

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

PATRICIA REGINA ROCHA MIGUEL

**INCIDÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO NO PROCESSO DE
OBTENÇÃO DO LEITE E SUSCETIBILIDADE A AGENTES
ANTIMICROBIANOS**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON
2010**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PATRICIA REGINA ROCHA MIGUEL

**INCIDÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO NO PROCESSO DE
OBTENÇÃO DO LEITE E SUSCETIBILIDADE A AGENTES
ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal e Forragicultura, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora: Prof^a Dr^a Magali Soares dos Santos Pozza.

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maximiliane Alavarse Zambom.

MARECHAL CÂNDIDO RONDON

2010

DEDICO...

Ao Fernando
Ao João Vítor
À Letícia

Verdadeiros motivos da minha felicidade

À minha mãe, Maria
Ao meu pai, Justino, que já se foi
Exemplos de honestidade e humildade

A toda minha família, que me dá todo o apoio e amor
necessários para vencer obstáculos e sempre seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade concedida.

À Professora Dr^a Magali Soares dos Santos Pozza, pela orientação, ensinamentos e paciência.

Ao Professor MSc. Luiz Felipe Caron, da Universidade Federal do Paraná, pela orientação e apoio, sem os quais, não teria sido possível a realização deste trabalho.

À Professora Dr^a. Maximiliane Alavarse Zambom e ao Professor Dr^o Newton Tavares Escocard de Oliveira, exemplos de dedicação ao estudo e, cuja exigência, ajudou-me a vencer limites.

Ao Professor Dr^o Cláudio Yuji Tsutsumi, pela colaboração valiosa ao trabalho.

Ao Paulo Henrique Morsh, secretário do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, sempre atendendo prontamente às nossas solicitações, de forma educada e eficiente.

Ao Médico Veterinário Evandro Richter, responsável pelo setor de Bovinocultura leiteira da instituição na qual foi desenvolvida a pesquisa, por ter gentilmente cedido o espaço.

Aos estagiários, Aline, Charys, Alison, que auxiliaram nos trabalhos de campo e Sr. Agostinho, ordenhador, que nunca reclamou das ordenhas mais demoradas com minha presença.

Às estagiárias, Larissa, Larissa Casagrande e Marina e também ao Médico Veterinário Bruno, pelo auxílio nos trabalhos de laboratório.

Aos diretores do CEEP Newton Freire Maia, Professores Eduardo, Ana Olímpia e Delton, além dos colegas de coordenação Maria do Socorro, Naziel, Andreia e Rosyara, pelo apoio e compreensão em relação às minhas trocas de horário.

Aos meus colegas de mestrado, alguns deles, companheiros de trabalhos e estudos.

Aos alunos do Colégio Agrícola Estadual de Toledo e Centro Estadual de Educação Profissional Newton Freire Maia, jovens oriundos da Agricultura familiar, inspirações para mim.

RESUMO

INCIDÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO NO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO LEITE E SUSCETIBILIDADE A AGENTES ANTIMICROBIANOS

Foram realizados dois experimentos para avaliar a eficiência do pré-dipping na redução da contaminação bacteriana da pele dos tetos dos animais e na contagem bacteriana do leite e a eficiência de higienização das teteiras da ordenhadeira mecânica. Avaliou-se também o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, de *Staphylococcus sp* coagulase negativo isolados de amostras de leite do tanque de refrigeração. Para avaliar a eficiência do pré-dipping, foram escolhidos 12 animais e distribuídos aleatoriamente em 3 grupos. Cada grupo recebeu um tratamento quanto à higienização dos tetos antes da ordenha: nenhuma higienização, higienização com água e secagem com papel toalha descartável e pré-dipping com iodo e secagem com papel toalha descartável. Para avaliar a eficiência de higienização das teteiras da ordenhadeira mecânica, foram coletadas amostras das teteiras antes da ordenha, após utilização em um animal, após utilização em dois animais e após utilização em três animais. Foi realizada pesquisa participativa com um grupo de estudantes oriundos da Agricultura Familiar, durante a qual, realizou-se um mini curso intitulado “Boas Práticas na Ordenha”, com aulas teóricas e práticas. Durante as aulas práticas, os estudantes coletaram material de pontos diversos da sala de ordenha. Foi aplicado um questionário referente a pontos críticos na ordenha para avaliar a percepção dos estudantes antes e depois do mini curso. Dados de uma questão foram analisados estatisticamente quanto à frequência de escolha das respostas. Houve diferença significativa de percepção antes e depois em relação a sete respostas. No experimento que testou a eficiência do pré-dipping houve diferença significativa quanto ao número de tetos com *Staphylococcus sp.* e também Bacilos Gram Positivos entre os tratamentos sem higienização ou higienização com água e pré-dipping. Quanto à contagem bacteriana do leite dos quartos mamários, houve diferença significativa entre os tratamentos sem higienização e pré-dipping, sendo que o tratamento no qual foi utilizada apenas água manteve-se semelhante estatisticamente aos demais. No experimento que testou a eficiência de higienização das teteiras, houve diferença significativa entre as médias obtidas antes da ordenha,

após ordenha de duas e de três vacas, sendo que a média obtida após ordenha de uma vaca apresentou diferença significativa apenas em relação a três vacas. Quanto à suscetibilidade bacteriana a antimicrobianos, dos oito antimicrobianos testados, observou-se resistência a cinco, em pelo menos uma amostra, são eles: amoxicilina+ácido clavulânico, enrofloxacin, gentamicina, penicilina G e vancomicina, sendo que a gentamicina apresentou a maior frequência.

PALAVRAS-CHAVE: leite, ordenha, pré-dipping, *Staphylococcus*, teteira.

ABSTRACT

INCIDENCE OF CONTAMINATION IN THE PROCESS OF GETTING MILK AND SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIAL

Two experiments were carried to evaluate the efficiency of the predipping on bacterian contamination reduction of the animal teats and on the milk bacterian count, as well as the sanitation efficiency of the mechanical milking machine's teatcups. Also has been evaluated, the profile of susceptibility to antimicrobials of coagulase-negative *Staphylococcus sp* isolated from milk samples from the refrigeration tank. To evaluate the efficiency of the pre-dipping, 12 animals were chosen and randomly divided into 3 groups. Each group received a treatment regarding the sanitation of the teats before the milking: no sanitation, sanitation using water followed by disposable paper towel drying and pre-dipping using iodine followed by disposable paper towel drying. To evaluate the sanitation efficiency of the mechanical milking machine's teatcups, were collected samples from them before the milking, after use on an animal, after use on two animals and after use on three animals. A participatory survey was held with a group of students from Family Farming, during which was also held a mini course named "Good Practices on Milking", with theoretical and practical classes. During the practical classes, the students collected material from diverse spots of the milking room. It was applied a questionnaire referent to critical points on milking to evaluate the perception of the students before and after the mini course. Data from one question was statistically analyzed as to the frequency of choice of the answers. There were different perceptions, before and after, on all seven answers. On the experiment that tested the efficiency of the predipping there was significant difference as to the number of teats with *Staphylococcus sp.* and also positive Gram bacilli between treatments with no sanitation or with water sanitation and predipping. As to the milk bacterian count of the mammary quarters, there was significant difference between the treatments without sanitation and pre-dipping, although the treatment with only water kept statistically similar to the others. On the experiment that tested the sanitation efficiency of the mechanical milking teatcups, there was significant difference between the averages obtained before the milking, after milking of two and three cows, although the average obtained after the milking of one cow showed significant

difference only if compared to the periods with three cows. As to the bacterian susceptibility to antimicrobials, it showed resistance to five, from the eight that were tested, in at least one sample, being them: amoxilicin+clavulanic acid, enrofloxacin, gentamicin, G penicillin and vancomycin, with the highest frequency being showed by the gentamicin.

KEYWORDS: milk, milking, pre-dipping, *Staphylococcus*, teatcups.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Regressão dos valores de contagem bacteriana (y) em função do número de animais ordenhados (x).....	41
Figura 2: Teste <i>in vitro</i> de suscetibilidade bacteriana – amostra 9.....	44

LISTA DE TABELAS

Tab.1: Respostas ao questionário obtidas antes e depois do mini curso.....	33
Tab. 2: Estimativas de valores do Qui-quadrado obtidas no questionário.....	34
Tab. 3: Número de tetos que apresentaram <i>Staphylococcus sp</i>	36
Tab. 4: Número de tetos que apresentaram bacilos Gram positivos.....	37
Tab. 5: Médias das contagens bacterianas do leite dos quartos mamários (x 1000/ml).....	38
Tab. 6: Médias das contagens bacterianas das superfícies das teteiras expressas em UFC (unidades formadoras de colônias) x 10.....	39
Tab. 7: Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de <i>Staphylococcus sp</i> isolados de amostras de leite do tanque de refrigeração.....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Segurança e Qualidade na Produção de Leite.....	14
2.2 Fontes de Contaminação do Leite e Principais Grupos de Micro- organismos envolvidos.....	16
2.3 Resistência Bacteriana a Antibióticos.....	23
2.4 Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle e Boas Práticas na Ordenha.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Pesquisa Participativa.....	29
3.2 Eficiência do Pré-dipping na Redução no Número de Tetos Contaminados e na Contagem Bacteriana Total do Leite.....	29
3.3 Eficiência de Higienização das Teteiras da Ordenhadeira Mecânica.....	31
3.4 Perfil de Suscetibilidade de <i>Staphylococcus sp</i> Isolados de Amostras de Leite do Tanque de Refrigeração.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Pesquisa Participativa.....	34
4.2 Eficiência do Pré-dipping na Redução do Número de Tetos Contaminados e na Contagem Bacteriana Total do Leite.....	38
4.3 Eficiência de Higienização das Teteiras da Ordenhadeira Mecânica.....	41
4.4 Perfil de Suscetibilidade de <i>Staphylococcus sp</i> Isolados de Amostras de Leite do Tanque de Refrigeração.....	44
5 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO 1.....	58

1 INTRODUÇÃO

A qualidade microbiológica de um alimento representa um importante fator quando se trata de segurança alimentar. Segundo o *Codex Alimentarius* – órgão da Food and Agricultural Organization (FAO) da Organização Mundial de Saúde (OMS), os alimentos, de um modo geral devem apresentar baixas contagens bacterianas, ausência de micro-organismos patogênicos ao homem, ausência de resíduos de medicamentos veterinários, mínima contaminação com contaminantes químicos ou toxinas microbianas.

As doenças que têm origem na ingestão de alimentos têm recebido destaque nos últimos anos, em parte devido ao aumento de sua importância, em parte devido à nova percepção dos consumidores em relação aos riscos que estão associados ao consumo de alimentos. Em todos os países, há uma tendência de aumento na incidência de doenças transmitidas pelos alimentos, porém, acredita-se que menos de 10% são realmente notificadas e que a incidência é na verdade, muito maior (EYLES, 1995 apud SANTOS e FONSECA, 2008).

A escolha de produtos de origem animal pelos consumidores tem se baseado cada vez mais no conhecimento dos riscos ligados à ingestão destes alimentos, sendo estes riscos decisivos também no comércio entre as nações (PALERMO NETO, 2006).

Em relação ao leite, inúmeros estudos têm demonstrado que a qualidade deste produto no Brasil é motivo de preocupação (NERO *et al.*, 2005; MALLET *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007; VALERIANO *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2006).

O termo qualidade do leite, que vem sendo discutido há muito tempo, adquiriu grande importância com a publicação da Instrução Normativa nº 51, que estabeleceu o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do leite (BRASIL, 2002). Este regulamento trouxe novos requisitos de qualidade, incluindo a contagem padrão de bactérias do leite, sendo estabelecido um limite máximo para o leite cru refrigerado de 10^6 UFC/ml, com redução gradativa, a partir de 2008, até chegar ao limite de 10^5 UFC/ml em 2011 (ARCURI *et al.*, 2006). Além disso, esta normativa regulamentou a coleta do leite cru, determinando a obrigatoriedade de resfriamento na propriedade e seu transporte a granel.

