R. S. Habilidades sociais no mercado de leite. **RAE**, v. 47, n. 2, abr/jun., 2007

MAGALHÃES, R. S. A masculinização da produção de leite. **Revista Economia e Sociologia Rural**, vol. 47, nº 1, Brasília, jan./mar. 2009.

MARTIN, S. E.; MYERS, E.R.; LANDOLO, J. J. *Staphylococcus aureus*. In: HUI, Y.H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J.R. (Ed.). **Foodborn disease handbook – bacterial pathogens**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2001. V. 1, p. 345-381, 2001.

MARTINS, I. M. Ocorrência e avaliação do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus* isolados de derivados lácteos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (dissertação de Mestrado). Campinas, 2011.
<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000784028>. Acesso em 22 de março de 2014.

MATOS, J.S.; WHITE D.G.; HARMON, R.J.; LANGLOIS, B.E. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.1544–1549, 1991.

MELLO, Márcio Antonio; SCHMIDT, Wilson. A cadeia produtiva do leite e a agricultura familiar do Oeste de Santa Catarina: possibilidades para o desenvolvimento. **Cadernos de Economia**. Chapecó: Argos, v. 6 n.10, p. 7-30 jan./jun. 2002.

MILKPOINT, 2012a. **Top 100**.

<http://www.milkpoint.com.br/top100/final/2012/>. Acesso em 15 de setembro de 2013.

MILKPOINT, 2012b. Vacas em lactação: são elas que pagam as contas.

<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/vacas-em-lactacao-sao-elas-que-pagam-as-contas-81526n.aspx> Acesso em 15 de setembro de 2013.

MONIRI, R.; DASTEHGOLI, K.; AKRAMIAN, A. Increasing resistant coagulase negative staphylococci in bovine clinical mastitis. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.10, n.15, p.2465-2469, 2007.

MOON, J.S.; LEE, A.R.; KANG, H.M.; LEE, E.S.; KIM, M.N.; PAIK, Y.H.; PARK, Y.H.; JOO, Y.S.; KOO, H.C. Phenotypic and Genetic Antibigram of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science**, v.90 n.3, 2007.

MORENO, G.; LOPES, C. A. M.; GOTTSCHALK, A. F.; MODOLO, J. R. Incidence and characterization of mastitic bovine milk antimicrobial multi-drug resistant bacteria in middle west region of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.34, n.3, p.207-210, 1997.

MURRAY, K.; O`ROURKE, A.L.; MCLAY, J.; SIMMONDS, R. Use of ground beef model to assess the effect of the lactoperoxidase system on the growth of *Escherichia coli* O 157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in red meat. **International Journal of Food Microbiology**. v.57, p.147-158, 2000.

NADER FILHO, A; FERREIRA,L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. **Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n. 5, p.1316-1318, 2007.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. 1999. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. Natl. Mastitis Counc. Inc. , Madison, WI.

NERO, L. A.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M. M. S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão – PR. **Ciências Agrárias**, v. 24, n. 1, p. 21-26, 2003.

NETO, A. C.; LIMA, J. E. Volume de produção, preços e a decisão de comercialização informal do leite: um estudo no estado do Rio de Janeiro. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v. 8, n. 3, p. 405-410, 2006.

NICKERSON, S.C.; OWENS, W. E.; BODDIE, R.L. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. **Journal of Food Protection**, v.78, n.7, p.1607-1618, 1995.

NORMANNO, G., FIRINU, A., VIRGILIO, S., MULA, G., DAMBROSIO, A., POGGIU, A., DECASTELLI, L., MIONI, R., SCUOTA, S., BOLZONI, G., DI GIANNATALE, E., SALINETTI, A.P., LA SALANDRA, G., BARTOLI, M., ZUCCON, F., PIRINO, T., SIAS, S., PARISI, A., QUAGLIA, N.C., CELANO, G.V., 2005. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, 98, 73-79.

OLIVEIRA, J. A. V.; SCHIMIDT, V. D. B.; SCHMIDT, W. Avaliação do Potencial da Indústria de Pequeno Porte (IRPP) em Santa Catarina, EPAGRI/CEPAGRO/EMBRAPA, Florianópolis, 2000.

OLIVEIRA, J. A. V.; PREZOTTO, L. L.; VOIGT, L. Diagnóstico e Potencial das Agroindústrias Familiares do Estado do Rio Grande do Sul, Florianópolis, 2002.

OLIVEIRA, A.A.; MELO, C.B., AZEVEDO, H.C. Diagnóstico e Determinação Microbiológica da Mastite em Rebanhos Bovinos Leiteiros nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.1, p.226-230, 2009.

OLIVEIRA, A.M.; PADOVANI, C.R.; MIYA, N.T.N.; SANT'ANA, A.S.; PEREIRA, J.L. High incidence of enterotoxin D producing *Staphylococcus* spp. in Brazilian cow's raw milk and its relation with coagulase and thermonuclease enzymes. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.1, p.159-163, 2011.

OLIVEIRA, L. F. T.; SILVA, S. P. Mudanças institucionais e produção familiar na cadeia produtiva do leite no oeste catarinense. **RESR**, Piracicaba – SP, Vol. 50, n. 4, p. 705-720, Out/Dez 2012.

PAIXÃO, M. G. Caracterização de propriedades leiteiras localizadas na região do Alto Rio Grande e fatores associados à qualidade higiênico sanitária do leite no período 2011-2012. *Ciência dos Alimentos* (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2013.

PARRÉ, J. L.; SANTOS, G. T.; MASSUDA, E. M.; ALVES, A. F. Análise espacial da produção e produtividade da pecuária leiteira paranaense. In: SANTOS, G. T.; MASSUDA, E. M.; KAZAMA, D. C. S.; JOBIM, C. C.; BRANCO, A. F. (Org.) **Bovinocultura leiteira: bases zootécnicas, fisiológicas e de produção**. 1 ed. Maringá, 2010, v. 1, p. 29-46.

PARRÉ, J. L.; BÁNKUTI, S. M. S.; ZANMARIA, N. A. Perfil socio-econômico de produtores rurais de leite da região sudoeste do Paraná: um estudo a partir de diferentes níveis de produtividade. 2011.

PAULA, M. M.; KAMIMURA, Q. P.; SILVA, J. L. G. Mercados institucionais na agricultura familiar – Dificuldades e Desafios, **Revista de Política Agrícola**, ano XXIII, n. 1, jan/fev/mar, 2014.

PEREIRA, R. F. C. Práticas de gestão na agricultura familiar: um estudo com pequenos produtores de leite no município de Unaí-MG. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 179p. (Dissertação de mestrado).

PERES, JR. O leite como ferramenta do monitoramento nutricional. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

PIEPERS, S.; DE MEULEMEESTER, K.; DE AART, L.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; VLIEGHER, S.; Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. **Journal Dairy Research**, v.74, p.478-483, 2007.

PIMENTEL, F.E.; DIAS, R.S.; CARMO, L.S. Presença de *Staphylococcus* sp enterotoxigênico e de enterotoxinas em queijo ralado. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v.57, p.227-229, 2002.

PINCHUK, I.V.; BESWICK, E.J.; REYES, V.E. Staphylococcal Enterotoxins. **Toxins**, v.2, p.2177-2197, 2010.

PINHO, M. G.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Na acquired and a native penicilin-binding protein cooperate em building the cell wall of drug-resistant staphylococci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10886-10891, Set 2001.

PINTO, B.; CHENOLL, E.; AZNAR R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 28, p.340–352, 2005.

PINTO, J. P. A. N.; IZIDORO, T. B. Qualidade do leite: A Instrução Normativa n.º51/MAPA e os novos paradigmas. **Higiene Alimentar**, [S/I], v.21, n.156, p.14-16, 2007.

PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYO, S.; LA, RA; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine mastitis in Finland 2001 – Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Sciences**, v.87, p.2433-2441, 2004.

PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 9, n. 1, p, 118-132, 2002.

PROGRAMA NACIONAL DE MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE (PNQL). Baixa competitividade do leite cru brasileiro. **Jornal da Produção de Leite PDPL/RV**, v.10, n.111, 1998. Disponível em: http://www.ufv.br/pdpl/jornal/jpl0598_a.htm. Acesso em: 23 de janeiro de 2012.

PONCHIO, L.A.; GOMES, A.L.; PAZ, E. Perspectivas de consumo do leite no Brasil. Reportagem de julho de 2005. Disponível em <<http://www.cepea.esalq.usp.br>> Acesso em: 23 de janeiro de 2012.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GRASSI, T. L. M.; AVANÇO, S. V.; LIMA, L. K. F. Capacitação de produtores rurais para a melhoria da qualidade do leite cru produzido na região de Araçatuba – SP. **Rev. Ciênc. Ext.** v.7, n.1, p.91, 2011.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre, Brasil, 2005.

RABELLO, R.F. Susceptibilidade aos antimicrobianos e diversidade genética de amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isoladas de casos de mastite subclínica no Estado do Rio de Janeiro. 2003. 100p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

RABELLO, R. F.; SOUZA, C. R. V. M.; DUARTE, R. S. R.; LOPES, M. M.; TEIXEIRA, L. M.; CASTRO, A. C. D. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Dairy Sciences**, v.88, p.3211-3219, 2005.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine**, 10 ed. Saunders Elsevier, 2156 p., 2007.

RESENDE, J. C. Determinantes de lucratividade em fazendas leiteiras de Minas Gerais. 2010. 144p. **Tese (Doutorado em produção animal)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: ANDRADE, S.F. (Ed). **Manual de terapêutica Veterinária**. 3.ed. Roca: São Paulo, p.759-771, 2008.

RIBEIRO, M.G.; GERALDO, J.S.; LANGONI, H.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; SALERNO, T.; FERNANDES, M.C. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.1, p.52-58, 2009.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

RODRIGUES, M. H. S.; SOUZA, M. P.; RODRÍGUEZ, T. D. M; AGUIAR, I. S.; RODRIGUES, E. F. S. Análise de eficiência dos produtores de leite do município de Rolim Moura, no estado de Rondônia. **Gestão & Regionalidade**, Vol. 27, n. 79, 2011

RUEGG, P. Relationship between bulk tank milk somatic cell count and antibiotic residues. **NMC Annual Meeting Proceedings**, p.28-35, 2005.

RUSSI. L. S., ROSA M. S., BARBALHO P. C., COSTA-E-SILVA E. V., ZUCCARI C. E. S. N. Etologia aplicada em bovinos, **Revista de Etologia**, Vol.10, Nº1, 45-53. 2011.

RYSER, E. T. Microorganisms of importance in raw milk. In MEMÓRIAS DEL CONGRESO PANAMERICANO DE CONTROL DE MASTITIS Y CALIDAD DE LA LECHE, 1., 1998, Mérida. **Anais... Mérida**, 1998. p.236-239.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.S.R.S.; E LIAS, A.O.; VICTORIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.41, n.5, p.321-326, 2004.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite, 1ª Ed., Barueri: Manole, 2007. 314p.

SANTOS, N.W.; WEIRICH NETO, P.H.; LODDI, M.M.; ROCHA, C.H. Tecnologia desmistificada como base de extensão rural. **Revista Conexão UEPG**, Ed.5, n.1, p.70-74, 2009.

SCHALM, O. W., NOORLANDER, D. O. Experimental and observation leading to development of California mastitis test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.139, p. 199-204, 1957.

SCOT CONSULTORIA. Informalidade no mercado do leite. Disponível em: <<https://www.scotconsultoria.com.br/leite/mercado-leite/165/informalidade-no-mercado-do-leite.htm>>. Acesso em 15 de janeiro de 2014.

SEEGERS, H.;FOURICHON,C.; BEAUDEAU,F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, v.34, p.475-491, 2003.

SENA, M.J. Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife - PE. 75p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SIEGEL, J.D.; RHINEHART, E.; JACKSON, M.; CHIARELLO, L. Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings, 2006. Disponível em: (<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroGuideline2006.pdf>). Acesso em 14 de agosto de 2013.

SILVA, J. A.; TSUKAMOTO, R. Y. A modernização da pecuária leiteira e a exclusão do pequeno produtor. **Geografia**, Londrina, v. 10, n. 2, p. 147-162, jul/dez. 2001.

SILVA, E.R.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v.106, p.103-107, 2005.

SIQUEIRA, A. K. Indicadores de qualidade, pesquisa de marcadores de virulência e multirresistência aos antimicrobianos em estirpes de *Staphylococcus* spp em leite do origem bovina produzido no sistema orgânico. (Tese de Doutorado). **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2011.

SIQUEIRA, K. B., PINHA L. C. Vantagens comparativas reveladas e o contexto do Brasil no comércio internacional de lácteos. **Informações Econômicas, SP**, v.42, n.3, maio/junho, 2012.