Nas propriedades rurais, o aspecto microbiológico é um fator decisivo para a obtenção de leite de qualidade, já que diversos fatores podem interferir em todo o

processo produtivo. Os micro-organismos de maior importância na produção leiteira são aqueles que contaminam o produto durante e após a ordenha. Esta contaminação é variável, tanto qualitativa quanto quantitativamente, em função das condições de higiene presentes.

Faz-se necessário que estudos sejam desenvolvidos para se identificar e caracterizar pontos críticos na produção leiteira e, desta forma, contribuir para a obtenção de um produto seguro e de qualidade para a população.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivos avaliar a eficiência do pré-dipping na redução da contaminação bacteriana da pele dos tetos e do leite de vacas submetidas a diferentes condições de preparo para a ordenha, a eficiência de higienização das teteiras da ordenhadeira mecânica, além do perfil de suscetibilidade a antibióticos de bactérias presentes no leite do tanque de refrigeração. Objetivou-se também, demonstrar a um grupo de estudantes oriundos da Agricultura familiar, a importância do correto manejo higiênico durante a ordenha.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Segurança e Qualidade na Produção de Leite

Segundo Corbia *et al.* (2000), dentre os alimentos de origem animal, o leite e seus derivados merecem destaque na dieta humana por serem produtos muito consumidos. Desta forma, do ponto de vista de saúde pública, a qualidade do leite é muito importante. Embora não existam, no Brasil, estatísticas que referenciem o assunto, são freqüentes casos de doenças associadas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos com leite contaminado com micro-organismos patogênicos (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

O leite é definido como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). As mesmas características que fazem do leite um rico alimento, ou seja, seus teores de proteína, gordura, vitaminas e sais minerais e, dentre estes principalmente o cálcio, fazem deste produto um excelente meio de cultura para o desenvolvimento bacteriano.

Embora a legislação brasileira não permita a comercialização do leite fluido *in natura*, mas somente após tratamento térmico, como os processos de pasteurização, ou mesmo a ultra pasteurização, no caso dos leites UHT (ultra high temperature), a contaminação inicial, ou seja, aquela que acontece no início da cadeia de produção é determinante para a qualidade microbiológica deste produto.

A pasteurização, que tem a finalidade de eliminar micro-organismos patogênicos e não esporulados, além da flora deteriorante, nem sempre é eficiente, pois alguns destes micro-organismos podem sobreviver ou suas toxinas resistirem ao tratamento térmico (ROBINSON, 2002 apud BADARÓ *et al.*, 2007).

A maioria dos produtos lácticos é produzida a partir do leite pasteurizado e, por isso não deveriam representar riscos à saúde dos consumidores, porém, sabe-se que ocorre a comercialização de queijos artesanais elaborados a partir do leite cru, oferecendo perigo à saúde da população (GONÇALVES, 1998).

Segundo Vialta *et al.* (2002), o controle de qualidade no setor de laticínios inicia-se bem antes da produção da matéria prima nas fazendas ou granjas leiteiras, pois o leite de boa qualidade só é obtido de animais selecionados, sadios,

adequadamente manejados, bem nutridos e livres de doenças ou infecções. Na sequência, a ordenha deve ser realizada em condições higiênicas e ambiente apropriado. O leite precisa ser resfriado e transportado nestas condições até a indústria para que possa ser beneficiado.

Considerando-se o percurso que segue o leite da unidade de produção ao consumidor final, verifica-se que este produto troca de embalagens e meios de transporte várias vezes. Em todas as etapas de processamento, a perecibilidade é uma característica condicionante para o tipo de transporte e embalagem (BILLA *et al.*, 2004).

Condições de resfriamento também interferem na qualidade microbiológica, porém, mesmo sob refrigeração, o leite pode servir como meio para a proliferação microbiana e ser deteriorado, já que algumas bactérias conseguem dobrar sua população a cada 20 ou 30 minutos (GUERREIRO *et al.*, 2005). Isto reforça a necessidade do correto manuseio do leite desde a ordenha até o consumidor final, passando pela indústria.

Fagundes *et al.* (2006), ressaltam que, embora a refrigeração do leite logo após a ordenha seja uma medida obrigatória, isto não garante a qualidade do produto, reforçando que o mesmo seja obtido em condições higiênico-sanitárias adequadas para reduzir a possibilidade de contaminação inicial. Desta forma, a baixa temperatura pode manter a contagem microbiana em níveis reduzidos.

As temperaturas em torno de 4°C selecionam uma microbiota psicotrófica que se multiplica bem sob refrigeração, produzindo enzimas termorresistentes que comprometem a qualidade dos derivados lácteos e principalmente do leite UHT (SANTANA *et al.*, 2001).

A multiplicação de micro-organismos no leite tem o inconveniente de provocar alterações físico-químicas que limitam sua estabilidade. Em consequência disto, problemas econômicos e sanitários são gerados, tornando necessário o tratamento térmico visando a eliminação de micro-organismos antes que o produto seja oferecido ao consumo humano (ALMEIDA, 1999).

Fagundes *et al.* (2006), citam que a qualidade microbiológica do leite é indicativo de saúde do rebanho e da higiene praticada na propriedade, determinando assim o potencial nutricional do leite e sua segurança como alimento inócuo.

Espera-se que a Instrução Normativa 51, a qual é constituída pelos Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do

Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, favoreça a produção de leite dentro de critérios estabelecidos nos prazos determinados, proporcionando bons resultados no setor lácteo, norteados as unidades produtoras na obtenção de produtos dentro de padrões sanitários requeridos para garantir a saúde pública.

2.2 Fontes de Contaminação do Leite e Principais Grupos de Micro-organismos Envolvidos

O principal grupo de micro-organismos que apresenta importância do ponto de vista da qualidade microbiológica do leite é o das bactérias, sendo que as mesmas podem ser patogênicas ou deteriorantes. Bactérias patogênicas adquirem significância em saúde pública, já que podem causar doenças na população consumidora. São exemplos de bactérias patogênicas a *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis*. Bactérias deteriorantes, por sua vez, causam alterações nos componentes do leite, comprometendo suas características organolépticas (SANTOS e FONSECA, 2008).

O leite cru pode apresentar uma diversidade de bactérias que incluem os grupos das mesófilas e psicrófilas. Bactérias mesófilas predominam no leite quando há falhas na higiene geral ou no resfriamento. Nestas condições, algumas bactérias como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e certas Enterobactérias atuam fermentando a lactose e gerando, conseqüentemente, ácido láctico, levando à acidez do leite (SANTOS e FONSECA, 2008). Estas bactérias possuem como temperatura ideal para crescimento uma faixa que vai de 20°C a 30°C, podendo crescer em temperaturas de 35 a 37°C, portanto, além da higiene, o resfriamento do leite representa uma medida simples de controle.

A presença, em um alimento, de bactérias mesófilas em altas contagens, é indicativo de procedimento higiênico inadequado na produção, no beneficiamento ou na conservação. Considerando-se que todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas, a alta contagem representa que houve condições adequadas ao crescimento de patógenos (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Um micro-organismo muito frequente na produção e beneficiamento do leite é o *Staphylococcus spp*, bactéria mesófila que tem como características a

conformação em cocos Gram positivos, em arranjos semelhantes a cachos de uva, a maioria das espécies é anaeróbia facultativa e catalase positiva (QUINN *et al.*, 2005). Esta bactéria apresenta temperatura de crescimento na faixa de 6,7 a 48°C, sendo a temperatura ótima em torno de 37°C (CORBIA *et al.*, 2000).

O *Staphylococcus aureus* está associado a afecções que acometem desde o tecido cutâneo até infecções sistêmicas, com destaque nos animais que apresentam infecção da glândula mamária. Além disso, na microbiologia de alimentos está associado a intoxicações alimentares devido à produção de enterotoxinas termoestáveis, servindo como indicador higiênico-sanitário na indústria alimentícia (FREIRAS *et al.*, 2004).

Segundo Rapini *et al.* (2004), a pele e a mucosa do homem atuam como importantes reservatórios de estafilococos, conseqüentemente, representam fontes importantes de veiculação deste micro-organismo para os alimentos.

No ser humano, o quadro clínico característico de intoxicação estafilocócica manifesta-se com náuseas, vômito, mal-estar, debilidade em geral, diarreia aquosa e não sanguinolenta e dor abdominal, resultando em desidratação (FREIRAS *et al.*, 2004).

A espécie predominantemente descrita como produtora de enterotoxinas é *Staphylococcus aureus*, porém, outras espécies como *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* têm sido apontadas como enterotoxigênicas (SENA, 2000). Na atualidade, até mesmo às espécies coagulase negativas têm sido atribuída a capacidade de produzir enterotoxinas (RAPINI *et al.*, 2004; LAMAITA *et al.*, 2005; MARIANO *et al.*, 2007).

Lamaita *et al.* (2005), destacam a importância de que os órgãos oficiais de inspeção e vigilância sanitária reconsiderem a atual legislação em relação ao *Staphylococcus sp.*, já que os tratamentos térmicos disponíveis para o leite não são capazes de inativar as enterotoxinas nele presentes, o que constitui risco potencial para a população. Estes autores sugerem a determinação de padrões para *Staphylococcus sp.* e não somente para *Staphylococcus* coagulase positivos, como ocorre atualmente.

Fagundes e Oliveira (2004), que realizaram estudos com infecções intramamárias por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública, observam que, a simples presença de cepas toxigênicas desta bactéria no leite não

implica, necessariamente, na ocorrência de intoxicação em seres humanos, porém, o risco existe, sendo maior em crianças menores.

Já as bactérias psicrótróficas predominam no leite refrigerado, pois possuem capacidade de crescimento a baixas temperaturas e incluem espécies Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium* e bactérias Gram positivas dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Microbacterium spp* (PINTO *et al.*, 2006). Santos e Fonseca (2008) citam também os gêneros *Listeria* e *Yersinia*, acrescentando que estas, juntamente com *Bacillus*, são capazes de provocar doenças em seres humanos pela ingestão do leite cru, em condições especiais. No entanto, acrescentam que o maior problema relacionado às bactérias psicrótróficas reside no fato de serem capazes de produzir enzimas que resistem ao tratamento térmico.

Badaró *et al.* (2007), analisaram a contaminação do leite cru comercializado informalmente no município de Ipatinga, Minas Gerais, com o objetivo de fornecer dados para a Vigilância Sanitária. Os autores encontraram elevadas contagens de bactérias aeróbias mesófilas, muito acima do limite permitido pela legislação, indicando falhas no processo de obtenção do leite, como, limpeza e desinfecção das superfícies inadequadas, higiene não adequada na produção ou a combinação destes fatores.

Pinto *et al.* (2006), avaliando a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado retirado de tanques individuais e coletivos de uma indústria de laticínios, encontraram contaminações elevadas de bactérias aeróbias mesófilas, variando entre $1,4 \times 10^6$ UFC/ml a $5,5 \times 10^6$ UFC/ml, números acima do padrão estabelecido pela legislação vigente.

Como fontes de contaminação microbiana do leite cru, podem-se ter o próprio animal, o homem e o ambiente. O leite ejetado durante a ordenha apresenta, em geral, baixa contaminação microbiana, sendo que a mesma não constitui risco à saúde (ARCURI *et al.*, 2006).

A ordenha constitui a etapa de maior vulnerabilidade no processo de obtenção de leite de qualidade, pois nesta etapa podem ocorrer mais facilmente contaminações por sujidades e micro-organismos presentes no próprio local de ordenha que podem ser incorporados ao produto *in natura*.