SMYTH, C.I.; SMYTH, D.A.; KENNEDY, J.; TWOHIG, J.; BOLTON, D. Staphylococcus aureus: from man or animals – an enterotoxin iceberg? In: International Eu-Rain Conference, **Food Pathogens Epidemiology: Microbes, Maladies and Methods**, 2004, Padua. Proceedings...Padua, 2004, pp. 85–102.

SORIANO, J. M.; FRONT, G.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 60-67, Feb. 2002.

SOUZA, V.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; CERESER, N. D. Características microbiológicas de amostras de leite de tanque comunitário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.758-761, 2009a.

SOUZA, G. N., BRITO, J. R. F., MOREIRA, E. C., BRITO, M. A. V. P., SILVA, M. V. G. B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1015-1020, 2009b.

SOUZA, M.P.; SOUZA FILHO, T.A.; MULLER, C.A.S.; SOUZA, D.B. Costs of production in rural milk producing units: evaluation of management and productivity. **Custos e agronegócio on line**, v. 7, n. 1, jan-apr, 2011.

SPERO, L.; MORLOCK, B.A.; METZGER, J.F. On the cross-reactivity of staphylococcal enterotoxins A, B e C1. **The Journal of Immunology**, v.120, n.1, p.86-89, 1978.

STÖHR, K.; WEGENER, H. C. Non-human antibiotic use and resistance. **Drugs Resistance Updates**, v.3, p.2007-2009, 2001.

TAFFAREL, L. E.; COSTA, P. B.; TSUTSUMI, C.; TODERO, E. J.; CARVILHÃO, C.; PIRES, S. C. Manutenção de ordenhadeiras em propriedades familiares do oeste do Paraná. **UDESC em ação**. V. 6, n.1, 2012. <http://www.revistas.udesc.br/index.php/udescemacao/article/view/2463> (Acesso em 04/02/14).

TANABE, T.; SATO, H.; WATANABE, K.; HIRANO, M.; HIROSE, K.; KUROKAWA, S.; NAKANO, K.; SAITO, H.; MAEHARA, N. Correlation between occurrence of exudative epidermitis and exfoliative toxin-producing ability of *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 48, n. 1-2, p. 9-17, Jan, 1996.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 281-301, 2000.

TENHAGEN, B. A.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.2542–2551. 2006.

TESTA, V. M.; NADAL, R.; MIOR, L. C.; BALDISSERA, I. T.; CORTINA, N. O desenvolvimento sustentável do Oeste Catarinense: (Proposta para discussão). Florianópolis: **EPAGRI**, p. 247, 1996.

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, n. 9-10, p. 755-763, Nov 1999.

TOLEDO, P.; ANDRÉN, A.; BJÖRCK, L. Composition of raw milk from sustainable production systems. **Int. Dairy J.**, 2001. Disponível em: <<http://organic-research.com/update/ou082002.asp>> Acesso em 23/10/13.

TOZZETI, D.S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – Revisão de Literatura. **Rev. Cien. Elet. Med. Vet.**, v. 10, 2008.

VARGAS, D. P.; NORBERG, J. L.; MELLO, R. O.; SHEIBLER, R. B.; MILANI, M. P.; MELLO, F. C. B. Correlações entre contagem bacteriana total e parâmetros de qualidade do leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. Vol. 20, n. 4, p. 241-247, Out/Dez. 2013.

VASIL, M. Aetiology of mastites and enterotoxin production by *Staphylococcus* sp. Isolated from milk of two sheep herds. **Slovak J. Anim. Sci.**, 40, 2007, 4

VIANA, G., RINALDI, R. N., CALEGARIO, L., & LELIS, C. Main factors influencing the performance of productive chain milk – a study with milk producers of Laranjeiras do Sul town-PR, 2010.

VINTOV, J.; AARESTRUP, F. M.; ZINN, C. E.; OLSEN, J. E. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. **Veterinary Microbiology**, v.95, p.133-147, 2003.

WILKINSON, J. A agricultura familiar ante o novo padrão de competitividade do sistema agroalimentar na América Latina. **VII Congresso Internacional da Associação Latino-americana e caribenha de economia agrícola**, Lima, 2003.

WITTE, W. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, n. 4, p. 321-325, Maio 2000.

ZAFALON, L.F.; AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e *Estafilococos* Coagulase Positivos e Negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. **Revista Nappama**, n.6, p.4-6, 1999.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus* custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.577-585, 2007.

ZOCCAL, R.; SOUZA, A. D.; GOMES, A. T.; LEITE, J. L. B. Produção de leite na agricultura familiar. 2004. Disponível em <http://www.sober.org.br/palestra/12/09O433.pdf> Acesso em 15 de setembro de 2013.

ZOLI, J.A.; NEGRETE, I.R.A.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Avaliação da contaminação por *S. aureus* e *Salmonella* spp. de maionese de batata comercializada em Londrina, PR. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.95, p.62-70, 2002.

Trabalho científico

8. Trabalho científico

8.1. Instruções aos autores

Artigos redigidos de acordo com as normas do período científico “Pesquisa Veterinária Brasileira”:

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (Short communications) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (page charge) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS,

RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes,

expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a

palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em

conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

8.2. PERFIL SOCIOECONÔMICO E INDICADORES DE QUALIDADE DO LEITE BOVINO EM PROPRIEDADES DA AGRICULTURA FAMILIAR DE BOTUCATU, SP¹

Ubirajara L. Lavor², Anelise Salina², Gabriella K. González³ e Helio Langoni^{4*}

ABSTRACT.- Lavor U.L., Guimarães F.F., Manzi M.P., Salina A., Mioni M. S. R. & Langoni H. 2014 [**Socioeconomic profile and milk quality indicators from cows on family farms properties from Botucatu, SP.**] Perfil socioeconômico e indicadores de qualidade do leite em propriedades de agricultura familiar de Botucatu, SP. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP 18618-970, Brazil. E-mail: hlangoni@fmvz.unesp.br

Dairy farming on family farms is critical for survival and maintenance of the rural worker. This study evaluated the quality of the milk from the family farm (production lower than 100 liters of milk per day) in the region of Botucatu-SP and the difficulties faced by producers. Also aimed the recommendation of possible actions to improve the production, seeking the quality of the milk. A Socioeconomic questionnaire was applied to producers and individual milk samples were collected from the set of brasses of each property. It was evaluated the levels of fat, protein, lactose, dried extract and nonfat dry extract, the total bacterial count (TBC) and the somatic cell count (SCC). Twenty one (21) small properties were analyzed where it was found that the average of the farmers was 59 years. Only five of them (23.8%) had completed high school or higher, and none (0%) counted on veterinary advice. As for their facilities of milking parlor, only four (19.0%) had stables with concreted floor and four (19.0%) used mechanical milking system, that caused injuries to teats ostium. As to the handling, only one (4.8%) performed pre-dipping correctly, none (0%) performed post-dipping, two (9.5%) used disposable paper for milking and only two producers (9.5%) used the CMT with periodicity. On the other hand, 15 producers (71.4%) stated that they used anti mastitis for treating the cows. The CBT of all properties presented an average of 505 x 10³ colony forming units (CFU) / mL of milk. The CCS average of all properties was 364 x 10³ CS / mL. The physicochemical analysis revealed averages of 3.4% of fat, 3.5% of protein, 4.5% of lactose, 12.3% of total solids and 8.9% of nonfat dry extract. It was noticed that there was a lack of basic and technical knowledge of the dairy family farmers. The precarious structure, the lack of material and technological investments and veterinary advice impair productivity of man in the field. Health education activities are required to obtain hygienic milk, mastitis control and milk production of better quality.

INDEX TERMS: Family farms, socioeconomic profile, milk quality

RESUMO.- A atividade leiteira na agricultura familiar é fundamental para sobrevivência e manutenção do homem no campo. O presente estudo avaliou a qualidade do leite proveniente da agricultura familiar (produção inferior a 100 litros diários de leite) na região de Botucatu-SP e as dificuldades enfrentadas pelos produtores. Objetivou também a recomendação de possíveis ações para melhoria na produção, visando a qualidade do leite. Aplicou-se um questionário socioeconômico aos produtores e foram coletadas amostras individuais do leite do conjunto de latões de cada propriedade. Avaliou-se os teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco, extrato seco desengordurado, a contagem bacteriana total (CBT), e a contagem de células somáticas (CCS). Foram analisadas 21 pequenas propriedades onde constatou-se que a idade média dos produtores era de 59 anos. Apenas cinco deles (23,8%) tinham ensino médio completo ou superior, sendo que nenhum (0%) contava com assessoria veterinária. Quanto às instalações da sala de ordenha, apenas quatro (19,0%) possuíam estábulos com piso concretado e quatro (19,0%) utilizavam sistema de ordenha mecânica, que provocou lesão nos óstios dos tetos. Quanto ao manejo, apenas um (4,8%) realizava pré-dipping corretamente, nenhum (0%) realizava pós-dipping, dois (9,5%) utilizavam papel descartável na ordenha e somente dois produtores (9,5%) utilizavam o CMT com periodicidade. Em contrapartida, 15 produtores (71,4%) revelaram terem utilizado antimastíticos para tratamento das vacas. A CBT de todas as propriedades apresentou média de 505 x 10³ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL de leite. A CCS média das propriedades foi de 364 x 10³ CS/mL. As análises físico-químicas revelaram médias de 3,4% de gordura, 3,5 % de proteínas, 4,5% de lactose, 12,3% de sólidos totais e 8,9% de extrato seco desengordurado. Observou-se falta de conhecimento básico e técnico dos produtores leiteiros da agricultura familiar. A estrutura precária, a falta de investimentos materiais e tecnológicos e de assessoria veterinária prejudica a produtividade do homem no campo. Atividades de educação sanitária são necessárias para a obtenção higiênica do leite, controle de mastites, e produção de leite de melhor qualidade.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Pós-Graduandos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-970, Brasil.

³ Médica Veterinária Autônoma, Estrada da Manga, n° 32-03, Loteam. Éden Leste, São José do Rio Preto, SP 15062-386, Brasil.

⁴ Docente do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ-Unesp, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-970. *Autor para correspondência: hlangoni@fmvz.unesp.br

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Agricultura familiar, perfil socioeconômico, qualidade do leite.

INTRODUÇÃO

A atividade leiteira é responsável pela geração de quase quatro milhões de empregos diretos e é importante fonte de renda para diferentes segmentos produtivos. Além da importância econômica, a cadeia do leite tem destacada função social, pois gera renda para grande número de produtores rurais, contribui para a absorção de mão-de-obra e proporciona a fixação do homem no campo (Gomes et al. 2001).

Apesar de inúmeras propriedades atuarem profissionalmente na atividade, chegando a produzir 50 mil litros de leite diários, dos 1,3 milhão de produtores contabilizados no país, cerca de 85% podem ser classificados como pequenos criadores ou de agricultura familiar. Com produção diária variando entre 50 a 100 litros, este grupo caracteriza-se pela baixa tecnificação, deficiência no manejo, falta de controle sanitário, inadequadas condições higiênicas de ordenha, precário sistema de armazenamento e transporte do leite (Zoccal et al. 2004; Milkpoint 2012).

Este cenário contribui para a baixa produtividade do rebanho leiteiro, acarreta perdas de competitividade e prejudica a consolidação do setor nacional na economia mundial. Enquanto no Brasil a produção anual média de uma vaca é de aproximadamente 1,3 mil quilos de leite, nos principais países produtores e exportadores do produto, como Israel e Nova Zelândia, esta média chega a nove mil kg/vaca/ano (Magalhães et al. 2004; Ponchio et al. 2005; Embrapa Gado de Leite 2007).

Apesar da dificuldade de inserção nesse recente ambiente competitivo, foi estimado no ano de 2006 que, do valor aproximado de R\$ 6,7 bilhões movimentados pela atividade leiteira no país, 59% foi oriundo da participação da agricultura familiar no segmento, enquanto os 41% restantes vieram dos grupos empresariais (Camargos 2003).

A existência de alternativas organizacionais, como associações e cooperativas, contribuiu no sinergismo operacional e econômico, permitindo a incorporação de novas tecnologias por pequenos produtores rurais. O desenvolvimento de valores associados à pequena produção agrícola com combinação de conteúdos ambientais – sistemas agroecológicos e orgânicos – e sociais também proporcionam maior força mercadológica aos produtos ofertados ao consumidor (Wilkinson 2003; Jank Junior 2009).

O incremento de políticas públicas, como destacado por Paula et al. (2014), corroboraram para a inserção da agricultura familiar no mercado institucional de produtos alimentícios. O Programa de Aquisição de Alimentos (PAA) e o Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE) são exemplos dessa aproximação entre produção e consumo, que aliam o incentivo à produção de base familiar com melhoria nos aspectos nutricionais dos consumidores (Brasil 2009).