A carga microbiana inicial do leite está diretamente associada com a higiene dos utensílios e equipamentos utilizados durante a ordenha, higiene do ordenhador (quanto às mãos, vestimenta e calçados), qualidade da água utilizada na limpeza dos equipamentos e utensílios e o próprio animal, neste caso, relacionado à saúde do úbere e higienização dos tetos.

Para Pankey *et al.* (1987), os patógenos associados à mastite, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, são transmitidos principalmente pelas mãos dos ordenhadores e equipamentos de ordenha, sendo que o número de infecções intramamárias pode ser reduzido significativamente através da desinfecção dos equipamentos de ordenha e antissepsia dos tetos dos animais e das mãos dos ordenhadores.

Quanto aos equipamentos de ordenha, Glesson *et al.* (2009), destacaram as teteiras da ordenhadeira mecânica como a maior causa de contaminação entre as vacas, entretanto, o adequado manejo pré-ordenha pode reduzir a contaminação dos tetos não só por bactérias ambientais como também por bactérias provenientes de outros animais.

Verifica-se que a higienização deficiente pode, ao longo do tempo, levar à formação de biofilme nas superfícies dos mesmos. Quando invadem um novo ecotipo, as bactérias podem assumir duas formas: a planctônica, quando circulam isoladamente, e a forma em biofilme. Nesta, elas inicialmente aderem a um substrato e, posteriormente, produzem uma matriz denominada glicocálice, onde formam microcolônias.

Segundo Parizi (1998), o biofilme é formado por partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, que formam uma espécie de crosta, sob a qual os micro-organismos crescem, formando um cultivo puro ou associado resistente à ação dos agentes sanitizantes.

Oliveira *et al.* (2007), avaliando a qualidade microbiológica do leite cru e eficiência de higienização de equipamentos de ordenha em propriedades de Minas Gerais, encontraram um percentual de 40% das propriedades apresentando biofilmes nas teteiras das ordenhadeiras mecânicas.

Tanques de resfriamento também representam importantes fontes de contaminação do leite, conforme descrito por Marques *et al.* (2007), que encontraram *Staphylococcus aureus* aderidos à pá de homogeneização do leite, no fundo e na parede de 30 tanques analisados após higienização.

Valeriano *et al.* (2007), identificaram bactérias psicrótroficas isoladas de tanques de refrigeração por expansão comunitários em municípios de Minas Gerais. Os resultados demonstraram a presença de micro-organismos tais como *Aeromonas hydrophila/caviae*, relacionada à contaminação da água utilizada para a higienização de tanques de expansão e equipamentos utilizados durante a ordenha e *Pseudomonas fluorescens*, relacionada à formação de biofilmes, já que esta bactéria possui a habilidade de produzir exopolissacarídeos que facilitam a aderência em superfícies.

Além das bactérias citadas, foram ainda identificadas outras, da família Enterobacteriaceae, tais como *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella spp*, *Yersinia spp*, *Citrobacter spp* e, até mesmo, *Shigella spp*, estando estes micro-organismos relacionados à contaminação com material fecal e falhas no processo de higienização do ambiente, pessoal, equipamentos e utensílios durante a ordenha, transporte e estocagem. A presença da *Shigella spp* apresenta um agravante, já que esta bactéria é responsável pela disenteria bacilar ou shigelose.

Estudando a qualidade da água utilizada em 25 pequenas propriedades leiteiras, Mallet *et al.* (2007), observaram que 68% das mesmas não se encontravam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação para coliformes termotolerantes, havendo a presença de *Escherichia coli* em 24% das amostras. Foi observado também *Pseudomonas aeruginosa*, um potencial patógeno, em 60% das amostras analisadas.

Reconhecendo-se que o interior da glândula mamária, a pele do úbere e dos tetos e os equipamentos de ordenha representam pontos críticos à obtenção de leite cru com qualidade microbiológica, uma medida durante a ordenha que tem como objetivo promover melhorias no aspecto sanitário de obtenção do leite é o pré-dipping, ou seja, o uso de uma solução germicida com capacidade de produzir a antisepsia dos tetos antes da ordenha. Esta prática tem como objetivo a redução da contaminação dos tetos principalmente por patógenos de origem ambiental que podem atingir os tetos entre as ordenhas (GILSON, 2009).

Mesmo aparentemente limpos, os tetos podem abrigar um grande número de bactérias como coliformes, *Streptococcus* e outras bactérias comumente encontradas no meio ambiente e no solo. Isto pode incluir *Staphylococcus aureus* e outras espécies de *Staphylococcus* e *Streptococcus* associados a injúrias na pele.

Para Ingalls (2006), a sanitização da pele dos tetos de vacas leiteiras é dificultada devido às fendas e possíveis rachaduras que podem alojar populações bacterianas, mantendo-as protegidas de produtos sanitizantes. Carneiro *et al.* (2009), citam que a manutenção da integridade da pele do teto reduz riscos de contaminação pois limita a colonização deste local por micro-organismos provenientes da própria pele e do ambiente.

Diversos autores têm estudado as formas de preparação do úbere antes da ordenha, demonstrando os efeitos benéficos do pré-dipping na redução da contaminação dos tetos e do leite (GALTON *et al.*, 1982; SCHULTZE, 1985; GALTON *et al.*, 1986; PANKEY *et al.*, 1986; HOGAN *et al.*, 1987; GALTON *et al.*, 1988; INGALLS, 2006; GLESSON *et al.*, 2009).

A lavagem de úbere e tetos sem a adequada secagem promove aumento da população bacteriana no leite e nos tetos dos animais, segundo Galton *et al.* (1986). Os autores recomendam, portanto, a lavagem apenas dos tetos e, ainda, quando necessário, seguida do uso de um produto desinfetante e secagem.

Brito *et al.* (2000), compararam três métodos de preparação dos tetos utilizando antissepsia com iodo, com toalhas embebidas em clorexidina ou apenas lavagem com água e secagem com papel toalha. Os resultados comprovaram a eficiência dos métodos de antissepsia em comparação ao uso apenas da lavagem e secagem dos tetos na redução dos níveis de contaminação.

O manejo higiênico da ordenha é descrito por Müller (2002) como medida importante no controle da mastite e na redução da contaminação microbiana do leite. Este autor cita como etapas de uma rotina pré-ordenha os seguintes itens: a) Teste da caneca, já que a visualização dos grumos é indicativo de mastite clínica e permite a não utilização de um leite contaminado; b) Limpeza dos tetos com água clorada: medida que pode ser dispensada caso os tetos não apresentem sujidades; c) Imersão dos tetos em solução antisséptica (pré-dipping): é necessário que os tetos permaneçam imersos por um período mínimo de trinta segundos. Esta medida pode promover a redução de até 50% de novas infecções; d) Secagem dos tetos: com papel toalha descartável. Esta medida, juntamente com o pré-dipping pode elevar a até 85% a taxa de redução de novas infecções. Deve ser realizada mesmo que não tenha sido feita a lavagem com água, apenas o pré-dipping, para evitar resíduos do produto no leite.

Existem vários produtos comerciais que podem ser utilizados no pré-dipping, tais como aqueles à base de iodo, cloro, clorhexidina, ácido sulfônico, cloro, peróxidos, lauridina e ácido cloroso. Para minimizar irritações e condicionar a pele dos tetos, são utilizadas bases emolientes na formulação desses germicidas, tais como, glicerina, lanolina, propilenoglicol, sorbitol, óleos vegetais ou minerais e colágeno (SANTOS e FONSECA, 2008).

Pedrini e Margatho (2003), testaram o desempenho *in vitro* de alguns desinfetantes comerciais em diferentes concentrações frente a micro-organismos patogênicos. Dos resultados obtidos, destaca-se que o hipoclorito somente foi efetivo quando utilizado em concentração de 2,0%, o que é muito irritante à pele do teto e na concentração comercialmente utilizada, de 0,5%, não foi efetivo; o iodo a 2,0 e 1,0% foram os mais efetivos, porém, os autores recomendam a concentração de 0,5% para evitar resíduos no leite; quanto à clorexidina, os autores determinaram que concentrações de 0,5 e 1,0% foram suficientes para reduzir contagens de bactérias Gram positivas e Gram negativas e apresentou a melhor relação custo x benefício.

Medidas sanitárias durante a ordenha, como o pré-dipping, são úteis não apenas para controlar a qualidade microbiológica do leite, mas têm efeitos importantes na prevenção de mastite. Watts (1988), cita que existem 137 espécies de micro-organismos entre subespécies e sorovares isolados da glândula mamária, que podem causar a mastite bovina.

A mastite bovina, que consiste na inflamação da glândula mamária em geral resultante de um processo infeccioso, pode ter como patógenos envolvidos os seguintes: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, coliformes e *Streptococcus* sp, que não o *Streptococcus agalactiae*, além daqueles com menor patogenicidade, como *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus* coagulase-negativos (HARMON, 1995).

2.3 Resistência Bacteriana a Antibióticos

Um fator relevante relacionado à segurança alimentar diz respeito à resistência bacteriana a antimicrobianos. A ANVISA (2002) destaca que este representa um sério risco à saúde humana, tornando-se um tema de muita

importância, discutido intensamente em instituições como a Organização Mundial da Saúde, Organização Internacional de Epizootias e *Codex Alimentarius*.

Houve um rápido aumento na emergência de patógenos resistentes a múltiplas drogas nos últimos 10 a 15 anos (ROESCH *et al.*, 2006). Algumas bactérias são resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, o que representa um problema crescente na medicina humana e veterinária (LEVY, 1998).

A resistência bacteriana pode ser definida como o fenômeno biológico que possibilita aos micro-organismos a capacidade de multiplicação ou persistência na presença de níveis terapêuticos do antimicrobiano em questão. A forma mais preocupante é a adquirida, pela aquisição de genes de resistência, situados nos plasmídios ou transposons; por recombinação de DNA exógeno no cromossoma da bactéria ou por mutação (PALERMO NETO e ALMEIDA, 2006). As drogas atuam como agentes seletivos (MOTA *et al.*, 2005).

Micro-organismos resistentes não se inibem pelas concentrações habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano, ou apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente estudado ao qual não havia uma adequada resposta clínica quando usado como tratamento (RODRIGUEZ *et al.*, 2000).

Segundo Palermo Neto (2006), a constatação do aumento da prevalência/incidência de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos e a possível relação deste fato com o uso de antibióticos em medicina veterinária, especialmente quando realizado como aditivo zootécnico, representa, na atualidade, o centro das discussões relacionadas ao consumo de alimentos de origem animal.

A importância da aquisição de bactérias resistentes a partir de alimentos de origem animal está relacionada aos micro-organismos que possuem a capacidade de causar manifestações patológicas no organismo ou quando um grande número de agentes oportunistas é ingerido (alterando a microbiota do trato gastrointestinal). Para que se instale, a enfermidade deve superar os mecanismos de defesa do organismo: 1) pH e enzimas estomacais; 2) enzimas, muco, peristaltismo, microbiota normal e sistema imune (PALERMO NETO e ALMEIDA, 2006).

A especificidade do hospedeiro seria também um fator limitante às manifestações patológicas no organismo humano por bactérias de origem alimentar. Porém, Poeta *et al.* (2005), destacam que apesar de existir grande especificidade de hospedeiros, distintos genes de resistência podem ser trocados pelos micro-

organismos do intestino dos animais, ser adquiridos por micro-organismos saprófitas do intestino humano e, posteriormente, transferidos a possíveis patógenos, que podem ser disseminados a outros indivíduos.

Para Kachatourians (1998), parte do problema de resistência bacteriana a antimicrobianos se deve às práticas de uso destas substâncias como promotores de crescimento, além da prevenção de doenças com utilização de doses subterapêuticas na pecuária industrial.