Outro aspecto importante refere-se à qualidade do produto. O leite de boa qualidade é obtido quando provém de vacas sadias e limpas, ordenhadas em ambiente lavado, com mãos e/ou equipamentos higienizados e, imediatamente após a ordenha seja armazenado em reservatório inócuo e resfriado. Deve apresentar ausência de micro-organismos patogênicos, resíduos químicos e medicamentosos, baixa contagem bacteriana e de células somáticas, sabor agradável e alto valor nutritivo. A obtenção higiênica do leite, além de impactar diretamente na qualidade do produto, aumenta a produtividade do rebanho como um todo pela diminuição da prevalência das infecções intramamárias – mastites –, resultando em ganhos econômicos diretos e indiretos para o produtor rural (Langoni et al. 2011).

A baixa qualidade do leite cru produzido no território nacional é notória e o beneficiamento resulta em produtos de qualidade insatisfatória e com menores tempos de prateleira (Beloti et al. 1999; Rocha et al. 2006).

Além do controle da mastite nos rebanhos, muitos esforços vem sendo empregados para melhorar a qualidade do leite e garantir um alimento seguro e de alto valor nutricional (Langoni et al. 2011). O estabelecimento de legislações voltadas ao desenvolvimento da cadeia leiteira a partir da instituição do PNMQL foi o principal deles.

Apesar de positiva, a normatização pressionou os produtores de leite, principalmente de agricultura familiar, a buscarem a modernização. Em alguns casos, como observado nesta pesquisa, foram instituídas parcerias entre produtores e os laticínios, que possibilitaram a aquisição de tanques comunitários e de outras benfeitorias necessárias ao exercício da atividade leiteira. Porém na grande parte, a baixa organização do setor aliada à escassez de recursos para investimento, dificulta ou inviabiliza a manutenção dos pequenos produtores na atividade.

Pela impossibilidade de atender às pressões impostas pelo mercado ou desmotivação decorrente da pouca consolidação das políticas públicas no setor leiteiro um número elevado de produtores de leite acabam aderindo ao mercado informal. Valendo-se do risco da ilegalidade, este produtor consegue agregar à sua produção parte da renda que seria apropriada pelos intermediários (Silva e Tsukamoto 2001).

Segundo dados obtidos entre 1998 e 2001 pelo IBGE (2010), de 35,6 a 42% do leite produzido no país não foi inspecionado por nenhum órgão oficial de fiscalização. Como consequência, este leite comercializado de maneira informal expõe os consumidores a maiores riscos potenciais, com sérias implicações na saúde pública.

Já em relação ao mercado formal, o principal produto do mercado interno brasileiro (35% da produção anual de 30 bilhões de litros) é comercializado sob a forma fluida. O leite Longa Vida, ou UHT (*Ultra High*

Temperature) representa mais de 80% deste segmento. Há expectativas de maior crescimento, principalmente nos grandes centros urbanos, onde as famílias dedicam tempo cada vez menor à preparação de refeições e idas ao supermercado (Gomes et al. 2001).

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo caracterizar o perfil socioeconômico de pequenos produtores de leite bovino e realizar avaliação de qualidade do produto, no município de Botucatu, SP. Foi realizada visitas técnicas e aplicação de questionários, além de análises físico-químicas, CCS e CBT de amostras de leite obtidas em cada propriedade. A orientação aos produtores para a obtenção higiênica do leite, controle de mastites, com conseqüente melhoria de qualidade do leite também foi considerado objetivo nesse estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises microbiológicas e contagem de células somáticas foram realizados no Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites (NUPEMAS) do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Campus de Botucatu, SP. As análises físico-químicas foram realizadas pela Clínica do Leite da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ – Campus de Piracicaba, SP.

Seleção das propriedades. Foi realizada com base no volume de produção leiteira, que deveria ser obrigatoriamente igual ou inferior a 100 litros diários. Totalizaram-se no estudo 21 propriedades familiares que possuíam características muito semelhantes em relação à raça, número e manejo dos animais, pertencentes a uma associação rural fornecedora de leite a um laticínio da região de Botucatu, SP.

Questionário social, técnico e produtivo. As aplicações de questionário socioeconômico foram realizadas no período entre março a julho do ano de 2012. Foram realizadas coletas padrão de dados com o objetivo de traçar o perfil dos produtores, sendo abordados os seguintes itens: idade, escolaridade e participação familiar na atividade; área da propriedade e importância econômica da produção; infraestrutura e condições de higiene das instalações e equipamentos de ordenha; número de vacas em lactação e no período seco; raça predominante e produção média de leite; variação anual da produção; manejo dos animais (fornecimento de ração, tipo e número de ordenhas, uso de pré e pós-dipping, método de secagem, bezerro ao pé, dados de produção); controle de mastites (detecção da infecção, tratamentos); assistência veterinária (serviço público ou privado); tipo e manejo de pastagem; cuidados na aquisição de animais. Além das observações realizadas *in loco* no acompanhamento dos procedimentos de ordenha, foi realizada colheita de dados e de amostras de leite para análise laboratorial, durante as visitas realizadas a cada propriedade rural.

Escore dos tetos. Dentro de cada propriedade, todas as vacas lactantes, aparentemente sadias, tiveram os tetos avaliados segundo o aspecto dos esfíncteres, de acordo com os escores estabelecidos por Ruegg (2005)

Coleta de material. Foram coletadas amostras do conjunto dos latões das propriedades com objetivo de realizar as seguintes provas:

- a) Análise físico-química: as técnicas e interpretações dos resultados seguiram o preconizado pela IN nº 68 (BRASIL, 2006); foram avaliados os seguintes índices: teor de gordura, teor de proteína e sólidos totais;
- b) CBT: as técnicas seguiram o preconizado pela IN nº 62 (BRASIL, 2011). A amostra pura do leite deu origem a diluições decimais, empregando-se a solução salina (0,85%) estéril, em seguida foram transferidos para placas de Petri estéreis 1,0 mL de cada diluição, vertendo-se cerca de 15 a 20 mL de ágar contagem padrão (Merck – Cód. 1.05463), previamente fundido e aquecido a 45°C. Após homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas em estufa a 32°C por 48 horas, sendo então realizada a contagem de colônias. O número de colônias foi multiplicado pelo fator de diluição correspondente, resultando no número de micro-organismos mesófilos por mL de leite. Além desta contagem foram realizadas culturas após diluição 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , em placas de ágar sangue ovino (8%) e ágar MacConkey para a caracterização da microbiota presente em cada propriedade.
- c) Contagem de células somáticas do leite dos latões: colhidas em frasco plástico contendo conservante celular bronopol (BERTRAND, 1996), sendo realizada em equipamento Somacount 300® (Bentley, UK) por citometria de fluxo.

Análise estatística. Estatísticas descritivas foram produzidas para caracterizar as propriedades e descrever as variáveis estudadas; modelos de regressão logística e modelos mistos lineares foram usados para associar a média dos indicadores de qualidade do leite (CCS, CBT, características físico-químicas) no conjunto de latões de cada propriedade à diferentes práticas de manejo e estrutura das propriedades.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil dos pequenos produtores

Foi realizado levantamento dos membros da “Associação dos Produtores Rurais da Baixada Serrana de Botucatu”, pelo qual foi obtida listagem de 33 produtores de leite que abasteciam o tanque de expansão comunitário localizado no bairro botucatuense “Santo Antônio de Sorocaba”.

A produção diária superior a 100 litros foi fator de corte para realização da pesquisa laboratorial, excluindo quatro produtores rurais da pesquisa. Durante a coleta de dados a campo, período com cinco meses de duração, foi constatado que seis pequenos produtores abandonaram a atividade leiteira, e outros dois

produtores optaram por não participar do estudo. Por fim, o questionário foi aplicado a 25 produtores, mas a avaliação estrutural, dos procedimentos e a coleta de amostras, inerentes ao estudo proposto, totalizou 21 participantes.

Os produtores apresentaram idades que variam entre 40 a 84 anos de idade e a média calculada foi de 59 anos. Quanto ao tempo em que estavam envolvidos na atividade leiteira, 15 (71,4%) declararam período superior a 15 anos, evidenciando o caráter familiar da produção. No entanto, grande parte, apesar de se dedicarem à produção leiteira há bastante tempo, se mantém na atividade por subsistência.

No presente estudo, foi evidente o baixo nível de escolaridade dos produtores da agricultura familiar. Apenas cinco (23,8%) produtores completaram ou foram além do nível médio enquanto o grupo restante, formado por 16 (76,2%) indivíduos, nem sequer completou o ensino médio.

Em termos gerais, durante as visitas técnicas realizadas no presente estudo, os produtores de menor faixa etária foram mais participativos e interessados frente às orientações técnicas fornecidas após o fim da ordenha. Outra dificuldade observada, referente à baixa escolarização dos produtores, foi a elaboração de material informativo no qual fosse possível o entendimento dos resultados obtidos em cada propriedade. Esses fatos demonstram o quão grande são as dificuldades para implementar e executar programas de capacitação técnica.

Apesar de a maioria possuir dois filhos ou mais (média = 2,5 filhos), em somente duas propriedades (9,5%) foi observada a participação dos descendentes na atividade. Importante ressaltar que a totalidade dos produtores com filhos declararam que os mesmos freqüentam ou freqüentaram a escola. Os produtores declararam ainda que os filhos mais velhos migraram, em sua maioria, para a zona urbana na busca por aprimoramento profissional ou melhores oportunidades de renda.

Quanto ao futuro a curto e médio prazo, apenas três produtores (14,3%) declararam a pretensão de investir na atividade. Nota-se que estes possuem idade abaixo da média geral, dos quais dois produtores estão a menos de cinco anos na atividade leiteira

O abandono da atividade, observado em seis propriedades neste estudo, concorda com as tendências apontadas por Oliveira & Silva (2012) de que, em virtude da implantação da IN nº 51, haveria restrições para a participação não especializada e de baixa escala, levando à exclusão de muitos agricultores a médio e longo prazo.

A análise do questionário revelou, ainda, que todos os pequenos produtores visitados possuíam energia elétrica. Em relação à moradia, apenas dois (9,5%) produtores declararam que não residiam efetivamente na propriedade rural e realizavam visitas semanais ao local, contratando mão-de-obra local para exercer a produção leiteira.

O abastecimento de água das propriedades era proveniente de mina d' água ou poço artesiano, com exceção de 1 (4,8%) produtor que fazia a captação pela rede hídrica da SABESP. Nenhum dos proprietários realizava acompanhamento periódico da qualidade da água utilizada. Havia sistema de coleta de lixo municipal em apenas nove deles (42,9%), enquanto o restante declarou que realizava a queima dos resíduos sólidos.

A atividade leiteira foi declarada a principal fonte de renda por 16 produtores (76,2%). Outros três (14,3%) declararam que a aposentadoria constituía o rendimento mais importante e a produção de leite um complemento financeiro. Apenas dois produtores (9,5%) apontaram outras atividades econômicas – arrendamento de parte da propriedade e bovinocultura de corte – como a principal fonte de sustento.

Neto & Lima (2006) avaliaram que a comercialização informal é uma alternativa para pequenos produtores obterem melhor preço pelo produto. Foi constatado que pelo menos 5 (23,8%) produtores recorrem com constância ao comércio informal, via venda direta ao consumidor final de leite ou queijos, na tentativa de agregar valor a produção e obter maior ganho financeiro.

Em relação à mão-de-obra utilizada durante os procedimentos de ordenha, 16 (76,2%) delas eram estritamente familiares enquanto em duas (9,5%) propriedades foi observado mão-de-obra familiar trabalhando em conjunto com mão-de-obra contratada. Em apenas 3 (14,3%) propriedades a ordenha era realizada somente por funcionários contratados.

Foi também abordada a participação das mulheres na atividade. E em apenas uma (4,8%) propriedade rural o gerenciamento era de responsabilidade feminina. Em outras 5 (23,8%) propriedades foi observada a participação da mulher no auxílio aos procedimentos de ordenha.

A conjunção dos dados obtidos mediante aplicação do questionário com os observados *in loco* durante a realização das coletas realizadas permitiram a caracterização das propriedades sob aspectos técnico-econômicos.

Para ser definida como uma pequena propriedade o imóvel rural deve ocupar de 1 a 4 módulos fiscais de área, o valor deste é fixado pelo município, particularmente em Botucatu corresponde a 20 hectares (ha). No presente estudo 19 (90,5%) propriedades foram classificadas como pequenas, enquanto duas (9,5%) são consideradas médias propriedades.

O questionário revelou que a média da área total das propriedades foi igual a 34 hectares, enquanto para a atividade leiteira foi de 27,4 ha. Constatou-se, também, que 17 (81,0%) produtores utilizam mais de 80% da área total da propriedade para a produção leiteira. Durante as visitas nas propriedades não foi evidenciada

exploração comercial de nenhuma outra espécie animal, sendo constatadas apenas algumas criações de aves e suínos para consumo familiar.

Quanto à produtividade, a melhor relação entre área destinada ao leite e volume produzido foi 5,8 L/ha. A média deste indicador foi de 2,5 L/ha e, neste sentido, é possível afirmar que há um imenso potencial produtivo a ser desenvolvido na região.

Em relação ao número de animais foi constatada grande variação, não sendo este valor diretamente proporcional à área disponível para a atividade nem com a média de produção diária de leite, que foi de 47,8 L/propriedade. A média diária de produção por animal foi de 4,4 L/vaca, valor muito abaixo do desejável.

Outro aspecto preocupante foi a relação entre o número de vacas em lactação e as secas. Enquanto a literatura preconiza valores próximos a 85%, no presente estudo este índice médio foi de 68,3% (Milkpoint 2012b).

O rebanho leiteiro, em sua maioria, era constituído por cruzamento de holandês-zebu, mas foi possível observar em algumas propriedades a presença da vacas da raça nelore, de aptidão para corte. Apenas uma propriedade apresentou rebanho com valor genético apurado, da raça jersey. Entretanto, a produção média diária da mesma não se mostrou significativamente maior, fato explicado pela necessidade de alimentação de alto valor nutricional para incrementar o volume de leite produzido.

Quanto à estrutura física e equipamentos utilizados para a realização da ordenha foi constatado grande precariedade. Em 5 (23,8%) propriedades os procedimentos ocorriam a céu aberto, enquanto em 15 (71,4%) não havia piso de concreto. Não foi observado nenhum sistema adequado de abastecimento de água para higienização do ambiente, utensílios e dos tetos dos animais apesar de cinco propriedades (23,8%) apresentarem ponto de água próximo ao local da ordenha.

Durante a ordenha, alguns produtores forneciam uma pequena quantidade de concentrado com o objetivo principal de facilitar o manejo dos animais. Foi evidenciado também o fornecimento de cama de frango – proibido pela IN nº 08 do MAPA (Brasil 2003) – prática perigosa devido aos riscos de transmissão da encefalopatia espongiforme bovina (“vaca louca”) e do botulismo, que se comprovada por órgãos de defesa pode acarretar em multa e no abate sanitário de todo rebanho.

O acompanhamento dos procedimentos revelou que o pré-dipping é um procedimento pouco utilizado pelos produtores. Em geral, o ordenhador faz a retirada mecânica do excesso de sujidades dos tetos, ofertando-os em seguida ao bezerro. Tal prática favorece a liberação de ocitocina e conseqüente descida do leite para a cisterna da glândula mamária, facilitando a ordenha.

Apenas 1 (4,8%) produtor limpava os tetos com solução desinfetante e realizava a secagem com papel toalha descartável, enquanto oito (38,1%) produtores adotavam alguma medida de higiene, mesmo que de forma equivocada. O restante (57,1%) não adotava nenhum procedimento antes do início da ordenha. Quanto ao procedimento de pós-dipping, não foi observada adoção por nenhum produtor. Ao final da ordenha o bezerro era desatado da vaca e, instintivamente, buscava os tetos, succionando o leite residual do úbere.

Foram poucos os indícios da busca por tecnificação dos pequenos produtores de leite, a mecanização da ordenha foi observada, no presente estudo, em apenas 4 (19,0%) propriedades, nas quais o sistema era o balde ao pé. Foi evidente também a precariedade nos procedimentos de limpeza e higienização da ordenhadeira, assim como foi relatado que estes equipamentos nunca haviam sido submetidos a manutenções especializadas e/ou calibrações dos sistemas de vácuo.

Para a realização de um adequada ordenha mecanizada são necessários diversos cuidados: secagem apropriada dos tetos para evitar o deslizamento das teteiras; não deixar que ocorra a entrada de ar e conseqüente flutuações de vácuo; rotina bem estabelecida para aproveitar o efeito da ocitocina; evitar a sobreordenha e preversar o esfíncter do teto (Santos & Fonseca 2007).

Nos percentuais obtidos da avaliação do escore dos tetos percebeu-se maiores valores nas propriedades com sistema mecanizado de ordenha. O teste Qui-quadrado revelou associação significativa entre o tipo de ordenha e o escore do teto, que indicou má utilização desta tecnologia pelos pequenos produtores de leite.

Todos os produtores visitados ordenhavam os animais uma vez por dia, no período da manhã e armazenavam o leite em latões até a entrega na sede da associação dos produtores, onde é localizado o tanque de expansão comunitário. Neste local, o produto sofria resfriamento térmico, e era armazenado sob temperatura aproximada de 4°C, até o momento da coleta granelizada, que ocorria a cada 48 horas.

A distância do trajeto das propriedades até o tanque variou de 1,5 até 29 quilômetros e era realizada por automotores ou até mesmo cavalo. Quanto ao tempo decorrido do fim do procedimento de ordenha até o início da refrigeração, constatou-se variação de 15 minutos até 4,5 horas, fato que influi diretamente na qualidade final do produto e contraria normativa federal que determina intervalo máximo de três horas (Brasil 2011).

Outra importante constatação foi o fato de nenhum produtor possuir levantamento ou registro de dados zootécnicos dos animais e da produção como: datas de partos, dias em lactação, diagnósticos de mastite, aplicação de tratamentos, produção diária por animal, entre outros. O único registro disponível é o volume diário entregue ao laticínio, que é fornecido no momento da entrega do leite na associação.

A grande maioria dos produtores também declarou grande sazonalidade da produção de leite. A produção de silagem, fundamental para que no período seco – do mês de maio até novembro – o volume de leite produzido pelas vacas não diminua de maneira drástica, não era realizada em nenhuma propriedade.

A abordagem sobre o manejo sanitário revelou que 14 (66,7%) produtores faziam uso rotineiro de ivermectina para controle de endo e ectoparasitas no rebanho. Todos relataram também a vacinação para febre aftosa. Entretanto, a imunoprofilaxia contra a brucelose, raiva e o carbúnculo sintomático foi de 57,1%, 33,3% e 9,5%, respectivamente.

Quanto à realização da secagem dos animais para o período seco, nenhum produtor relatou a utilização da terapia da vaca seca. Do total, 16 (76,1%) produtores declararam que realizam a secagem gradual, ordenhando em dias alternados e cada vez mais espaçados, até que a glândula mamária não produza mais leite. Este procedimento afeta na qualidade de leite obtida do rebanho, pois a terapia da vaca seca é uma importante ferramenta para o controle e prevenção de mastites (Langoni 2013).

Foi verificada grande comercialização de animais entre os produtores associados e produtores de outras regiões, mas não foi relatado, por nenhum proprietário, a aplicação de quarentena ou qualquer outro teste diagnóstico prévio para evitar a possível introdução de novos agentes de doenças infectocontagiosas nos rebanhos.

Nenhum produtor teve acesso aos serviços de assistência veterinária, público ou privado, nos últimos seis meses anteriores ao inquérito. Isso revela que as dificuldades dos produtores da agricultura familiar vão além dos problemas estruturais. A falta de acesso a profissionais capacitados e da continuidade de programas de educação sanitária no campo dificultam a ocorrência de melhorias concretas no manejo sanitário e na produção de leite.

Todos eles adotavam o sistema de produção à pasto, porém não foi relatado ou evidenciado nenhum tipo de manejo ou adubação do solo, bem como a aplicação de técnicas de rotação de pastagem com o objetivo de melhorar o suporte nutricional oferecido aos animais.

Foi relatada a realização de dias de campo e palestras coordenadas pela FMVZ – Unesp / Botucatu, SP, e pela Secretaria de Agricultura do Município de Botucatu, mas segundo os próprios produtores associados a adesão era sempre baixa.

Assim como observado em diversos estudos, os produtores de leite da agricultura familiar se mantêm no setor por tradição e não possuem uma boa organização de classe, sendo evidentes baixo número e apuração genética dos animais, pouco ou nenhum conhecimento de boas práticas de produção e higiene, bem como a falta de acesso a recursos (financeiros e técnicos) que permitam o aumento da produtividade e rentabilidade que afetem positivamente a cadeia produtiva do leite (Zoccal et al. 2004; Lopes et al. 2009).

Qualidade do leite

Em 2002 entrou em vigor a IN n° 51, política pública regulatória que estabeleceu normas para a cadeia leiteira e propiciou mudanças profundas no setor (Brasil 2002). Contudo, foram grandes as preocupações diante das dificuldades impostas pelo novo modelo institucional obrigando o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) a revisar normas e prorrogar os prazos para adaptação de produtores e indústrias.

A IN n° 62 estabelece requisitos físicos e químicos para garantir a qualidade do leite cru refrigerado, dentre os quais limites mínimos de: 3,0 g / 100 g de gordura, 2,9 g / 100 g de proteína, 8,4 g / 100 g de extrato seco desengordurado (ESD).

Em relação ao aspecto microbiológico, a normativa estabelece limites para a contagem bacteriana total (CBT) e para a contagem de células somáticas (CCS) que variam de acordo com a região produtora, em tentativa de respeitar as diferenças tecnológicas regionais, e possuem limites progressivos para permitir adequação dos produtores de leite aos novos parâmetros preconizados (Brasil 2011).

Na região Sudeste, onde foi realizado o presente estudo, O MAPA estipulou limites para CBT e CCS de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1. Limites exigidos pela IN n° 62 quanto aos valores de CBT e CCS para a região Sudeste (Brasil, 2011)

Período	Valores máximos permitidos	
	CBT	CCS
De janeiro de 2012 a junho de 2014	6 x 10 ⁵ UFC/mL	6 x 10 ⁵ CS/mL
De julho de 2014 a junho de 2016	3 x 10 ⁵ UFC/mL	5 x 10 ⁵ CS/mL
A partir de julho de 2016	1 x 10 ⁵ UFC/mL	4 x 10 ⁵ CS/mL

Para avaliar as condições de higiene nas operações de ordenha e dos equipamentos utilizados, a CBT é um importante procedimento diagnóstico. Os valores obtidos no presente estudo oscilaram bastante e ultrapassaram os valores máximos preconizados pelo MAPA, conforme demonstrado na Fig. 1.

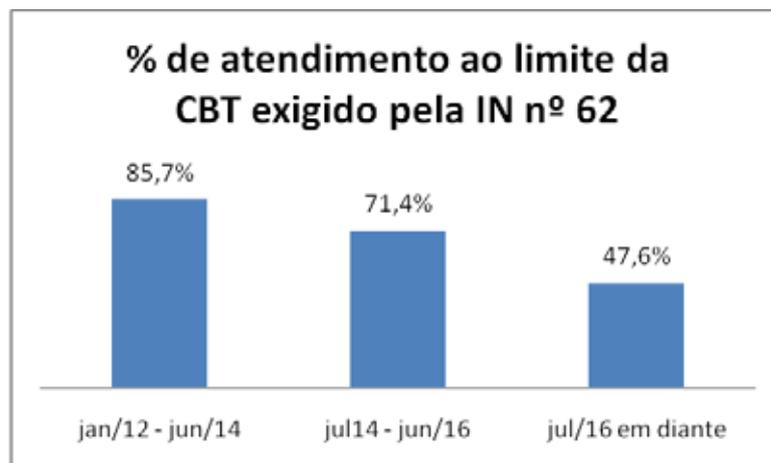


Fig. 1. Percentual de atendimento dos produtores de leite da agricultura familiar frente aos limites de Contagem Bacteriana Total preconizados pela IN nº 62. Botucatu, 2014.

A higiene do ambiente e equipamentos de ordenha, antes do início dos procedimentos, é extremamente importante para obtenção de um produto de qualidade, pois eliminam grande quantidade de micro-organismos que podem ser veiculados pela contaminação do leite.

Os dados demonstraram que as falhas relacionadas à higiene inadequada das instalações, dos animais, equipamentos, bem como procedimentos operacionais observados durante as visitas às pequenas propriedades de leite da agricultura familiar, resultaram em prejuízos para os produtores e o laticínio devido à alta contaminação bacteriana do leite.

A perspectiva desenhada a partir dos parâmetros estabelecidos a partir de julho de 2016 é preocupante uma vez que nem metade dos produtores pesquisados atenderia o valor de 100.000 UFC/mL de leite. O estabelecimento de programas de educação sanitária para os produtores de leite, principalmente aos da agricultura familiar, que possuem maior limitação técnica e financeira e constituem o maior número de trabalhadores no campo, é fundamental.

A CCS do leite reflete a intensidade de resposta inflamatória frente à infecção no tecido mamário. De acordo com os critérios estabelecidos pela legislação brasileira podemos verificar os valores encontrados demonstrados na Fig. 2.