Andreoti e Nicodemo (2004), questionam se os níveis de produção animal podem ser obtidos sem o uso de antibióticos como aditivos alimentares, destacando que a restrição no uso de antimicrobianos pode resultar em um aumento do aparecimento de doenças infecciosas nos rebanhos e, como consequência, produtos de qualidade inferior.

A presença de resíduos antimicrobianos no leite destinado ao consumo humano representa uma crescente preocupação, tendo em vista a possível utilização inadequada de determinados antibióticos associada às deficiências higiênicas de manejo, o que proporciona a manutenção e disseminação de cepas resistentes entre os animais (ARAÚJO, 1998).

De acordo com Mota *et al.* (2005), os antibióticos pertencem ao grupo das substâncias residuais de maior influência na qualidade do leite, sendo os contaminantes mais estudados em todo o mundo e os responsáveis pelas maiores regulamentações internacionais. Os danos que os antibióticos produzem na saúde humana são divididos em três aspectos: efeitos tóxicos diretos, indução de alergias e desenvolvimento de resistência. A maior incidência na resistência a antibióticos de micro-organismos isolados de animais de produção é consequência do uso indiscriminado.

2.4 Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle e Boas Práticas na Ordenha

Para garantir a inocuidade dos alimentos, desenvolvimentos recentes na área de garantia da qualidade têm enfatizado a prevenção de defeitos em primeiro lugar, por meio da efetiva identificação e eliminação de riscos, em detrimento do controle centrado nos produtos acabados, permitindo o emprego de sistemas de Qualidade Assegurada (QA), em particular a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

(APPCC), usada na identificação de pontos e etapas do processamento nos quais microrganismos patogênicos podem sobreviver, entrar e/ou proliferar no alimento (VIALTA, 2002).

O sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC ou HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Point) é um método embasado na aplicação de princípios técnicos e científicos de prevenção, que tem por finalidade garantir a inocuidade dos processos de produção, manipulação, transporte, distribuição e consumo dos alimentos. Esse conceito abrange todos os fatores que possam afetar a segurança do alimento (ATHAYDE, 1999 apud FIGUEIREDO e COSTA NETO, 2001).

Os sistemas industriais têm utilizado amplamente o conceito de APPCC, sendo que, atualmente, tem-se discutido e implementado este conceito também ao nível da produção primária de alimentos (BRITO *et al.* (2004). Estes autores, com o objetivo de detalhar e examinar a adoção de procedimentos componentes das boas práticas agropecuárias, como requisitos para a implementação do sistema APPCC em propriedades leiteiras da região sudeste brasileira, verificaram em estudo que envolveu 48 propriedades leiteiras, que uma série de procedimentos, quando não adotados em muitas delas, podem colocar em risco tanto a qualidade do leite para processamento quanto a saúde do consumidor. Dentre tais procedimentos e, relacionados à ordenha, encontram-se a monitoração e controle da mastite, a anti-sepsia de tetos e a higienização adequada dos equipamentos de ordenha e de estocagem do leite, assim como o dimensionamento adequado destes últimos.

Spexoto *et al.* (2005), aplicaram um sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle em uma propriedade leiteira do tipo A. Foram levantados perigos com graus diferentes quanto à dificuldade de controle. Aqueles relacionados, por exemplo, à efetividade do pré-dipping, limpeza dos equipamentos na presença de animais com mastite, permaneceram totalmente controlados. Outros, tais como o estresse animal, superlotação e pisoteio na sala de espera, procedimento de secagem dos tetos dos animais, limpeza de equipamentos de ordenha e contaminação da teteira durante o processo de ordenha apresentaram resultados insatisfatórios quanto aos limites críticos estabelecidos. Alguns perigos não puderam ser controlados, tais como limpeza e funcionamento do tanque de resfriamento.

A identificação de pontos críticos nos processos de produção de alimentos permite que possam ser estabelecidas medidas diretas e eficazes de redução dos

níveis de contaminação e que se estabeleçam programas de Boas Práticas de Produção, através dos quais, as atividades relacionadas à produção sejam padronizadas, prevenindo-se contra possíveis riscos de contaminação.

Os procedimentos durante a ordenha podem representar pontos críticos para a obtenção de um leite de qualidade e estão relacionados à higiene dos tetos e úbere dos animais, do ordenhador, do ambiente e dos equipamentos de ordenha.

Critérios indicativos de alta qualidade de leite cru compreendem o reduzido número de micro-organismos saprófitas e ausência ou número muito baixo de micro-organismos patogênicos (HEESCHEN, 1996, apud BRITO *et al.*, 2000).

A ANVISA (2002), preconiza que devem ser verificados, monitorados e controlados os seguintes riscos ao nível de campo na produção de leite: micro-organismos patogênicos - doenças/zoonoses, resíduos de medicamentos veterinários no leite e resistência a antimicrobianos - devem ser respeitados os períodos para tratamento e de carência, resíduos de pesticidas no leite - devem ser respeitados períodos de carência e para reintrodução no pasto, contaminantes orgânicos (como micotoxinas) e inorgânicos (metais pesados) - devem ser preconizadas práticas agrícolas adequadas e controle de qualidade da ração, resíduos de dioxina e furanos e padrões higiênico-sanitários.

Para Dürr (2008), a garantia de segurança alimentar, a otimização do uso de recursos e a conquista e manutenção de mercados são fatores que justificam investimentos em controle de qualidade dos alimentos lácteos. Segundo o referido autor, mesmo que o conceito de qualidade já esteja bem estabelecido no senso comum, é a percepção de que qualidade aumenta a competitividade que tem permitido avanços sistemáticos no aprimoramento dos processos envolvidos no suprimento de produtos lácteos à população.

Portanto, a busca contínua de qualidade na produção de leite e seus derivados não deve ser vista apenas como um benefício à saúde da população consumidora, mas também daqueles que produzem este alimento, pois melhora as chances de conquistas em um mercado competitivo. O controle de qualidade do leite deve contribuir necessariamente para a redução dos custos, a racionalização dos investimentos e o aumento da rentabilidade do negócio leiteiro (DÜRR, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida durante o período de novembro de 2009 a junho de 2010, no setor de bovinocultura de leite de uma instituição pública localizada no município de Pinhais/Paraná. O rebanho foi constituído por animais das raças Jersey, Pardo Suiço e Holandês, mantidos em sistema de criação agroecológico. Os animais eram ordenhados duas vezes ao dia mecanicamente em sala de ordenha com seis conjuntos de teteiras.

As práticas sanitárias correntes na propriedade eram a vacinação contra Brucelose e Febre Aftosa, os exames de Tuberculose e Brucelose, o controle de mastite através da utilização de linha de ordenha – determinada após a realização semanal do *California Mastitis Test* (CMT) – contagem de células somáticas e a utilização de antibiótico à base de cefalexina e neomicina no momento da secagem dos animais.

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e no Laboratório do Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná (PARLPR), pertencente à Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa.

Foram realizados três experimentos durante os quais, avaliou-se a eficiência do pré-dipping na redução do número de tetos contaminados e da contagem bacteriana do leite, a eficiência de higienização das teteiras da ordenhadeira mecânica e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, de *Staphylococcus sp* isolados de amostras de leite do tanque de refrigeração.

Além dos experimentos e, tendo em vista que o local onde se desenvolveu a pesquisa contava com a participação de estudantes do curso Técnico em Agropecuária de um Centro Estadual de Educação Profissional, em aulas práticas ou atividades de estágio, foi realizada pesquisa participativa (HAGUETTE, 1999) com um grupo de 16 estudantes oriundos da Agricultura familiar.

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando o Programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2003).

3.1 Pesquisa Participativa

Para o desenvolvimento da pesquisa participativa, realizou-se um mini curso intitulado “Boas Práticas na Ordenha”. As atividades referentes ao mini curso consistiram de: 8 horas de aulas teóricas abordando aspectos relacionados à higiene durante a ordenha e 8 horas de aulas práticas. Durante as aulas práticas os estudantes coletaram material de pontos diversos da sala de ordenha do setor de Bovinocultura leiteira onde se desenvolveram os experimentos. Para isto, utilizaram *swabs* esterilizados que foram posteriormente mantidos em meio de transporte de Stuart.

Os *swabs* foram levados ao laboratório de Biologia do Centro Estadual de Educação Profissional Newton Freire Maia, onde foi feita a semeadura diretamente em placas de Ágar sangue e incubação a 37°C por 24 horas. Após este período, foi observado e analisado o crescimento bacteriano referente aos diversos pontos amostrados. Ao final, foi produzido pelo grupo um “Protocolo para o Correto Manejo de Ordenha”.

Foi aplicado um questionário (anexo 1) com questões relativas a pontos críticos durante a ordenha antes e depois da realização do mini curso para avaliar se o conhecimento trabalhado durante o período teria promovido diferenças na percepção dos estudantes.

Os dados do questionário foram analisados através do Teste de Qui-quadrado para duas amostras (antes e depois do mini curso) ao nível de significância de 5%.

3.2 Eficiência do Pré-dipping na Redução do Número de Tetos Contaminados e na Contagem Bacteriana Total do Leite

Foram escolhidos 12 animais com CMT não reagente ou no máximo 1+, distribuídos aleatoriamente em 3 grupos. Cada grupo recebeu um tratamento quanto à higienização dos tetos antes da ordenha: nenhuma higienização, higienização com água corrente e secagem com papel toalha descartável e pré-dipping com iodo e secagem com papel toalha descartável.

Foram amostrados dois tetos por animal, anterior direito (AD) e posterior esquerdo (PE), utilizando-se *swabs* esterilizados, os quais foram friccionados na extremidade dos tetos, com movimentos rotativos após 30 segundos da secagem

dos mesmos (RENDOS *et al.*, 1975) ou logo após a entrada e acomodação na sala de ordenha, quando animais do primeiro grupo. Os *swabs* foram mantidos em meio de transporte Stuart, acondicionados em caixa isotérmica contendo gelo e, em seguida, conduzidos ao laboratório da Universidade Federal do Paraná para pesquisa microbiológica. Ao todo foram analisadas 144 amostras durante o período experimental.

Foi feita a semeadura diretamente dos *swabs* para placas de Agar sangue, que foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, as colônias foram analisadas quanto às características morfológicas e realizou-se a Coloração de Gram.

Foram identificados cocos Gram positivos e bacilos Gram positivos. Os cocos Gram positivos foram identificados como *Staphylococcus*, através da prova da catalase (HOLMBERG, 1973). Para a realização desta, coletou-se com alça bacteriológica o centro da colônia, fez-se o esfregaço em lâmina e colocou-se sobre o esfregaço uma gota de água oxigenada a 3%, verificando-se a formação ou não de bolhas, as quais indicariam positividade à prova. Todas as colônias de cocos Gram positivos foram catalase positivo, ou seja, colônias de *Staphylococcus sp.*

Foi realizada a prova de coagulase (HOLMBERG, 1973) das colônias de *Staphylococcus*. Para isto, fez-se a adição da colônia em tubo contendo 0,3 ml de plasma de coelho e levou-se à estufa a 37°C. Verificou-se, então, a formação ou não de coágulos após 2, 6 e 24 horas. A ausência de coagulação após 24 horas indicou tratar-se de colônias de *Staphylococcus sp.* coagulase negativo.

Os dados foram analisados quanto a número de tetos positivos para *Staphylococcus sp* e número de tetos positivos para bacilos Gram positivos.

Amostras de leite diretamente dos tetos dos animais foram coletadas em frascos esterilizados contendo conservante azidiol. Os mesmos tetos amostrados na coleta anterior foram utilizados para esta variável, sendo um frasco por animal. A coleta do leite ocorreu logo após a passagem do *swab* e desprezados os três primeiros jatos. Ao todo foram analisadas 48 amostras durante o período experimental.