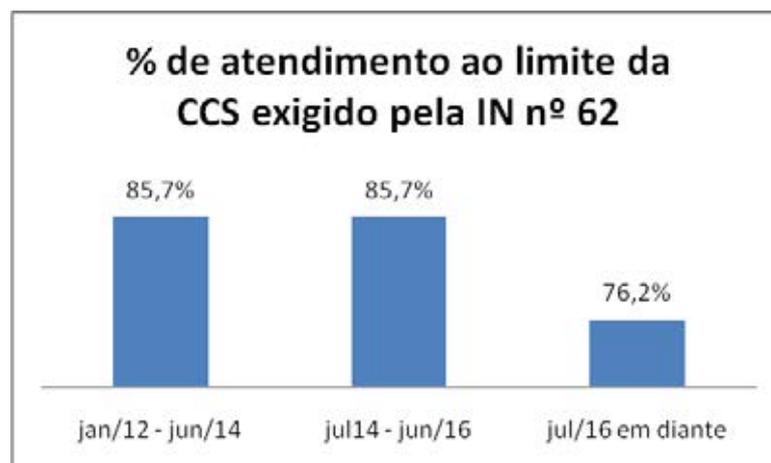


Fig. 2. Percentual de atendimento dos produtores de leite da agricultura familiar frente aos limites de Contagem de Células Somáticas preconizados pela IN nº 62. Botucatu, 2014.

Apesar de parecer contraditório em relação ao observado nas atividades de ordenha das propriedades, esses resultados podem ser justificados pela maior rusticidade do rebanho. O gado mestiço, com baixa produção de leite, é mais resistente à mastite, enquanto animais de maior produção são mais susceptíveis às infecções mamárias (Prestes et al. 2002).

Além das características genéticas e da capacidade imunológica dos animais, a CCS é diretamente influenciada pelo período de lactação, mês e estação do ano, ordem de parto, entre outros. Entretanto, o efeito específico dos patógenos e o estado da infecção mamária são os principais fatores responsáveis por suas

variações. De todo modo, a redução da CCS nas propriedades leiteiras está necessariamente vinculada à adoção de programas de controle e prevenção de mastite (Langoni 2013).

O teor de sólidos do leite determina o seu valor industrial, já que quanto maiores os percentuais de gordura e proteína, maior será o rendimento durante o processamento industrial. Em contrapartida, leite com deficiências importantes na composição podem ser rejeitados para beneficiamento na indústria leiteira (Dürr 2005).

Os parâmetros físico-químicos revelaram que 7 (33,3%) amostras não atingiram o percentual mínimo de 3,0% de gordura, estabelecido pela legislação atual (Brasil 2002). Fato que pode ser influenciado por diversos fatores como o padrão racial do animal, estação do ano e relação entre fornecimento de volumoso:concentrado.

O teor mínimo de proteína (2,9%) foi alcançado por todos os produtores. O extrato seco total é obtido pela soma dos percentuais de gordura, proteína, lactose e sais minerais, sendo considerado normal em valores acima de 11,4%. Já o extrato seco desengordurado (ESD) é obtido pela mesma soma anterior, sem contabilizar a gordura, isto é, 8,4%, este percentual foi obtido em todas as amostras.

Segundo Bueno et al. (2005) quando há elevada contaminação bacteriana é possível observar alterações significativas no teor de lactose do leite. O resultado observado na propriedade 15 concorda com esta afirmativa, pois apresentou a maior CBT (6700×10^3 UFC/mL) e menor percentual de lactose (3,81 g/100mL), apesar de não haver correlação estatística significativa entre esses parâmetros.

Os dados revelaram que os produtores da agricultura familiar estão vulneráveis à imposição de penalidades pelo laticínio por não atenderem os parâmetros microbiológicos e físico-químicos. Tal fato pode tornar o preço do litro do leite menor e dificultar, ainda mais a sobrevivência dos pequenos produtores na atividade leiteira.

CONCLUSÕES

O perfil dos produtores de leite da agricultura familiar revelou média de idade de 59 anos, baixa escolaridade, baixo otimismo e perspectivas de investimentos em relação à atividade, apesar desta ser a principal fonte de renda familiar;

Há grande potencial para o incremento da produção e melhoria na qualidade do leite, pois o rebanho apresenta baixa aptidão leiteira (não especializado), é baixo o grau de tecnificação e as áreas disponíveis nas propriedades são subaproveitadas;

Há grande precariedade na infraestrutura e deficiência nos procedimentos de boas práticas de ordenha e a utilização da ordenha mecânica provocou lesões nos óstios dos tetos;

Devido à baixa aptidão leiteira do rebanho, a CCS apresentou índices satisfatórios;

Os teores dos principais constituintes do leite atendem a legislação vigente;

Valores obtidos para CBT demonstraram a necessidade de implantação de políticas públicas que priorizem a educação sanitária e disseminem a implementação de boas práticas de ordenha;

REFERÊNCIAS

- Beloti V., Barros M.A.F., Souza J.A., Nero, L.A., Santana E.H.W., Balarin O., Curiaki Y. 1999. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procópio, Paraná – Controle do consumo e da comercialização. *Semina*, v.20, p.12-15.
- Brasil 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... Diário Oficial da União, Brasília, 18 de Setembro. Seção 1.
- Brasil 2003. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológica para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Instrução Normativa 62, Brasília, DF, 26 ago.
- Brasil 2009. Lei nº 11.947, de 16 de junho de 2009. Dispõe sobre o atendimento da alimentação escolar e do Programa Dinheiro Direto na Escola aos alunos da educação básica. e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 jun.
- Brasil 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo... Diário Oficial da União, Brasília, 27 de Dezembro. Seção 1.
- Bueno V.F.F. 2005. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. *Ciência Rural*, v.35, n.4, p.848-854.
- Camargos C.R.M. 2003. Os novos tempos da produção leiteira nacional. ANUALPEC. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, p. 213-14.
- Dürr J.W. 2005. Como produzir leite de alta qualidade. Brasil: SENAR, p. 32.
- Embrapa Gado De Leite. 2007. Estatísticas do leite. Juiz de Fora. Disponível em: <<http://www.cnppl.embrapa.br>>. Acesso em: 23 de janeiro de 2012.

- Gomes S.T., Vilela D., Bressan M., Cunha A.S. 2001. Diagnóstico e perspectivas da produção de leite no Brasil. In: Cadeia de lácteos no Brasil: restrições ao seu desenvolvimento. EMBRAPA Gado de Leite: Juiz de Fora, p.21-37.
- IBGE. Produção leiteira brasileira, 2010. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/producao_mundial.htm> Acesso em: 27 de maio de 2013
- Jank Junior R. 2009. Avaliação do impacto econômico de tecnologias de produção de leite na agricultura familiar. Problemas da transição à agricultura sustentável – A importância econômica, social e nutricional do leite. Atualidades e perspectivas para o mercado lácteo. <HTTP://www.samvet.com.br/site/palestras/jank.pdf> Acesso em 18 de agosto de 2013.
- Langoni H., Penachio D. S., Citadella J. C. C., Laurino F., Faccioli-Martins P. Y., Lucheis S. B., Menozzi B. D., Silva A. V. 2011. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesq. Vet. Bras.* 31(12):1059-1065, dez.
- Langoni, H. 2013. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, p. 620-626.
- Lopes M. A., Dias A. S., Carvalho F. M., Lima A. L. R., Cardoso M. G., Carmo E. A. 2009. Resultados econômicos de sistemas de produção de leite com diferentes níveis tecnológicos na região de Lavras MG nos anos de 2004 e 2005. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 33, n. 1, p. 252-260, jan/fev.
- Magalhães H., Faro L., Cardoso K., Paz C., Machado P. 2004. Perdas econômicas decorrentes da contagem de células somáticas. In: *V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal*, 2004, Pirassununga. Anais Pirassununga, SP.
- Milkpoint 2012a. Top 100. <http://www.milkpoint.com.br/top100/final/2012/>. Acesso em 15 de setembro de 2013.
- Milkpoint 2012b. Vacas em lactação: são elas que pagam as contas. <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/vacas-em-lactacao-sao-elas-que-pagam-as-contas-81526n.aspx> Acesso em 15 de setembro de 2013.
- Neto A. C., Lima J. E. 2006. Volume de produção, preços e a decisão de comercialização informal do leite: um estudo no estado do Rio de Janeiro. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, Lavras, v. 8, n. 3, p. 405-410.
- Oliveira L. F. T., Silva S. P. 2012. Mudanças institucionais e produção familiar na cadeia produtiva do leite no oeste catarinense. *RESR*, Piracicaba – SP, Vol. 50, n. 4, p. 705-720, Out/Dez.
- Paula M. M., Kamimura Q. P., Silva J. L. G. 2014. Mercados institucionais na agricultura familiar – Dificuldades e Desafios, *Revista de Política Agrícola*, ano XXIII, n. 1, jan/fev/mar.
- Programa Nacional De Melhoria Da Qualidade Do Leite (PNQL) 1998. Baixa competitividade do leite cru brasileiro. *Jornal da Produção de Leite PDPL/RV*, v.10, n.111. Disponível em: http://www.ufv.br/pdpl/jornal/jpl0598_a.htm. Acesso em: 23 de janeiro de 2012.
- Ponchio L.A., Gomes A.L., Paz E. Perspectivas de consumo do leite no Brasil. Reportagem de julho de 2005. Disponível em <<http://www.cepea.esalq.usp.br>> Acesso em: 23 de janeiro de 2012.
- Prestes D. S., Filappi A., Cecim M. 2002. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. *Revista da FZVA, Uruguaiana*, v. 9, n. 1, p. 118-132.
- Rocha J. S., Buriti F. C. A., Saad S. M. I. 2006. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 2, p. 263-272.
- Ruegg P. 2005. Relationship between bulk tank milk somatic cell count and antibiotic residues. *NMC Annual Meeting Proceedings*, p.28-35.
- Santos M. V., Fonseca L. F. L. 2007. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite, 1ª Ed., Barueri: Manole, 314p.
- Silva J. A., Tsukamoto R. Y. 2001. A modernização da pecuária leiteira e a exclusão do pequeno produtor. *Geografia*, Londrina, v. 10, n. 2, p. 147-162, jul/dez.
- Wilkinson J. 2003. A agricultura familiar ante o novo padrão de competitividade do sistema agroalimentar na América Latina. VII Congresso Internacional da Associação Latino-americana e caribenha de economia agrícola, Lima.
- Zoccal R., Souza A. D., Gomes A. T., Leite J. L. B. 2004. Produção de leite na agricultura familiar. Disponível em <http://www.sober.org.br/palestra/12/090433.pdf> Acesso em 15 de setembro de 2013.

8.3. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA, CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS, PERFIL ANTIMICROBIANO E PESQUISA DE LINHAGENS TOXIGÊNICAS DE *STAPHYLOCOCCUS* EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO MASTÍTICO DE PEQUENAS PROPRIEDADES RURAIS¹

Ubirajara L. Lavor², Felipe F. Guimarães², Marcela P. Manzi², Mateus S. R. Mioni² e Helio Langoni^{3*}

ABSTRACT.- Lavor U.L., Guimarães F.F., Manzi M.P., Salina A., Mioni M. S. R. & Langoni H. 2014 [**Bacterial identification, somatic cell count, antimicrobial profile and toxigenic *Staphylococcus* lines search from mastitic cow milk samples on small farms properties.**] Identificação bacteriana, contagem de células somáticas, perfil antimicrobiano e pesquisa de linhagens toxigênicas de *Staphylococcus* em amostras de leite bovino mastítico de pequenas propriedades rurais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP 18618-970, Brazil. E-mail: hlangoni@fmvz.unesp.br

Bovine mastitis negatively impacts milk production and presents risks to public health. This study evaluated the quality of the milk by somatic cell count (SCC) from small farm properties in the region of Botucatu-SP, identified pathogens involved in mastitis, and its sensitivity profile against antimicrobials. Also evaluated the presence of enterotoxin producing genes in isolated staphylococcal strains. Individual cow milk samples diagnosed with mastitis by California Mastitis Test (CMT) were evaluated by SCC. A total of 239 cows on 21 different properties were evaluated (average = 11.4 animals / property). The clinical mastitis was detected in only two cows (<1%) whereas 86 animals showed milk positive to CMT (35.9% of subclinical mastitis). One hundred seventy-seven (177) milk samples were cultured, on 55 (31.1%) of them it was identified staphylococci, on 25 (14.1%) streptococci, on 45 (25.4%) corynebacteria and on 4 (2.3%), coliforms. The CCS average of the samples from all infected ceilings evaluated was 1,598 x 10³ CS / ml, while in cases where *Staphylococcus* spp. were isolated was 1,362 x 10³ / ml, *Streptococcus* spp. 2857 x 10³ CS / mL, *Corynebacterium* spp 976 x 10³ CS / ml and in the cases of coliforms 1,161 CS x 10³ / mL. The Staphylococci showed high sensitivity (> 95%) to cephalothin, cotrimoxazole, enrofloxacin and gentamicin with penicillin resistance (41.2%) and oxacillin (11.8%). Both coagulase-positive (SCP) and negative (SCN) staphylococci revealed genes coders of enterotoxins in 21.6% in the first group and 41.9% in the second one. The *sea* gene was the most detected – 45.8% (n = 24), followed by *seb* with 29.2% and *sec* with 25.0%. The gene coder of SED was not detected in the studied samples of *Staphylococcus*. It stands out the potential risk to public health by the spread of genes producers of enterotoxin that can cause food toxi-infection from milk obtained of small farm properties.

INDEX TERMS: Bovine mastitis, milk quality, antimicrobial profile, enterotoxigenic staphylococci

RESUMO.- A mastite bovina impacta negativamente a produção leiteira e oferece riscos à saúde pública. O presente estudo avaliou a qualidade do leite pela contagem de células somáticas (CCS) proveniente de pequenas propriedades na região de Botucatu-SP, identificou patógenos envolvidos nas mastites, e seu perfil de sensibilidade frente a antimicrobianos. Avaliou também a presença de genes produtores de enterotoxinas em linhagens de *Staphylococcus* isoladas. Amostras individuais do leite de vacas diagnosticadas com mastite pelo California Mastitis Test (CMT) foram submetidas à CCS. Ao total foram avaliadas 239 vacas em 21 diferentes propriedades (média = 11,4 animais/propriedade). A mastite clínica foi verificada em apenas duas vacas (<1%) enquanto que 86 animais apresentaram leite positivo ao CMT (35,9% de mastite subclínica). Foram cultivadas 177 amostras de leite, sendo que em 55 (31,1%) foram identificados estafilococos, em 25 (14,1%) estreptococos, em 45 (25,4%) corinebacterias e em 4 (2,3%) coliformes. A média da CCS das amostras procedentes de todos os tetos infectados avaliados foi de 1.598 x 10³ CS/mL, enquanto que nos casos onde foram isolados *Staphylococcus* spp. foi de 1.362 x 10³ CS/mL, *Streptococcus* spp. 2.857 x 10³ CS/mL, *Corynebacterium* spp de 976 x 10³ CS/mL e nos casos de coliformes 1.161 x 10³ CS/mL. pesquisadas. Destaca-se o risco potencial à saúde pública pela veiculação de genes produtores de enterotoxinas, que podem ocasionar toxi-infecções alimentares pelo leite oriundo de pequenas propriedades. Os estafilococos revelaram grande sensibilidade (>95%) à cefalotina, cotrimoxazol, enrofloxacina e gentamicina, com resistência à penicilina (41,2%) e oxacilina (11,8%). Tanto estafilococos coagulase positivos (ECP) como negativos (ECN) revelaram genes codificadores de enterotoxinas em 21,6% do primeiro grupo e 41,9% no segundo. O gene *sea* foi o mais detectado 45,8% (n=24), seguido pelo *seb* com 29,2% e *sec* com 25,0%. O gene codificador da SED não foi identificado nas amostras de *Staphylococcus*.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Pós-Graduandos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-970, Brasil.

³ Docente do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ-Unesp, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-970. *Autor para correspondência: hlangoni@fmvz.unesp.br

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Mastite bovina, qualidade do leite, perfil antimicrobiano, estafilococos enterotoxigênicos

INTRODUÇÃO

Dos 1,3 milhão de produtores de leite contabilizados no Brasil, cerca de 85% podem ser classificados como pequenos produtores. A baixa tecnificação, deficiência no manejo, falta de controle sanitário e inadequadas condições de higiene conferem uma baixa qualidade ao leite cru produzido e representam aos consumidores riscos de transmissão de agentes etiológicos de zoonoses ou de possíveis toxi-infecções.

A mastite, enfermidade mais prevalente em bovinos leiteiros, acomete a glândula mamária levando a alterações físico-químicas e bacteriológicas do leite, sendo as causas infecciosas a mais significativa, tanto no aspecto econômico quanto no interesse para a saúde pública. A CCS é considerada um bom indicador da saúde da glândula mamária pois avalia a quantidade de células inflamatórias presentes no leite. Em contagens acima de 200.000 CS/mL são considerados positivos para mastite.

A determinação da etiologia das mastites possibilita a adoção de tratamento antimicrobiano adequados. Levando-se em consideração a diferenciação do caráter contagioso ou ambiental da infecção, a adoção de medidas de prevenção e controle da enfermidade é distinta para cada grupo de micro-organismos (Langoni et al. 1998, Radostits et al. 2007).

Apesar da recente normatização da cadeia leiteira que provocou transformações no setor, como a forma de captação, com a granelização da coleta e fim do recebimento de leite não resfriado, início de políticas de pagamento por qualidade, incorporação de tecnologias no campo e desenvolvimento de novos produtos e processos industriais, ainda são grandes as dificuldades enfrentadas pelos pequenos produtores rurais para adequarem sua produção aos novos parâmetros de qualidade estabelecidos. (Carvalho, 2010).

Pela impossibilidade de atender às pressões impostas pelo mercado ou desmotivação decorrente da pouca consolidação das políticas públicas no setor leiteiro, muitos produtores acabam aderindo ao mercado informal. Valendo-se do risco da ilegalidade, este produtor consegue agregar à sua produção parte da renda que seria apropriada pelos intermediários (Silva & Tsukamoto 2001). Como consequência, este leite comercializado de maneira informal expõe os consumidores a maiores riscos potenciais, com sérias implicações na saúde pública.

A obtenção higiênica do leite, além de impactar diretamente na qualidade do produto, aumenta a produtividade do rebanho como um todo pela diminuição da prevalência das infecções intramamárias – mastites –, resultando em ganhos econômicos diretos e indiretos para o produtor rural (Langoni et al. 2011).

O gênero *Staphylococcus* é o principal envolvido na prevalência e na persistência da mastite no rebanho leiteiro. *S. aureus* destaca-se pelo difícil tratamento devido à alta resistência aos tratamentos antimicrobianos utilizados e pelos variados fatores de virulência, causando infecções de longa duração e com baixa taxa de cura. Outra característica importante é a capacidade de produção de exotoxinas, podendo levar a quadros de intoxicação pela ingestão de toxinas termoestáveis produzidas e liberadas durante sua multiplicação no alimento.

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são um grupo de proteínas de cadeia simples, de baixo peso molecular, produzidas durante todas as fases de multiplicação bacteriana, mas especialmente durante a metade e o fim da fase exponencial (Soriano et al. 2002). As enterotoxinas clássicas (A, B, C, e D) são as mais comuns e sua produção não está restrita somente à espécie *S. aureus*, mas também a outras espécies de estafilococos como os ECNs (Radostits et al. 2007).

A qualidade do leite é fundamental para preservar a saúde de quem o consome e tem como principal parâmetro o perfil microbiológico do produto. Este parâmetro está diretamente associado à carga microbiana inicial e à taxa de multiplicação microbiana (Costa 2005). O perfil microbiológico é dependente das variações nos parâmetros de tempo e temperatura durante o armazenamento do produto (Guimarães 2002).

Para reduzir as infecções intramamárias são fundamentais pelo desenvolvimento de atividades de orientação e apoio aos produtores. Para tal, recomenda-se o aprimoramento de técnicas de diagnóstico individual de mastite clínica e subclínica, identificação laboratorial dos agentes infecciosos envolvidos, tratamento antimicrobiano adequado dos quartos acometidos, limpeza e desinfecção dos tetos (pré e pós-dipping) e do ambiente, bem como provisão de água de boa qualidade, suficiente ao desenvolvimento das atividades inerentes da produção.

Apesar da importância do gênero e de suas toxinas, em saúde pública há pouca informação sobre a prevalência destas da incidência dos genes que as codificam, no leite de animais de pequenas propriedades rurais.

O presente estudo abordou aspectos relativos à qualidade microbiológica por meio da CCS do leite obtido a partir de vacas portadoras de infecção mamária em pequenas propriedades rurais. Identificou a etiologia das mastites, bem como os riscos potenciais à saúde pública pela detecção de genes codificadores de enterotoxinas em linhagens de *Staphylococcus* spp. Estabeleceu o perfil de sensibilidade antimicrobiana e ofereceu informações e orientações técnicas para os produtores, com o objetivo de incrementar a produção e a qualidade do leite produzido nestas propriedades.

MATERIAL E MÉTODOS

As análises microbiológicas, contagem de células somáticas e os estudos moleculares foram realizados no Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites (NUPEMAS) do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Campus de Botucatu, SP.

Propriedades. O estudo foi realizado em propriedades rurais cuja produção diária era inferior a 100 litros de leite. Totalizou-se 21 rebanhos distintos situados na zonal rural da região de Botucatu, SP. O número de vacas em lactação por rebanho variou de 3 a 20 animais, de raça predominantemente mestiça.

Diagnóstico e coleta de amostras. Foi realizada a triagem de todas as vacas em lactação de cada propriedade. O diagnóstico de mastite clínica foi realizado com base nos sinais clínicos da inflamação mamária (dor, rubor, calor e edema) e/ou alterações na macroscopia do leite (grumos, pus, sangue ou filamentos) pela prova da caneca telada de fundo escuro ou Tamis (Radostits et al. 2007). A mastite subclínica foi diagnosticada com o auxílio do CMT (Schalm & Noorlander 1957). Amostras de leite positivas para o Tamis e com escore de positividade no CMT foram coletadas de maneira asséptica de acordo com procedimentos pré-estabelecidos (NMC, 1999). Até a realização dos exames microbiológicos, imediatamente após a chegada ao laboratório, as amostras foram mantidas sob refrigeração (4 a 8°C) em caixas isotérmicas com gelo reciclável.

Cultivos microbiológicos. As técnicas de cultivo microbiológico foram realizadas de acordo com procedimentos padrão (NMC, 1999). Inicialmente foram cultivados 10 microlitros de cada amostra, em meios de ágar sangue ovino a 8%, ágar MacConkey, incubando-se a 37°C, com observação do desenvolvimento microbiano a cada 24 horas, durante 3 dias. As colônias isoladas foram repicadas, estudadas morfológicamente quanto às características fenotípicas (pigmentação e hemólise), bem como morfológicamente pela técnica de Gram, e classificadas de acordo com a capacidade de sintetizar a enzima coagulase visando diferenciar os estafilococos coagulase positivo (ECP) dos negativos (ECN). Para complementar a classificação das demais espécies e subespécies de ECN foram também utilizadas outras provas bioquímicas, como a redução de nitrato, produção de urease e/ou ornitina descarboxilase, fermentação de β-D-frutose e resistência à novobiocina (Cunha et al. 2004). Para identificação das enterobactérias as colônias isoladas em MacConkey foram submetidas às provas bioquímicas de glicose, gás, LTD, H₂S, uréase, motilidade, indol e lisina (Trabulsi et al. 1999). Já as colônias sugestivas de estreptococos foram submetidas à prova de catalase e prova de CAMP visando diferenciar *Streptococcus agalactiae* de *Streptococcus dysgalactiae* (Quinn et al. 2005).

CCS dos animais. Paralelamente ao procedimento supracitado foram colhidas, em frasco plástico contendo conservante celular bronopol (Bertrand, 1996), amostras de leite dos tetos positivos ao Tamis ou ao CMT. A CCS foi realizada em equipamento Somacount 300® (Bentley, UK) por citometria de fluxo.

Perfil de sensibilidade microbiana. *Staphylococcus* spp. isolados foram submetidos à prova de sensibilidade microbiana pelo método de difusão em discos preconizado por Bauer et al. (1966), em placas de Ágar Mueller Hinton dispostas com os seguintes antimicrobianos: neomicina (30 µg), gentamicina (10 µg), penicilina (10 UI), oxacilina (10 µg), cefalotina (30 µg), enrofloxacin (5µg) e cotrimoxazol (25µg). A interpretação dos halos de inibição seguiu a referência do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005).

Extração do DNA. As linhagens de *Staphylococcus* spp. foram inoculadas, individualmente, em caldo Brain Heart Infusion (BHI), incubando-se a 37°C por 24 horas. O ácido nucléico foi extraído utilizando o Kit Illustra Blood Genomic Prep Mini Spin® da GE Healthcare, conforme recomendações do fabricante. A digestão inicial das células de estafilococos deu-se com lisozima (10 mg/mL) e proteinase (20mg/mL), com posterior adição de 400 µL do tampão de extração. A seguir, a mistura foi centrifugada a 11.000 g por 1 min. e o sobrenadante transferido para a coluna GFX, e novamente centrifugado com parâmetros semelhantes. O sobrenadante foi descartado e novamente 500 µL de tampão de extração foi adicionado à coluna. Após nova centrifugação e descarte do líquido, 500 µL da solução de lavagem foi adicionada à coluna, submetendo-se o material a nova centrifugação, desta vez a 11.000 g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e 200 µL de tampão de eluição aquecido a 70°C foi adicionado. O produto obtido foi centrifugado a 5.000 g por 1 minuto para recuperar o DNA, e foi mantido a -20°C, e a coluna GFX foi desprezada.