As amostras de leite foram conduzidas ao Laboratório de controle leiteiro da APCBRH, onde foi realizada a Contagem Bacteriana Total, através do Ensaio de Citometria de Fluxo, em aparelho BactoCount IBC.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 6 repetições para a coleta de amostras da pele dos tetos e 5 para amostras de leite dos quartos mamários. As médias foram comparadas pelo Teste de Student-Newman-Keuls (SNK), ao nível de significância de 5%. O modelo estatístico utilizado para avaliar os efeitos dos tratamentos sobre o número de tetos positivos para *Staphylococcus sp* e bacilos Gram positivos, além da contagem bacteriana total do leite foi o seguinte:

$$Y_{ij} = m + T_i + E_{ij}$$

Onde:

Y_{ij} = nº de tetos positivos e contagem bacteriana total do leite, referentes aos tratamentos.

m = média geral da característica.

T_i = efeitos dos tratamentos, sendo i = sem higienização, higienização com água e pré-dipping.

E_{ij} = erro aleatório associado a cada observação.

3.3 Eficiência de Higienização das Teteiras da Ordenhadeira Mecânica

Foram coletadas 2 amostras de cada conjunto de teteiras, sendo amostrados 3 conjuntos - 50% do total - totalizando 6 amostras antes da ordenha (teteiras higienizadas), 6 amostras após utilização em um animal, 6 amostras após utilização em dois animais e 3 amostras após utilização em 3 animais, perfazendo um total de 21 amostras por dia de coleta, de um total de 4 dias. Foram analisadas 84 amostras.

Utilizaram-se *swabs* esterilizados, que foram passados na superfície interna das teteiras em 20 movimentos circulares para cima, a partir da boca da borracha insufladora e 20 movimentos circulares para baixo, em uma altura de 15 cm (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Após a coleta, cada *swab* foi colocado em frasco esterilizado contendo 10 ml de solução salina esterilizada, identificado com o número da teteira, acondicionado em caixa isotérmica com gelo e levado ao laboratório.

No laboratório, em câmara de fluxo laminar, foram retiradas alíquotas de 0,1 ml de cada tubo com micropipeta, após agitação por 30 segundos, vertido em placa contendo Plate Count Agar (Ágar Padrão para Contagem) em duplicatas sendo o material espalhado na placa com alça de Drigalski. As placas foram, em seguida,

incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, as colônias foram contadas, sendo os valores expressos em unidades formadoras de colônias (UFC x 10).

Para verificar o nível de contaminação das superfícies, as médias de unidades formadoras de colônias obtidas com as contagens, foram divididas por 117,75 cm² (OLIVEIRA *et al.*, 2007), já que esta corresponde à área aproximada por onde foram passados os *swabs*.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo as médias comparadas pelo Teste de Student-Newman-Keuls (SNK), ao nível de significância de 5%. O modelo estatístico utilizado para avaliar os efeitos do número de animais ordenhados sobre a contagem bacteriana total da superfície das teteiras foi o seguinte:

$$Y_{ij} = m + T_i + E_{ij}$$

Onde:

Y_{ij} = contagens bacterianas, referentes ao número de animais ordenhados.

m = média geral da característica.

T_i = efeitos dos tratamentos, sendo i = antes da ordenha, após ordenha de um, de dois e de três animais.

E_{ij} = erro aleatório associado a cada observação.

Foi feita análise de regressão dos dados, segundo modelo linear de primeiro grau, dado pela seguinte fórmula:

$$Y_i = B_0 + B_1 Y_i + E_i$$

Onde:

Y_i = observações de contagem bacteriana antes da ordenha, após um, dois e três animais.

B_0 = constante ou coeficiente de introdução da reta com o eixo das ordenadas.

B_1 = coeficiente de regressão linear da variável y , em função de i = antes da ordenha, após um, dois e três animais.

E_i = erro aleatório associado a cada observação.

3.4 Perfil de Suscetibilidade a Antimicrobianos de *Staphylococcus sp* Isolados de Amostras de Leite do Tanque de Refrigeração

Foram coletadas amostras de leite do tanque de refrigeração em frascos esterilizados com auxílio de um coletor de aço inoxidável. As amostras foram levadas ao laboratório da UFPR em caixa isotérmica contendo gelo. As coletas foram realizadas semanalmente durante um período de quatro semanas.

Foi realizada a semeadura do material em ágar sangue e levado à incubação a 37°C por 24 horas. Após este período, foram identificadas colônias de *Staphylococcus sp* – através de coloração de Gram e prova de catalase.

Utilizou-se o Método de Kirby & Bauer (BAUER *et al.*, 1966) para avaliar o perfil de suscetibilidade *in vitro* da bactéria isolada aos seguintes agentes antimicrobianos: amoxicilina+ácido clavulânico (30 mcg), cefalexina (30 mcg), enrofloxacina (5 mcg), gentamicina (10 mcg), levofloxacina (5 mcg), penicilina G (10 UI), tetraciclina (30 mcg) e vancomicina (30 mcg), em concentrações recomendadas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Entre os antimicrobianos escolhidos, a maioria possui emprego na medicina veterinária e humana, porém, alguns são de uso mais restrito na medicina veterinária, tais como a levofloxacina e vancomicina ou são exclusivamente utilizados na veterinária, como a enrofloxacina (SPINOSA *et al.*, 2006).

Segundo este método, colônias isoladas de *Staphylococcus sp* de uma cultura de 18 a 24 horas a 37°C foram tocadas com alça bacteriológica e inoculadas em salina fisiológica a 0,9% até que se obteve turvação semelhante a escala 0,5 de *Mac Farland*. Então, diluiu-se a suspensão com turvação 0,5 na escala *Mac Farland* a 1/10 em salina fisiológica, obtendo-se uma concentração bacteriana final de aproximadamente 10^7 micro-organismos/ml. Foi então inoculada a suspensão em Agar Mueller-Hinton com auxílio de *swab* esterilizado embebido na suspensão. Após a secagem da suspensão no ágar, os discos de antimicrobianos foram distribuídos de forma equidistante na placa, sem ultrapassar o tempo de 15 minutos. As placas foram então incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. Após este período, realizou-se a leitura através da visualização e mensuração dos diâmetros dos halos formados e, para a interpretação, foi utilizada a tabela padrão para interpretação de halos de inibição, de acordo com o NCCLS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Pesquisa Participativa

Embora o questionário possuísse questões de a até d, somente foi transcrita e analisada a questão “d”, pois a mesma apresentou melhor possibilidade de análise quantitativa.

Os resultados estão apresentados na forma de percentuais de alunos que assinalaram as respostas apresentadas, respondendo à questão: “Podem representar pontos críticos (riscos) à obtenção de leite com qualidade microbiológica”,

Os dados da Tabela 1 apresentam o nível de compreensão dos estudantes a respeito do que consideravam pontos de potencial risco à obtenção de leite com qualidade microbiológica, antes da participação no mini curso.

Tabela 1: Respostas ao questionário aplicado obtidas antes e depois da realização do mini curso

Respostas	% Alunos	% Alunos
	Antes	Depois
Água utilizada na higienização	37,50	87,50
Mãos do ordenhador na ordenha mecânica	31,25	93,75
Mãos do ordenhador na ordenha manual	68,75	87,50
Roupa do ordenhador	62,50	100,0
Teteiras da ordenhadeira mecânica	37,50	87,50
Outros equipamentos da ordenhadeira mecânica: copo coletor, balão, mangueiras	25,00	68,75
Utensílios para ordenha manual	56,25	75,00
Pele do teto	31,25	75,00
Úbere	37,50	50,00

Verificou-se que os itens associados à ordenha manual foram os que receberam os maiores percentuais, indicando associação entre a higiene pessoal do ordenhador e os riscos de contaminação do leite.

Após participação nas atividades teóricas e práticas, a compreensão a respeito do que pode representar ponto crítico se modificou, como pode ser observado na Tabela 2, onde são observados os percentuais das respostas e na Tabela 3, através dos resultados do Qui-quadrado.

Tabela 2. Estimativas de valores do Qui-quadrado obtidas no questionário

Questão	Respostas	Número de alunos "Antes"	Número de alunos "Depois"	χ^2 calculado
Podem representar "pontos críticos" (riscos) à obtenção de leite com qualidade microbiológica	- Água utilizada na higienização	6	14	8,53*
	- Mãos do ordenhador na ordenha mecânica	5	15	13,33*
	- Mãos do ordenhador na ordenha manual	11	14	1,65 ^{NS}
	- Roupa do ordenhador	10	16	7,38*
	- Teteiras da ordenhadeira mecânica	6	14	8,53*
	- Outros equipamentos da ordenhadeira mecânica: copo coletor, balão, mangueiras	4	11	6,15*
	- Utensílios para ordenha manual, como, balde etc	9	12	1,25 ^{NS}
	- Pele do teto	5	12	6,50*
	- Úbere	6	8	0,51 ^{NS}

*Significativo ao nível de probabilidade de 5% pelo Teste de Qui-quadrado

A Tabela 3 mostra que, das nove questões avaliadas, seis sofreram alterações após o treinamento, mostrando diferença significativa no Teste do Qui-quadrado. As questões foram: água utilizada na higienização, mãos do ordenhador

na ordenha mecânica, roupa do ordenhador, teteiras da ordenhadeira mecânica, outros equipamentos da ordenhadeira mecânica e pele do teto.

Em relação a três questões não houve alteração significativa: mãos do ordenhador na ordenha manual, utensílios para ordenha manual e úbere, sendo que estas já representavam pontos críticos na opinião da maioria dos estudantes antes do treinamento.

O item “úbere” manteve-se com baixo número de escolhas, provavelmente devido às informações tratadas durante o mini curso, já que foi dada ênfase à higienização dos tetos e destacados os riscos de se molhar todo o úbere antes da ordenha, pois esta medida pode carrear sujidades e micro-organismos para as teteiras.

A visualização do crescimento bacteriano nas placas a partir dos pontos amostrados permitiu que, um conhecimento até o momento abstrato e de difícil compreensão para o grupo adquirisse um significado concreto. A respeito disso, Bordenave (1988), cita que produtores oriundos da Agricultura familiar reconhecem somente aquilo que é facilmente observável dentro da sua realidade.

Olival (2004), em pesquisa com produtores rurais, identificou uma dificuldade entre os mesmos a respeito da compreensão sobre a origem da contaminação do leite, onde 31% dos produtores pesquisados não souberam dizer corretamente pelo menos uma fonte de contaminação do leite. O mesmo autor verificou, ainda, que, apesar do termo higiene ser citado pelos produtores como ponto importante para a prevenção de mastite e contaminação do leite, nenhum produtor conseguiu especificar medidas tais como desinfecção dos tetos antes da ordenha ou limpeza de equipamentos e utensílios como medidas eficazes.

Perecmanis *et al.* (2006), realizaram pesquisa participativa com agricultores familiares de Unaí/MG, durante a qual, foi feito o acompanhamento da qualidade do leite através da contagem bacteriana total, além da estruturação de um curso para a capacitação com enfoque na higiene da ordenha. Como resultado desta abordagem, houve redução nos níveis bacterianos do leite produzido pela comunidade.

Estes dados corroboram os do presente trabalho, justificando a pesquisa participativa como instrumento útil na promoção de mudanças de percepção em relação aos fatores que podem representar riscos à obtenção de leite com qualidade.

4.2 Eficiência do Pré-dipping na Redução do Número de Tetos Contaminados e na Contagem Bacteriana Total do Leite

Foram identificados na pele dos tetos dos animais, bactérias dos grupos *Staphylococcus sp.* coagulase negativo e bacilos Gram positivos.

As tabelas abaixo mostram o número de tetos que apresentaram estas bactérias em cada tratamento.

Houve diferença significativa entre os tratamentos para o número de tetos contaminados com *Staphylococcus sp.*, como pode ser observado na Tabela 3, quando compara-se a não higienização ou a higienização com água com o pré-dipping.

Tabela 3: Contaminação dos tetos com *Staphylococcus sp.* em função dos tipos de higienização adotados

Repetição	Tratamentos		
	Sem Higienização	Higienização com água	Pré-dipping
1	2	3	0
2	8	4	4
3	5	4	0
4	8	7	6
5	4	4	1
6	7	5	1
Média	5,6 ^a	4,5 ^a	2,0 ^b

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste SNK.

Da mesma forma, como pode ser observado na Tabela 4, houve diferença significativa para o número de tetos contaminados com bacilos Gram positivos entre os tratamentos nos quais não houve higienização ou foi utilizada apenas água e o tratamento no qual foi utilizado o pré-dipping.

Tabela 4: Contaminação dos tetos com bacilos Gram positivos em função dos tipos de higienização adotados

Repetição	Tratamentos		
	Sem Higienização	Higienização com Água	Pré-dipping
1	8	5	2
2	8	8	8
3	8	8	4
4	7	5	5
5	8	7	2
6	7	7	3
Média	7,7 ^a	6,7 ^a	4,0 ^b

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste SNK.

A higienização com água não alterou significativamente a contaminação dos tetos, tanto com relação a *Staphylococcus*, como bacilos Gram positivos.

Observou-se uma redução de mais de 50% no número de tetos contaminados com *Staphylococcus* e próximo a este percentual em relação à contaminação com bacilos Gram positivos, quando foi utilizado o pré-dipping.

A utilização apenas de água na higienização propiciou uma redução do número de tetos contaminados com *Staphylococcus* e bacilos Gram positivos, porém, a redução foi significativamente maior quando foi utilizado o pré-dipping., indicando a necessidade desta prática antes da ordenha.

Brito *et al.*(2000), comprovaram a eficiência do pré-dipping em comparação ao uso de água corrente, porém, utilizando como parâmetro a contagem bacteriana da pele dos tetos.

Também utilizando a contagem bacteriana da pele dos tetos como parâmetro, Amaral *et al.*(2004) testaram os efeitos do pré-dipping com hipoclorito de sódio, concluindo ser este uma ferramenta importante na prevenção de mastite e na melhoria da qualidade do leite.

Houve diferença significativa entre os tratamentos sem higienização e pré-dipping para contagem bacteriana do leite retirado dos quartos mamários, sendo que

o tratamento no qual foi utilizada apenas água manteve-se semelhante estatisticamente aos demais (Tabela 5).

Tabela 5: Médias das contagens bacterianas expressas em unidades formadoras de colônias x 1000/ml de leite retirado dos quartos mamários em função dos tipos de higienização

Repetição	Tratamentos		
	Sem higienização	Higienização com água	Pré-dipping
1	31,00	11,00	7,50
2	7,00	14,00	4,50
3	2,50	2,00	1,25
4	35,75	2,50	1,00
5	65,50	24,50	4,00
Médias	28,35 ^a	10,80 ^{ab}	3,65 ^b

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste SNK.

As altas contagens de mesófilos aeróbios no leite cru estão associadas a uma provável contaminação da matéria prima durante a sua obtenção. Este fato pode ser indicativo de falhas nos procedimentos higiênico-sanitários durante a ordenha ou manejo pré-ordenha, como a limpeza e desinfecção insuficiente dos tetos (SILVA *et al.*, 2010).

Tem sido descrito que a antissepsia dos tetos e secagem com papel toalha antes da ordenha reduzem a contagem bacteriana da pele dos tetos e do leite (GALTON *et al.*, 1982; GALTON *et al.*, 1986; PANKEI *et al.*, 1986; INGAWA *et al.*, 1992), além de prevenir infecções intramamárias (SCHULTZE, 1985; GALTON *et al.*, 1988).

Galton *et al.*(1988), objetivando determinar os efeitos do pré-dipping em comparação à não higienização dos tetos antes da ordenha sobre a incidência de novas infecções intramamárias, comprovou uma redução de 66,3% no número de novas infecções por *Streptococcus uberis* inoculada experimentalmente.

Santana *et al.*(2001), compararam potenciais pontos de contaminação do leite em propriedades classificadas quanto ao manejo sanitário, encontrando redução de

99,5% nas contagens de aeróbios mesófilos na única propriedade que utilizava pré-dipping. Nas propriedades que utilizavam apenas água na higienização dos tetos, a redução situou-se entre 77 e 78%.

Em estudo semelhante, Fagundes *et al.* (2006), pesquisaram situações de risco à contaminação do leite com *Pseudomonas spp* em propriedades classificadas quanto ao manejo higiênico pré e pós ordenha, citando que, naquelas onde foram praticados manejos pré-ordenha como o pré-dipping, as contagens bacterianas foram menores.

Os dados obtidos com o presente trabalho, bem como aqueles citados na literatura, parecem evidenciar o potencial que possui o pré-dipping em reduzir os níveis de contaminação dos tetos e, conseqüentemente, do leite.

4.3 Eficiência de Higienização das Teteiras da Ordenhadeira Mecânica

As médias das contagens bacterianas das teteiras encontram-se na tabela 6. Houve diferença significativa entre as médias dos períodos antes da ordenha, após ordenha de duas e de três vacas, permanecendo o valor obtido no período após ordenha de uma vaca sem diferença significativa ($p>0,05$) em relação ao período anterior à ordenha e após ordenha de duas vacas.

Tabela 6: Médias das contagens bacterianas da superfície das teteiras expressas em unidades formadoras de colônias x 10/cm² em função do número de animais ordenhados

Repetição	Número de animais ordenhados			
	Antes da ordenha	Após ordenha de uma vaca	Após ordenha de duas vacas	Após ordenha de três vacas
1	12,25	67,67	132,91	163,00
2	4,50	17,83	117,08	193,67
3	26,16	30,33	55,58	85,83
4	8,10	20,00	37,91	124,00
Médias	12,81 ^a	33,96 ^{ab}	85,87 ^b	141,62 ^c

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste SNK.

A média de contagem bacteriana antes da ordenha – teteiras higienizadas – foi de $12,81 \times 10^1$ UFC, considerando a área por onde foram passados os swabs como sendo de aproximadamente $117,75 \text{ cm}^2$, tem-se um valor de $1,09 \text{ UFC/cm}^2$. Segundo a American Public Health Association - APHA, valores superiores a $2,0 \text{ UFC/cm}^2$ em superfícies que entram em contato com alimentos, indicam higiene inadequada (SVEUM *et al.*, 1992). O processo de higienização praticado foi, portanto, eficiente na redução dos níveis de contaminação, que passaram de $12,00 \text{ UFC/cm}^2$ após a ordenha de três vacas, para $1,09 \text{ UFC/cm}^2$.

A higienização adequada reduz a contagem bacteriana das superfícies dos equipamentos de ordenha. Corroboram com esta afirmação resultados encontrados por Cavalcanti (2005), que, ao avaliar a eficiência dos procedimentos de higienização dos equipamentos de ordenha, obteve como média de contagem bacteriana das teteiras higienizadas o valor de $1,8 \text{ UFC/cm}^2$.

Em experimento que testou a eficiência de higienização de equipamentos de ordenha manual quanto a contagem bacteriana, Costa (2006) observou uma redução de 90% da contaminação sob efeito da higienização.

Oliveira *et al.* (2007), destacaram a importância da correta higienização das teteiras ao estudar cinco propriedades leiteiras em Minas Gerais, encontrando altos valores de contagem bacteriana mesmo quando as mesmas eram consideradas higienizadas.

Santos e Fonseca (2001) também descreveram índices elevados de contagem bacteriana em amostras de equipamento de ordenha, porém sem citar as condições de higienização dos equipamentos.

Houve efeito linear positivo do número de animais ordenhados sobre a contagem bacteriana das superfícies das teteiras. Os dados estão representados na figura 1.

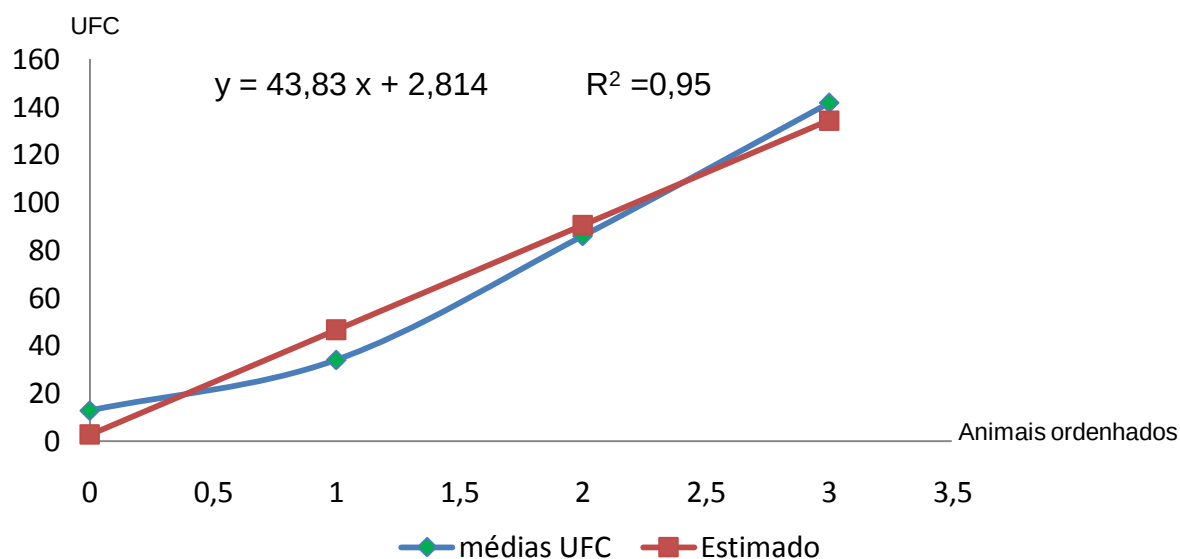


Figura 1: Regressão dos valores de contagem bacteriana (y) em função do número de animais ordenhados (x).

Os dados mostram uma evolução importante no aumento do número de bactérias à medida que os animais são ordenhados.

Silva *et al.* (2010), em experimento que avaliou, entre outros, a contaminação das teteiras durante a ordenha, descreveram aumentos das contagens médias de mesófilos aeróbios e coliformes totais e termotolerantes do início ao fim da ordenha.

Este fato é importante por indicar que, apesar da higienização após o término da ordenha ocorrer de forma adequada, reduzindo significativamente a contaminação das superfícies das teteiras para a próxima ordenha, o risco encontra-se durante a ordenha.

Isto pode ser um indicativo da necessidade de medida de manejo, como a desinfecção das teteiras, entre ordenhas. Porém, a respeito disso, Amaral *et al.* (2004), ao testarem os efeitos da desinfecção das teteiras entre animais durante a ordenha, não encontraram efeitos significativos desta medida sobre a redução de bactérias, obtendo, inclusive, aumento do número de micro-organismos isolados.

Os mesmos autores destacam que o ato de imersão das teteiras em solução desinfetante pode promover o desprendimento de materiais aderidos à superfície interna das teteiras.

O desprendimento de materiais da superfície interna das teteiras, mesmo sem a ação de desinfecção entre um animal e outro, pode ser uma razão para a

crescente contagem bacteriana verificada no presente trabalho, como resultado da umidade proporcionada pelo leite e a ação mecânica de contato com a pele do teto.

Deve-se considerar, portanto, que a contagem bacteriana das teteiras durante a ordenha é resultado da interação das mesmas com a pele dos tetos dos animais (SANTANA *et al.*, 2001), além do próprio leite.