Detecção de genes codificadores das enterotoxinas. Foram utilizados *primers* específicos para os genes codificadores de cada enterotoxina, a saber: EEA (*sea*), EEB (*seb*), EEC (*sec*) e EED (*sed*), de acordo com Johnson et al. (1991). As reações em cadeia pela polimerase (PCR) foram realizadas em microtubos de 0,5 mL, em volumes totais de 25 µL, com 10 pmol de cada primer, 1,0 U de *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen), 200 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, PCR buffer 1X, 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL da amostra. Em todas as reações foram utilizados controles negativos com a substituição do ácido nucléico por água. A incubação foi realizada no termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf).

Visualização dos produtos amplificados. Os géis de agarose foram preparados em concentração de 2,0% em tampão de TBE 1X, corados com 1,0 µL/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen®) com o objetivo de atestar a eficiência das amplificações. O tamanho dos produtos foi comparado com o padrão 100 pb e posteriormente fotografado sob transiluminação UV.

Análise estatística. Os resultados obtidos foram analisados por estatística descritiva geral, no programa Windows Excel®. Modelos mistos lineares foram usados para comparar a média da CCS no leite entre glândulas

mamárias infectadas com diferentes patógenos. Modelos de regressão logística ou testes de Qui-quadrado foram usados para testar a associação entre os isolados de *Staphylococcus* spp. ao perfil de sensibilidade antimicrobiano dos isolados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etiologia das mastites

O cultivo microbiológico de 177 amostras de leite de vacas em lactação, que demonstrou a ocorrência de importantes agentes patogênicos de mastite (Quadro 1). O predomínio do gênero *Staphylococcus* concorda com diversos estudos de prevalência realizados tanto em rebanhos brasileiros, quanto em propriedades leiteiras de outros países (Nader Filho et al. 2007, Bolanões et al. 2014).

Quadro 1. Número de isolamentos por gênero microbiano nas ocorrências de mastite diagnosticada em vacas de leite de pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014

Produtor	Staph	Strep	Cory	Colif.*	Staph /Strep	Cory /Staph	Cory /Strep	Sem crescimento/contam.**
N	55	25	45	4	5	8	1	34
%	31,1	14,1	25,4	2,3	2,8	4,5	0,6	19,2

*representa o grupo dos coliformes; ** amostras sem crescimento ou contaminadas

Corynebacterium spp. também apresenta participação importante na etiologia das mastites. A espécie *C. bovis* é responsável por redução significativa na produção leite de quartos mamários infectados. Domingues et al. (1998) avaliaram perda de produção de até 27,6%, enquanto Zafalon et al. (1999) relataram redução na faixa de 30,9%, além de observarem aumento significativo na CCS.

Das 31 linhagens classificadas como pertencentes ao gênero *Streptococcus*, 21 (67,7%) foi classificado como *S. agalactiae*, 8 (25,8%) como *S. dysgalactiae* e 2 (6,5%) como *S. bovis*. Principal espécie do gênero na etiologia da mastite bovina, *Streptococcus agalactiae* é intramamário obrigatório e de alta contagiosidade, sendo alta sua participação na prevalência de mastites (González et al. 1986).

Coliformes são importantes indicadores da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos e participam com frequência nas infecções mamárias. No presente estudo foram constatadas em apenas quatro (2,3%) amostras. Guimarães et al. (2013) e Ribeiro et al. (2009) também relataram prevalência de mastites relacionadas à família *Enterobacteriaceae* em vacas leiteiras.

O alta prevalência de gêneros contagiosos – *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium* – deve-se ao habitat deste grupo ser constituído pele mucosa e pele dos animais, indicando problemas relacionados a higiene operacional da ordenha e possível cronicidade da infecção mamária.

Quanto à caracterização bioquímica de estafilococos (Quadro 2) foi revelado que a principal espécie envolvida (N=134) foi *S. aureus*. Também foi possível observar a emergência do ECN como agentes patogênicos importantes na mastite conforme apontaram Piepers et al. (2007).

Quadro 2. Resultado numérico por classificação de linhagens de ECP e ECN isoladas em vacas leiteiras de pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014

Grupo	Espécie	N	% no grupo	% no gênero	% nos isolados
ECP	<i>S. aureus</i>	21	56,8%	30,9%	14,7%
	<i>S. hyicus</i>	4	10,8%	5,9%	2,8%
	<i>S. intermedius</i>	2	5,4%	2,9%	1,4%
	<i>S. schleiferi</i>	1	2,7%	1,5%	0,7%
	<i>Staphylococcus spp.</i>	9	24,3%	13,2%	6,3%
	Subtotal	37	100,0%	54,4%	25,9%
ECN	<i>S. xylosus</i>	9	29,0%	13,2%	6,3%
	<i>S. epidermidis</i>	6	19,4%	8,8%	4,2%
	<i>S. chromogenes</i>	5	16,1%	7,4%	3,5%
	<i>S. warneri</i>	2	6,5%	2,9%	1,4%
	<i>S. simulans</i>	1	3,2%	1,5%	0,7%
	<i>Staphylococcus spp.</i>	8	25,8%	11,8%	5,6%
	Subtotal	31	100,0%	45,6%	21,7%
	Total	68	-	100,0%	47,6%

S. aureus e *S. intermedius* são espécies com grande prevalência na causuística de mastite bovina e frequentemente associadas em surtos de intoxicação alimentar (Radostits et al, 2007). *S. Hyicus* é apontado como responsável pela produção de exotoxinas da Síndrome da Pele Escaldada em porcos (Tanabe et al. 1996). Chenier & Lallier (2012) também atribuíram a esta espécie algumas infecções em galinhas poedeiras. Nesse sentido, a presença de outros animais, como suínos e aves, nas pequenas propriedades pode ter contribuído na participação deste gênero nas mastites observadas.

Em relação as espécies de ECN, o presente estudo concordou com a literatura científica que apontaram participação frequente destas espécies em adição a *S. hominis* e, em menor frequência, de *S. scuri*, *S. Capitis* (Radostits et al. 2007). *S. epidermidis* é a mais prevalente e persistente na pele e membranas mucosas de humanos, sendo possível inferir que sua prevalência tem relação direta com a precariedade nos procedimentos de ordenha nas propriedades visitadas.

S. xylosus era considerado não patogênico até a última década, porém já foi relatado seu isolamento na microbiota da pele e no ambiente de bovinos (Kloos, 1980) e vem sendo constantemente identificado em casos de mastite (Radostits et al. 2007; Guimarães et al. 2013).

A grande variação na etiologia das mastites observadas nas pequenas propriedades leiteiras reforçam a importância da avaliação microbiológica de amostras de leite para correta adoção de programas de monitoramento de qualidade.

Contagem de células somáticas

A CCS do leite reflete a intensidade de resposta inflamatória frente à infecção no tecido mamário (Quadro 3). Células de defesa, principalmente neutrófilos, migram para o interior do úbere visando eliminar o patógeno. Além das características genéticas e da capacidade imunológica dos animais, a CCS é diretamente influenciada pelo período de lactação, mês e estação do ano, ordem de parto, entre outros. Entretanto, o efeito específico dos patógenos e o estado da infecção mamária são os principais fatores responsáveis por suas variações.

Quadro 3. Média da CCS em leite oriundo do teto de vacas com mastite, de acordo com o gênero microbiano. Botucatu, SP, 2014

CCS x 10 ³ (CS/mL)	Gênero bacteriano						
	Staph	Strep	Cory	Colif.*	Staph / Strep	Cory / Staph	Cory / Strep
Média	1362	2857	976	1161	3707	1904	-
Mediana	579	1456	501	465	4501	934	608
Máximo	7357	9999	6554	3396	9999	4655	-
Mínimo	124	175	42	319	375	539	-
N	55	25	45	4	5	8	1
%	38,5	17,5	31,5	2,8	3,5	5,6	0,7

Os patógenos classificados como principais (*S. aureus*, *S. agalactiae*, coliformes) causam mastites que resultam em grandes variações na composição do leite e na CCS, enquanto os patógenos secundários (ECN e *C. bovis*) causam processo inflamatório moderado (Harmon, 1994). Resultados que concordam com estudo e vão de encontro ao revelado por Souza et al. (2009) no qual *S. agalactiae* foi responsável pelo maior aumento da CCS de vacas leiteiras.

A comparação entre os valores de CCS obtidos dentro do gênero *Staphylococcus*, para os grupos de ECP e ECN, revelou que o valor médio do primeiro grupo (1632 x 10³ CS/mL) foi significativamente superior à média observada nos casos de ECN (1060 x 10³ CS/mL). Entretanto, a comparação dos valores máximos observados, 7139 x 10³ CS/mL para ECP e 7357 x 10³ CS/mL para ECN, demonstra a capacidade do último em suscitar processos inflamatórios de intensidade elevada.

Resistência aos antimicrobianos

O gênero *Staphylococcus* apresentou alta sensibilidade frente a maioria dos antimicrobianos. Celatotina, cotrimoxazol, enrofloxacina e gentamicina foram os antimicrobianos mais efetivos (>95,0%). No entanto, notaram-se índices preocupantes de sensibilidade intermediária ou resistência completa frente a alguns fármacos, com destaque para a penicilina (41,2%), oxacilina (11,8%) e neomicina (5,8%) (Quadro 4).

Quadro 4. Perfil de sensibilidade de linhagens do gênero *Staphylococcus* frente a diferentes antimicrobianos. Botucatu, SP, 2014

Antimicrobiano	<i>Staphylococcus</i> spp.					
	Sensível		Sens. Interm.		Resistente	
	N	%	N	%	N	%
Cefalotina (30 µg)	67	98,5%	1	1,5%	0	0,0%
Cotrimoxazol (25 µg)	66	97,1%	1	1,5%	1	1,5%
Enrofloxacina (5 µg)	65	95,6%	1	1,5%	2	2,9%
Gentamicina (10 µg)	66	97,1%	2	2,9%	0	0,0%
Neomicina (30 µg)	64	94,1%	2	2,9%	2	2,9%
Oxacilina (10 µg)	60	88,2%	5	7,4%	3	4,4%
Penicilina (10 UI)	40	58,8%	27	39,7%	1	1,5%

N = número, % = porcentagem

A resistência bacteriana está relacionada à existência de genes capazes de codificarem diferentes mecanismos bioquímicos que conferem ao micro-organismo capacidade de resistirem à ação de diversos fármacos. É resultado da pressão seletiva sobre agentes patogênicos que ocorre pela utilização, necessária ou não, do medicamento (Tavares, 2000).

Além de consistir em sério problema de sanidade animal e à saúde pública, a resistência aos antimicrobianos resultam em prejuízos financeiros diretos aos produtores de leite pelos gastos com medicamentos e descarte do leite durante o tratamento. Perdem também os laticínios e consumidores finais, na

medida em que se não forem respeitados os períodos de carência recomendados para os antimastíticos, a qualidade e segurança dos produtos lácteos são comprometidas.

Em amplo estudo realizado no estado de Minas Gerais, Costa et al. (2013) avaliaram o perfil antimicrobiano de 352 isolados de *S. aureus* obtidos em 35 diferentes propriedades leiteiras. Os percentuais de resistência obtidos frente à cefalotina (0,28%), gentamicina (1,69%), neomicina (3,35%), enrofloxacina (<1,0%) e penicilina (34,1%) foram muito concordantes com os resultados do presente estudo.

Em relação à penicilina, as linhagens estafilocócicas mostraram alto percentual (39,7%) classificado como sensibilidade intermediária e uma amostra (1,5%) resistente. Resultado explicado pelo fato deste antimicrobiano ser o primeiro utilizado em escala comercial, e ser amplamente difundido no tratamento de mastite em rebanhos leiteiros (Vinvot et al. 2003, Rabello et al. 2005).

Quanto à oxacilina, o percentual de 11,8% de sensibilidade intermediária ou resistência observado é similar aos obtidos por Siqueira (2011) em bactérias desse gênero isoladas de amostras de leite orgânico na região de Botucatu, no qual 88,0% foi sensível ao fármaco.

O uso indiscriminado da penicilina, relatado pelos produtores, pode ter contribuído para na pressão seletiva de cepas resistentes ao antimicrobiano, conforme comparação dos perfis obtidos para grupos de ECP e ECN. No primeiro, 48,6% dos isolados foram considerados sensíveis e 51,4% foram resistentes ao fármaco, enquanto os micro-organismos do grupo de ECN apresentaram 71,0% de sensibilidade e 25,8% de resistência. Infere-se pelo fato dos ECP induzirem maior resposta inflamatória, que os micro-organismos desse grupo são alvos de tratamentos antimastíticos com maior frequência que os ECN, levando à pressão seletiva e conseqüente resistência frente ao fármaco.

Enterotoxinas

Das 68 amostras submetidas à pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas, 21 (30,9%) foram positivas para pelo menos um tipo de gene codificador de enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED). Os resultados das 37 espécies de ECP e 31 de ECN, são apresentados nos Quadros 5 e 6, a seguir.