A pele dos tetos parece representar uma importante fonte de contaminação do leite e, quando associada às teteiras, os riscos são aumentados, mesmo considerando-se que a contagem inicial tenha sido baixa, consequência das condições de higiene adequadas.

4.4 Perfil de Suscetibilidade de *Staphylococcus sp.* Isolados de Amostras de Leite do Tanque de Refrigeração

Dos oito antimicrobianos testados, observou-se resistência a cinco, em pelo menos uma amostra, são eles: amoxicilina+ácido clavulânico, enrofloxacina, gentamicina, penicilina G e vancomicina, sendo que a gentamicina apresentou a maior frequência, duas amostras.

Não foi observada resistência aos antimicrobianos cefalexina, levofloxacina e tetraciclina, sendo que à cefalexina foi observada sensibilidade intermediária.

Em três amostras, uma para penicilina G e duas para vancomicina, houve crescimento de colônias satélite, ou seja, em uma população sensível, havia indivíduos resistentes.

Na Tabela 7 podem ser observados os dados obtidos nas provas de suscetibilidade de *Staphylococcus sp* isolados de 9 amostras de leite do tanque de refrigeração.

Tabela 7: Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus sp* isolados de amostras de leite do tanque de refrigeração

Antimicrobiano	Amostras								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Amoxicilina/ Ác. Clavulânico	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Halo em mm	36	40	48	41	40	41	40	40	Nf
Cefalexina	S	S	S	S	S	S	S	S	I
Halo em mm	Nf	30	39	30	38	30	38	30	16
Enrofloxacin	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Halo em mm	30	30	39	29	30	29	30	30	30
Gentamicina	S	S	S	R	S	R	S	S	S
Halo em mm	28	25	31	Nf	22	Nf	22	31	17
Levofloxacin	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Halo em mm	30	30	32	30	30	30	30	32	30
Penicilina G	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Halo em mm	*30	40	50	49	40	49	40	40	Nf
Tetraciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Halo em mm	30	30	37	31	30	31	30	30	22
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Halo em mm	*20	*20	20	20	17	20	17	20	Nf

S = sensível; I = intermediária; R = resistente; nf = não formou halo

*Com colônias satélite: numa população sensível, indivíduos resistentes.

O resultado do teste da amostra nove pode ser observado na figura 2



Figura 2: Teste *in vitro* de suscetibilidade bacteriana – amostra 9

Não era esperado encontrar resistência aos antimicrobianos entre os isolados, já que o sistema de criação do rebanho em estudo é agroecológico, com utilização muito restrita de antimicrobianos.

A única situação relatada, na qual é feito uso destes produtos na rotina da criação se dá durante a secagem das vacas antes da parição. O produto que tem sido utilizado é à base de cefalexina e neomicina em suspensão intramamária. Isto pode explicar a sensibilidade intermediária observada à cefalexina.

Pesquisadores têm relatado resistência de *Staphylococcus spp* isolados de leite a antimicrobianos como a gentamicina, enrofloxacina e penicilina (ZAFALON *et al.*, 2008; MEDEIROS *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009).

Ribeiro *et al.*(2009), em pesquisa de sensibilidade microbiana em linhagens de micro-organismos isolados de vacas com e sem mastite, realizada com quatro rebanhos de produção orgânica de leite, relatou resistência a diversos antimicrobianos, entre eles, a gentamicina, enrofloxacina e penicilina.

Alto percentual de espécimes de *Staphylococcus sp.* resistentes à penicilina foram descritos por Brito *et al.*(2001) e por Fontana (2002) em amostras de leite de vacas com mastite. Embora tenha sido muito utilizada no tratamento de infecções estafilocócicas em animais, a penicilina não tem sido mais utilizada pelo alto grau de resistência apresentada por estes micro-organismos na atualidade (LOWY, 1998).

Ao comparar os perfis de suscetibilidade de cepas de *Staphylococcus sp* e *Streptococcus sp* isolados do leite de propriedades orgânicas e convencionais, Roesch *et al.* (2006), não encontraram diferença significativa na resistência entre os dois sistemas de criação.

Dentre os antimicrobianos estudados, destaca-se a vancomicina, que possui uso restrito em medicina veterinária e grande importância em medicina humana, tendo sido observada resistência em uma amostra e sensibilidade com crescimento de colônias satélite em duas amostras.

A vancomicina pertence à classe dos glicopeptídeos tricíclicos e tem como indicações, entre outras, as infecções graves por *Staphylococcus* e as septicemias bacterianas.

Os glicopeptídeos, principalmente a vancomicina, tornaram-se uma das poucas alternativas terapêuticas eficazes no tratamento de infecções causadas por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (ORSA), porém, tem sido descrita a emergência de cepas desta bactéria resistentes à vancomicina (FREITAS, *et al.*, 1991 ; OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Oliveira *et al.* (2001), ao estudarem a resistência à vancomicina de 395 cepas ORSA de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes hospitalizados, encontraram frequência elevada de resistência, indicando a necessidade de maior vigilância quanto aos níveis de sensibilidade à vancomicina.

Na atualidade, o uso deste antibiótico vem sendo questionado devido ao elevado percentual de falhas terapêuticas constatadas na prática clínica da Medicina humana (DERESINSKI, 2007 apud LOPES, 2007).

Resistência à vancomicina em *Enterococcus* isolados de fezes de suínos e aves foi comprovada por Aarestrup *et al.* (1996). Este fato foi associado ao uso da avoparcina como aditivo em rações, comprovando resistência cruzada entre os dois antimicrobianos. A partir de 1997, a avoparcina passou a ser proibida como aditivo em rações na União Européia (POETA *et al.*, 2005).

Os *Enterococcus* resistentes à vancomicina apresentam grande importância na área médica, pois podem provocar surtos de infecção hospitalar de difícil controle, causando infecções graves e de limitadas opções terapêuticas (PALERMO NETO e ALMEIDA, 2006).

O conhecimento dos padrões de resistência antimicrobiana que apresentam os micro-organismos é de fundamental importância no desenvolvimento de métodos

preventivos que sejam efetivos, assim como para a elaboração de estratégias de tratamento quando as mesmas se fizerem necessárias (SABOUR *et al.*, 2004 apud ZAFALON *et al.*, 2008).

5 CONCLUSÃO

Os resultados observados permitem concluir que:

A percepção dos estudantes em relação aos fatores que podem representar pontos críticos durante a ordenha se modificou durante a pesquisa.

O pré-dipping é uma importante ferramenta para reduzir a contaminação da pele dos tetos, ficando evidente o potencial risco à contaminação do leite quando não praticado.

A avaliação da contagem bacteriana das superfícies das teteiras da ordenhadeira mecânica não indicou riscos à qualidade do leite quando as mesmas encontravam-se higienizadas. A observação da evolução na contagem bacteriana durante a ordenha evidenciou a interação entre teteira/pele do teto/leite ordenhado, sendo esta interação o risco potencial à qualidade do leite.

A resistência a antimicrobianos observada entre isolados de *Staphylococcus sp* foi relevante, não estando de acordo com o esperado, principalmente quando relacionada à vancomicina, representando um ponto crítico à obtenção de leite com qualidade.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. *et al.* Glycopeptide Susceptibility among Danish *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Isolates of Animal and Human Origin and PCR Identification of Genes within the VanA Cluster. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 40, n. 8, p. 1938-1940. 1996.

ALMEIDA, A. C. de *et al.* Características Físico-químicas e Microbiológicas do Leite Cru Consumido n Cidade de Alfenas, MG. **R. Un. Alfenas**, Alfenas, v. 5. 1999.

AMARAL, L. A. *et al.* Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesq. Vet. Bras.** V. 24, n. 4, p. 173-177. 2004.

ANDREOTTI, R. e NICODEMO, M. L. F. **Uso de Antimicrobianos na Produção de Bovinos e Desenvolvimento de Resistência**. Série Documentos 144. EMBRAPA, novembro 2004.

ARAÚJO, W. P. Fagotipagem de Cepas de *Staphylococcus aureus* Resistentes a Antibióticos, Isoladas de Leite. Braz. **J.Vet. Res. Anim. Sci.** V. 35, n. 4, p. 161-165. 1998.

ARCURI, E. F. *et al.* Qualidade do Leite Refrigerado nas Fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 440 – 446, 2006.

BADARÓ, A. C. Leal; ARAÚJO, T. F.; CARVALHO, A. F. Análise da Contaminação Microbiológica, Mesófilos Proteolíticos e Lactofermentadores do Leite Cru Comercializado no Município de Ipatinga, Minas Gerais. Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.62, n. 357, p. 293 – 299. 2007.

BAUER, M.D. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** 45(4):493-496. 1966.

BILLA, R. *et al.* **O Sistema APPCC na Segurança Alimentar Industrial**. 14º POSMEC: Simpósio do Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica. Universidade Federal de Uberlândia, MG. 2004.

BORDENAVE, J. E. D. **O que é comunicação rural?** 3. ed. São Paulo: Brasiliense, 1988. 104p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Brasília, DF. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, de 20/09/2002, seção 1, p.13-22.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf>. Acesso em: 10/10/2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). XIX Congresso Nacional de Laticínios. Mesa Redonda: **“Segurança Alimentar na Cadeia do Leite”. Controle de Alimentos – Aplicação dos Princípios de Análise de Riscos**. 17 de julho de 2002.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P. e; VERNEQUE, R. da S. Contagem Bacteriana da Superfície de Tetos de Vacas Submetidas a Diferentes Processos de Higienização, Incluindo a Ordenha Manual com Participação do Bezerro para Estimular a Descida do Leite. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 30, n. 5, 2000.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A . S.; CARMO, R. A . Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arq. Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Juiz de Fora, v. 53, n.5, p.531-537, 2001.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade Inata da Glândula Mamária Bovina: Resposta à Infecção. **Ciência Rural**. V. 39, n. 6. Santa Maria. 2009.

CORBIA A. C. G. *et al.* ***Staphylococcus aureus*: Importância para a Saúde Pública e Aspectos Epidemiológicos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. 2000. 15p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 114).

COSTA, F. F. da. **Interferência de Práticas de Manejo na Qualidade Microbiológica do Leite Produzido em Propriedades Rurais Familiares**. Jaboticabal, 2006. 80 p. Dissertação (Mestrado). Unesp, *campus* Jaboticabal.

DÜRR, J. W. Tendências e Avanços do Agronegócio do Leite nas Américas: Mais Leite = Mais Saúde. **Controle de qualidade e aumento da competitividade da indústria láctea**. Disponível em: http://www.cbql.com.br/index.php?option=com_. Acesso em 17/07/2008.

FAGUNDES, C. M. *et al.* Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 36, n. 2, 2006.

FAGUNDES, H. e OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas Implicações em Saúde Pública. **Ciência Rural**. Santa Maria. V. 34, n. 4, p. 1315-1320. 2004.

FERREIRA, D.F. **SISVAR 5.0**. Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2003.

FIGUEIREDO, V. F.; COSTA NETO, P. L. de O. Implantação do HAACCP na Indústria de Alimentos. **GESTÃO & PRODUÇÃO**, v.8, n.1, p.100-111, 2001.

FONTANA, V. L. D. S. Etiologia da mastite bovina subclínica da região de Jataí/GO. Padrão genético e de suscetibilidade a drogas antimicrobianas com ênfase ao gênero *Staphylococcus*. Araraquara, **Universidade Estadual Paulista Julia de Mesquita Filho**, 2002. 61p.

FRANCO, B. G. M. F; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FREIRAS, M. F. L. *et al.* Exotoxinas Estafilocócicas. **Ciênc. Vet. Tróp.** Recife-PE, v. 7, n. 2 e 3, p. 63-74. 2004.

FREITAS, C.C. *et al.* Tolerância a antibióticos em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes do HUAP-UFF. **Arq. Bras. Med.**, 65: 116S, 1991.

GALTON, D. M.; L. G. PETERSON; W. G. MERRILL. Effects of Premilking Udder Preparation Practices on Bacterial Counts in Milk and on Teats. **Journal of Dairy Science**, v. 69. 1986.

GALTON, D. M.; PETERSON, L.G.; MERRIL, W.G. PRODUCTION TECHNICAL NOTES: Evaluation of Udder Preparations on Intramammary Infections. **Journal of Dairy Science**, v. 71. 1988.

GILSON, W. D. **Questions and Answers about Pre-dipping**. Disponível em: <http://www.caes.uga.edu/departments/ads/documents/QuestionsandAnswersAboutPre-Dipping.pdf>. Acesso em: 22/11/2009.

GLESSON, D; O'BRIEN B.; FLYNN J.; O' CALLAGHAN, E.; GALLI, F. Effect of pre-milking teat preparation procedures on the microbial count on teats prior to cluster application. **Irish Veterinary Journal** V. 62 N. 7. 2009

GUERREIRO, P. K. *et al.*. Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas Profiláticas no Manejo de Produção. **Ciências Agrotécnicas**. Lavras, v. 29, n.1, p. 216 – 222. 2005.

GONÇALVES, P. M. R. Toxinfecções alimentares: uma revisão. 1998. **Rev. Hig. Alim.**, 12(53): 38-43.

HAGUETE, T. M. F. Metodologias Qualitativas na Sociologia. 6 ed. Petrópolis: Vozes, 1999.

HARMON, R. J. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. **J. Dairy Science**. v. 77. 1995.

HOGAN, J. S.; WHITE, D.G.; PANKEY, J. W. Effects of Teat Dipping on Intramammary Infections by Staphylococci other than *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Science**, v. 70. 1987.

HOLMBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. **Acta Vet Scand**. 1973, 45: 1-144.

INGALLS, W. Industry Presentation. **Procedures and Products Required for Milking Center Efficiency, Mastitis Control and Production of High Quality Milk**. High Plains Dairy Conference. 2006.

KACHATOURIANS, G. G. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. **CMAJ**, v.159, n.9, p.1129-1136, 1998.

LAMAITA, H.C. *et al.* Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 57, n. 5. 2005

LEVY, S. B. The Challenge of Antibiotic Resistance. **Scientific American**. March, 1998.

LOPES, H. V. O Papel Atual da Vancomicina nas Infecções Estafilocócicas. **Rev. Panam. Infectol**. v. 9, n. 3, p. 70-71. 2007.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal Medicine**, v. 339, n.8, p. 520-532, 1998.

MALLET, A. *et al.* Quantificação e Identificação de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas Hydrophila* de Águas Utilizadas em Pequenas Propriedades Leiteiras. Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios. **Revista**

do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v.62, n. 357, p. 394 – 400. 2007.

MARIANO F. A. *et al.* Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de leite de cabras do estado do Rio de Janeiro. **R. Bras. Ci. Vet.** v. 14, n. 2, p. 105-110. 2007.

MARQUES, S. C. *et al.* Tanques de Resfriamento de Leite: Processo de Higienização. Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.62, n. 357, p. 406 – 501. 2007.

MEDEIROS, E. F.; *et al.* Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesq. Vet. Bras.** v. 29, n. 7, p. 569-574. 2009.

MOTA, R. A. *et al.* Utilização Indiscriminada de Antimicrobianos e sua Contribuição à Multirresistência Bacteriana. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MÜLLER, E. E. Qualidade do Leite, Células Somáticas e Prevenção da Mastite. Anais do II Sul-Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. Maringá:UEM/CCA/DZO – NUPEL. 2002

NERO, L. A. *et al.* Leite Cru de Quatro Regiões Leiteiras Brasileiras: Perspectivas de Atendimento dos Requisitos Microbiológicos Estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25 (1), p. 191 – 195. 2005.

OLIVAL, A. A. *et al.* Avaliação das Limitações para Melhoria da Qualidade do Leite na Região de Pirassununga – SP. **Revista Ciência em Extensão**. 2004.

OLIVEIRA, G. A.; LEVY, C. E.; MAMIZUKA, E. M. Estudo do perfil de resistência de 626 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de 25 hospitais brasileiros entre setembro de 1995 e junho de 1997. **J. Bras. Pat.**, v.36: 147-56, 2000.

OLIVEIRA, G. A. *et al.* Avaliação da tolerância à vancomicina em 395 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **J. Bras. Pat.**, v.37, n. 4, 2001.

OLIVEIRA, M. M. de; BRUGNERA, D. F.; PICOLLI, R. H. Avaliação da Qualidade Microbiológica do Leite Cru e Eficiência de Ordenha Mecânica de Pequenas Propriedades Leiteiras do Município de Campo Belo – MG. Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.62, n. 357, p. 124 - 130. 2007.

PALERMO NETO, J. P. e ALMEIDA, R. T. Antimicrobianos como Aditivos em Animais de Produção. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

PANKEY, J. W.; WILDMAN, E. E.; DRECHSLER, P.A.; HOGAN, J.S. Field Trial Evaluation of Premilking Teat Disinfection. **J. Dairy Science**, v. 70. 1987.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão Bacteriana em Superfície de Serviços de Alimentação Hospitalar Avaliada pela Microscopia de Epifluorescência**. Viçosa, MG, 1998, 57 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa.

PEDRINI, S. C. B. e MARGATHO, L. F. F. Sensibilidade de Micro-organismos Patogênicos Isolados de Mastite Clínica em Bovinos Frente a Diferentes Tipos de Desinfetantes. **Arq. Inst. Biol.**, v. 70, n. 4, p. 391-395. 2003.

PERECMANIS, S. *et al.* **Utilização do Resultado da Contagem Bacteriana Total do Leite de Latões para a Elaboração de Curso de Capacitação de Pequenos Produtores de Leite no Projeto Unai**. Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural. XIV Congresso da SOBER. 2006.

PINTO, C. L. de O *et al.*. Qualidade Microbiológica de Leite Cru Refrigerado e Isolamento de Bactérias Psicotróficas Proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26 (3), p. 645 – 651. 2006.

POETA, P.; ANTUNES, T.; RODRIGUES, J. *Enterococcus spp* Isolados de Fezes de Frangos, Pombos, Gamos e Ratos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** V. 58, n. 3, p. 412-414, 2005.

QUINN, P. J. *et al.* **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N.E.. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus sp.* isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.

RENDOS, J. J.; EBERHART, R.J.; KESLER, E. M. Microbial Populations of Teat Ends of Dairy Cows, and Bedding Materials. **J. Dairy Sci.** V. 58, n. 10. 1975.

RIBEIRO, M. G. *et al.* Micro-organismos Patogênicos, Celularidade e Resíduos de Antimicrobianos no Leite Bovino Produzido no Sistema Orgânico. **Pesq. Vet. Bras.** v. 29, n. 1. 2009.

RODRIGUEZ, J. A. G. *et al.* **Procedimientos en microbiología clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos**. 2000.

Disponível em: < <http://www.seimc.org/protocolos/cap11.htm> >. Acesso em 15/06/2010.

ROESCH, M *et al.* Comparison of Antibiotic Resistance of Udder Pathogens in Dairy Cows Kept on Organic and on Conventional Farms. **J. Dairy Science**. v. 89. 2006.

SANTANA, E. H. W. de *et al.*. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos. **Semina: Ci. Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 145-154. 2001

SANTOS, M. V. dos; FONSECA, L. F. L. **Qualidade Microbiológica do Leite: métodos de análise e estratégias de controle**. Curso on line: Monitoramento da Qualidade do Leite. Agripoint. Disponível em: <<http://www.unitins.br/ates/arquivos>>. Acesso em 01/09/2008.

SANTOS, M. V. dos; FONSECA, L. F. L. **Micro-organismos Psicotróficos Afetando a Qualidade do Leite**. Curso on line: Monitoramento da Qualidade do Leite. Agripoint. Disponível em: <<http://www.unitins.br/ates/arquivos>>. Acesso em 01/09/2008.

SANTOS, M. V. dos; FONSECA, L. F. L. **Micro-organismos Patogênicos e Qualidade do Leite**. Curso on line: Monitoramento da Qualidade do Leite. Agripoint. Disponível em: <<http://www.unitins.br/ates/arquivos>>. Acesso em 01/09/2008

SCHULTZE, W. D. Control of New Intramammary Infection at Calving by Prepartum Teat Dipping. **J. Dairy Sci.**, v. 68. 1985.

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**. 2000. 75 p Tese (Doutorado) - Escola Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SILVA, V. A. de M. da *et al.* Avaliação da Qualidade Físico-química e Microbiológica do Leite Cru, do Leite Pasteurizado Tipo A e de Pontos de Contaminação de uma Granja Leiteira no RS. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 1, p. 51-57. 2010.

SPEXOTO, A A.; OLIVEIRA, C. A. F.; OLIVAL, A. de A. Aplicação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle em Propriedade Leiteira Tipo A. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1424 – 1430. 2005.

SPINOSA H.S.; **Antibióticos: Aminoglicosídeos, Polimixinas, Bacitracina e Vancomicina**. In _____ GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SVEUM, W. H., *et al.* Microbiological monitoring of the food processing environment. In: VANDERZANT, C. *et al.* **Compendium of Methods for the Examination of Foods**. 4 ed. Washington: APHA. 2001.

VALERIANO, C. *et al.* Identificação de Bactérias Gram-negativas Isoladas de Tanques de Refrigeração por Expansão. Anais do XXIV Congresso Nacional de Laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.62, n. 357, p. 467 - 470. 2007.

VIALTA, A.; MORENO, I.; VALLE, J. L. E. do. Boas Práticas de Fabricação, Higienização e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle na Indústria de Laticínios: 1 – Requeijão. **Indústria de Laticínios**, p. 56 – 63. 2002.

WATTS, J.L. Etiological agent of bovine mastitis. **Vet. Microbiol.**, v.16, p.41-66, 1988.

ZAFALON, L. F. *et al.* Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. v. 67, n. 2, p. 118-125. 2008.

ANEXO 1**MINI-CURSO BOAS PRÁTICAS NA ORDENHA**

Nome:

Idade:

É produtor de leite? () Sim () Não

Se sim, cite: Número de animais:

Área da propriedade:

Quanto ao manejo na ordenha:

a) Pré-dipping é:

- () A limpeza da sala de ordenha
- () A antissepsia dos tetos das vacas antes da ordenha
- () A limpeza dos equipamentos de ordenha
- () Um tipo de produto utilizado durante a ordenha
- () Uma raça de bovino leiteiro

b) CMT é:

- () Um teste para detectar limpeza na sala de ordenha
- () Controle e monitoramento de tubulações (de ordenhadeira mecânica)
- () Um equipamento para monitorar o resfriamento do leite
- () California mastitis test: um teste para detectar mastite subclínica
- () Um teste para monitoramento de colméias

c) São práticas recomendadas na ordenha:

- () Eliminar os três primeiros jatos de leite
- () Coletar todo o leite desde os primeiros jatos

- () Oferecer alimento aos animais durante a ordenha
- () Oferecer alimento aos animais após a ordenha

- () Realizar antissepsia dos tetos dos animais após a ordenha
- () Realizar antissepsia dos tetos dos animais antes da ordenha

d) Podem representar “pontos críticos” (riscos) à obtenção de leite com qualidade durante a ordenha:

- () Água utilizada na higienização
- () Mãos do ordenhador na ordenhadeira mecânica
- () Mãos do ordenhador na ordenha manual
- () Roupa do ordenhador
- () Teteiras da ordenhadeira mecânica
- () Outros equipamentos da ordenhadeira mecânica
- () Utensílios para ordenha manual, como, balde
- () Pele do teto
- () Úbere