Quadro 5. Frequência dos genes codificadores de enterotoxinas em espécies de ECP isolados a partir de amostras de leite de vacas obtidas em pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.

ECP	Enterotoxinas					
	Resultado da amostra		Gene			
	Negativos	Positivos	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>
<i>Staphylococcus spp.</i>	8	1	1	-	-	-
<i>S. aureus</i>	17	4	3	-	2	-
<i>S. hyicus</i>	2	2	1	1	-	-
<i>S. schleiferi</i>	-	1	-	-	1	-
<i>S. intermedius</i>	2	-	-	-	-	-
Total	29	8	5	1	3	0

Quadro 6. Frequência dos genes codificadores de enterotoxinas em espécies de ECN isolados a partir de amostras de leite de vacas obtidas em pequenas propriedades rurais. Botucatu, SP, 2014.

ECN	Enterotoxinas					
	Resultado da amostra		Gene			
	Negativos	Positivos	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>
<i>Staphylococcus spp.</i>	4	4	2	2	1	-
<i>S. chromogenes</i>	2	3	-	2	1	-
<i>S. xylosus</i>	6	3	1	2	-	-
<i>S. epidermidis</i>	4	2	2	-	1	-
<i>S. warneri</i>	1	1	1	-	-	-
<i>S. simulans</i>	1	-	-	-	-	-
Total	18	13	6	6	3	0

Das 37 amostras de ECP submetidas ao PCR, oito (21,6%) foram positivas para pelo menos um gene codificador de enterotoxinas clássicas. Enquanto que para as 31 amostras de ECN, 13 (41,9%) amostras foram positivas. A positividade significativamente maior dos ECN em relação aos ECP, quanto à presença desses genes, também foi obtida por Guimarães et al. (2013).

Diversos estudos reportaram *Staphylococcus* sp. isolados a partir amostras de leite provenientes de glândulas mamárias acometidas por mastite com capacidade de produzir enterotoxinas, sendo que em 2/3 dos casos de surtos alimentares são relatados o envolvimento do leite e seus derivados (Loir et al. 2003).

Ao considerar somente amostras positivas à detecção de genes codificadores de enterotoxinas foi verificado que o gene *sea* foi prevalente com percentual de 45,8%, seguidos pelo *seb* com 29,2% e *sec* com frequência de 25,0%. O gene *sed* não foi evidenciado em nenhuma das amostras. Esses resultados concordam parcialmente aos encontrados na literatura científica, Zoli et al. (2002) apontaram que a enterotoxina expressada pelo *sed* é o segundo principal tipo envolvido em surtos alimentares, sendo mais frequente a intoxicação pela SEA. Pinchuk et al. (2010) também associaram as intoxicações de origem alimentar com a detecção da SED.

Estudo realizado por Pimentel et al. (2002) em pools de amostras de leite revelou a produção de algum tipo de enterotoxina, em 24,6% das amostras de ECP e 41,3% das amostras de ECN. Concluíram que as espécies coagulase negativa produzem mais frequentemente as enterotoxinas, evidenciando o atraso da legislação brasileira – RDC nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) – que preconiza apenas a contagem de ECP na avaliação do risco de produção de enterotoxinas (Brasil, 2001).

Apesar disso, como relatado por Faccioli (2010), uma alta prevalência dos genes codificadores de enterotoxinas não corresponde, necessariamente, à expressão elevada de enterotoxinas. Carmo et al. (2009) evidenciaram a presença de mecanismos naturais capazes de inibir a produção de enterotoxinas em leite contaminado com linhagens de *S. aureus* enterotoxigênicas. Fatores como condições de crescimento bacteriano, presença de glicose, pH do meio e até mesmo sistemas regulatórios do próprio micro-organismo interferem na expressão dos genes (Cunha et al. 2007).

Os resultados mostram que, tanto nas linhagens de ECP como nas de ECN, há cepas que apresentam genes codificadores para dois tipos diferentes de enterotoxinas estafilocócicas. Em linhagens de *S. aureus* foi evidenciada a presença de dois genes codificadores de enterotoxinas, *sea* e *sec*. Já na linhagem de ECN, *S. epidermidis* revelou o gene *sea* em conjunto com o *sec*. Outro isolado de *Staphylococcus* spp. apresentou os genes *seb* e *sec*, reforçando que é possível determinadas linhagens de estafilococos expressarem concomitantemente mais de um gene produtor de enterotoxinas.

Constatou-se a importância do leite na circulação de linhagens estafilocócicas com potencial enterotoxigênico que podem, sob condições favoráveis, levar a quadros de intoxicação alimentar. No âmbito da agricultura familiar, este risco potencial é ainda mais preocupante pelo fato de ser frequente a ingestão de leite e derivados “in natura” pelos próprios produtores e seus familiares, além do comércio clandestino do leite informal.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo revelaram que há grande variabilidade na etiologia das mastites em rebanhos leiteiros de pequenas propriedades rurais.

A alta frequência do isolamento de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., e *Corynebacterium* spp. no leite dos animais evidenciam a maior participação de micro-organismos contagiosos na etiologia da mastite;

A CCS apresentou valores significativamente diferentes de acordo com o patógeno responsável pela inflamação da glândula mamária.

O perfil de sensibilidade antimicrobiana dos ECP apresentou maior resistência quando comparados ao perfil dos ECN.

A presença dos genes codificadores de enterotoxinas A, B e C nas linhagens de *Staphylococcus* spp. demonstra os riscos potenciais para a saúde pública devido à possibilidade de toxinfecções alimentares pelo consumo de leite oriundo dessas propriedades.

REFERÊNCIAS

- Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, v.45, n.4, p.493-496.
- Bertrand J.A. 1996. Influence of shipping container preservative and breed on analysis of milk components of shipped samples. Journal of Dairy Science, v.6, n.1, p.145-148.
- Bolanós C.A.D., Pantoja J.C.F, Alves A.C., Riseti R.M., Listoni F.J.P., Ribeiro M.G. 2014. Qualidade do leite de vacas criadas no sistema silvopastoril no Vale do Cauca, Colômbia. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 34, [2]: 134-140.
- Brasil. 2001. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 18p.

- Carmo L.S., Guedes L.G., Bambirra L.H.S., Cerqueira M.M.O.P., Nicoli J.R. 2009. Produção de enterotoxina SEA e SEB em leite contaminado com as linhagens (FRI 722 e FRI S-6) produtoras respectivamente de enterotoxina SEA e SEB e uma linhagem de *Lactobacillus*. Rev. da Fund. Ezequiel Dias – Gestão, Ciência e Saúde, v.4, n.1.
- Carvalho G.R. 2010. A indústria de laticínios no Brasil: passado, presente e futuro. **Circular técnica**. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG, v. 102.
- Chenier S. & Lallier L. 2012. Acantholytic folliculitis em epidermitis associated with *Staphylococcus hyicus* in a line of white leghorn laying chickens. Veterinary Pathology, v. 49, n. 2, p. 284-287, Mar.
- Clsi – Clinical And Laboratory Standards Institute. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S15. Wayne, PA, USA.
- Costa E.O. 2005. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite (PNMQL). Revista Napgama, São Paulo, v.8, n.2, p.18-21.
- Costa M.C., Barros R.A., Custódio D.A.C., Pereira U.P., Figueiredo D.J., Silva D. 2013. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados em mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 80, n. 3, p. 297-302.
- Cunha M.L.R.S., Peresi E., Calsolari R.A.O., Araújo Júnior J.P. 2007. Detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 genes in *Staphylococcus* with emphasis in coagulase-negative staphylococci. Microbiology and Immunology, v.51, n.4, p.381-390.
- Domingues P.F., Langoni H., Padovani C.R. 1998. Influência da mastite subclínica sob a produção de leite. Vet. Zootec. p. 99-106.
- Faccioli P. Y. 2010. Detecção molecular de *Staphylococcus aureus* e de suas toxinas no leite de tanque de rebanhos bovinos, em condições de refrigeração e sob temperatura ambiente. 134p. (Tese de Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- González R.N., Jasper D.E., Bushnell R.B., Farver T.B. 1986. Relationship between mastitis pathogen numbers in bulk tank milk and bovine udder infections in California dairy herds. J. Am. Vet. Med. Assoc., v.189, n.4, p.442-445.
- Guimarães R. 2002. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. Higiene Alimentar, v.16, p.25-34.
- Guimarães F.F., Nóbrega D.B., Richini-Pereira V.B., Marson P.M., Pantoja J.C.F., Langoni H. 2013. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. Journal of Dairy Science, v. 96, p. 2866-2872.
- Harmon R. J. 1994. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. Journal Dairy Science, v. 77, n. 7, p. 2103-2113.
- Johnson W.M., Tyler S.D., Ewan E.P., Ashton F.E., Pollard D.R., Rozee K.R. 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, v.29, n.3, p.426-430.
- Kloos W.E. 1980. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. Annual Review of Microbiology, p.345-592.
- Langoni H., Silva A.V., Cabral K.G., Domingues P.F. 1998. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, n.5, p.204-209.
- Langoni H., Penachio D.S., Citadella J.C.C., Laurino, F., Faccioli-Martins P.Y., Lucheis S.B., Menozzi B.D., Silva A.V. 2011. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesq. Vet. Bras.** 31(12):1059-1065, dez.
- Loir Y.L., Baron F., Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research, [s.i], v. 2, n. 1, p. 63-76, Mar.
- Nader Filho A., Ferreira L.M., Amaral L.A., Rossi Junior O.D., Oliveira R.P. 2007. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.59, n. 5, p.1316-1318.
- National Mastitis Council. 1999. Laboratory Handbook on Bovine Mastitis. Natl. Mastitis Council. Inc. Madison, WI.
- Piepers S., De Meulemeester K., De Aart L., Opsomer G., Barkema H.W., Vlieghe S. 2007. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. Journal Dairy Research, v.74, p.478-483.
- Pimentel F.E., Dias R.S., Carmo L.S. 2002. Presença de *Staphylococcus* sp enterotoxigênico e de enterotoxinas em queijo ralado. Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes, v.57, p.227-229.
- Pinchuk I.V., Beswick E.J., Reyes V.E. 2010. Staphylococcal Enterotoxins. Toxins, v.2, p.2177-2197.
- Quinn P. J., Carter M. E., Markey B., Donnelly W. J., Leonard F. C. 2005. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre, Brasil.
- Rabello R. F., Souza C.R.V.M., Duarte R.S.R., Lopes M.M., Teixeira L.M., Castro A.C.D. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Dairy Sciences, v.88, p.3211-3219.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W., Constable P.D. 2007. Veterinary Medicine, 10 ed. Saunders Elsevier, 2156p.

- Ribeiro M.G., Geraldo J.S., Langoni H., Lara G.H.B., Siqueira A.K., Salerno T., Fernandes M.C. 2009. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite produzido no sistema orgânico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.1, p.52-58.
- Schalm O.W., Noorlander D.O. 1957. Experimental and observation leading to development of California mastitis test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.139, p. 199-204.
- Silva J.A., Tsukamoto R.Y. 2001. A modernização da pecuária leiteira e a exclusão do pequeno produtor. *Geografia, Londrina*, v. 10, n. 2, p. 147-162, jul/dez.
- Siqueira A.K. 2011. Indicadores de qualidade, pesquisa de marcadores de virulência e multirresistência aos antimicrobianos em estirpes de *Staphylococcus* spp em leite do origem bovina produzido no sistema orgânico. (Tese de Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- Soriano J.M., Front G., Moltó J.C., Mañes J. 2002. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. *Trends in Food Science and Technology*, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 60-67, Feb.
- Souza G.N., Brito J.R.F., Moreira E.C., Brito M.A.V.P., Silva M.V.G.B. 2009. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.5, p.1015-1020.
- Tanabe T., Sato H., Watanabe K., Hirano M., Hirose K., Kurokawa S., Nakano K., Saito H., Maehara N. 1996. Correlation between occurrence of exudative epidermitis and exfoliative toxin-producing ability of *Staphylococcus hyicus*. *Veterinary Microbiology*, v. 48, n. 1-2, p. 9-17, Jan.
- Tavares W. 2000. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, p. 281-301.
- Trabulsi L.R., Alterthun F., Gompertz O.F. & Candeias J.A.N. 1999. *Microbiologia*. 3a ed. Atheneu, São Paulo. 586p.
- Vintov J., Aarestrup F.M., Zinn C.E., Olsen J.E. 2003. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Veterinary Microbiology*, v.95, p.133-147.
- Zafalon L.F., Amaral L.A., Nader Filho A., Oliveira J.V. 1999. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e *Estafilococos* Coagulase Positivos e Negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. *Revista Napgama*, n.6, p.4-6.
- Zoli J.A., Negrete I.R.A., Oliveira T.C.R.M. 2002. Avaliação da contaminação por *S. aureus* e *Salmonella* spp. de maionese de batata comercializada em Londrina, PR. *Revista Higiene Alimentar*, v.16, n.95, p.62-70.