

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E
SAÚDE ANIMAL



**PERFIL MICROBIOLÓGICO EM REBANHOS LEITEIROS DE
AGRICULTURA FAMILIAR DA REGIÃO DO ARENITO CAIUÁ,
NOROESTE DO PARANÁ**

RAFAELA ROSA MAIOCHI

UMUARAMA – PR
AGOSTO, 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E
SAÚDE ANIMAL

**PERFIL MICROBIOLÓGICO EM REBANHOS LEITEIROS DE
AGRICULTURA FAMILIAR DA REGIÃO DO ARENITO CAIUÁ,
NOROESTE DO PARANÁ**

Nível: Mestrado

Área de concentração: Microbiologia

Linhas de pesquisa: Resistência e Sensibilidade Bacterianas

Autora: Rafaela Rosa Maiochi

Orientadora: Prof^a Dr^a Sheila Rezler Wosiacki

Dissertação apresentada como parte das exigências ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal da Universidade Estadual de Maringá para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

UMUARAMA - PR

AGOSTO, 2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

M227p

Maiochi, Rafaela Rosa

Perfil microbiológico em rebanhos leiteiros de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá, Noroeste do Paraná / Rafaela Rosa Maiochi. -- Umuarama, PR, 2021.
55 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Sheila Rezler Wosiacki.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, 2021.

1. Leite - Qualidade. 2. Mastite bovina. 3. Biofilmes. 4. Resistência antimicrobiana. 5. Agricultura familiar - Arenito Caiuá - Noroeste do Paraná (Estado). I. Wosiacki, Sheila Rezler, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Medicina Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal. III. Título.

CDD 23.ed. 636.08

Elaine Cristina Soares Lira - CRB-9/1202

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafaela Rosa Maiochi

Perfil Microbiológico em Rebanhos
Leiteiros de Agricultura Familiar da Região
do Arenito Caiuá, Noroeste do Paraná

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Veterinária pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

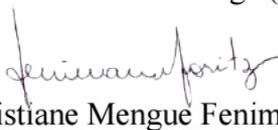
COMISSÃO JULGADORA


Profª. Dra. Sheila Rezler Wosiacki

Universidade Estadual de Maringá (Presidente)


Prof. Dr. Mauro Henrique Buêno de Camargo

Universidade Estadual de Maringá (Membro)


Profª. Dra. Cristiane Mengue Feniman Moritz

Universidade Estadual de Maringá (Membro)

Aprovada em: 27 de agosto de 2021.

Local da defesa: Remota.

AGRADECIMENTOS

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização dessa pesquisa.

Aos produtores que se propuseram a contribuir, ao Instituto de Desenvolvimento Rural (IDR) do Paraná pelo apoio e parceria, ao Laboratório do Programa de Análise do Leite da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) pela disponibilidade.

Aos educadores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal e Produção Sustentável da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Campus Umuarama - PR.

À UEM pela possibilidade de estudar e de construir conhecimento.

Aos integrantes dos laboratórios de Microbiologia (Fazenda e CTC), Campus Umuarama – PR, por todo auxílio prestado, indispensável para a realização dessa pesquisa, e pelo companheirismo, guardo vocês com muito carinho.

À professora Dr^a. Cristiane Mengue Feniman Moritz pela paciência, motivação, ideias, sugestões e críticas e à professora Dr^a. Sheila Rezler Wosiacki, minha orientadora, por toda a dedicação e paixão pela ciência e por me apoiar nessa caminhada.

Aos meus pais, irmã e meu amor pelo amparo, carinho, cuidado e apoio.

PERFIL MICROBIOLÓGICO EM REBANHOS LEITEIROS DE AGRICULTURA FAMILIAR DA REGIÃO DO ARENITO CAIUÁ, NOROESTE DO PARANÁ

RESUMO

A Contagem de Células Somáticas (CCS) e a Contagem de Bactérias Totais (CBT) determinam a qualidade microbiológica do leite, pois estão relacionadas à saúde dos animais e técnicas de manejo do rebanho. Uma das principais causas da diminuição dessa qualidade são as mastites, que continuam sendo um dos principais problemas sanitários nos animais destinados à produção de leite. As infecções crônicas estão associadas ao crescimento bacteriano em forma de biofilme, estando diretamente relacionado à persistência das bactérias na glândula mamária e resistência a antimicrobianos. Desse modo, os objetivos desse estudo foram: instruir as boas práticas de manejo do rebanho leiteiro em propriedades de agricultura familiar, avaliar a qualidade do leite por meio da CCS e CBT, avaliar a produção fenotípica de biofilme do leite cru bovino, identificar os grupos bacterianos presentes nos rebanhos, avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana das estirpes isoladas por meio da realização de antibiograma, detectando cepas resistentes de interesse em saúde pública, utilizar os resultados obtidos para implantar melhorias nas propriedades de agricultura familiar quanto ao correto diagnóstico e tratamento das infecções da glândula mamária. Foram coletadas 422 amostras de leite de animais em lactação em quatro propriedades de rebanhos leiteiros de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá, Noroeste do Paraná. Quanto à qualidade do leite, 38,86% de todas as amostras coletadas durante o período de estudo apresentaram CCS acima de 500.000 células/mL, e 56,25% das amostras dos tanques de expansão apresentaram CBT acima dos limites máximos estabelecidos pela IN 77. A produção fenotípica de biofilme foi caracterizada em 55,4% das amostras de leite cru bovino avaliadas. Foram isoladas cepas bacterianas em 41,7% das amostras coletadas. Dessas, 24,43% pertencentes ao grupo dos gêneros *Enterococcus* spp./*Streptococcus* spp., 62,5% ao gênero *Staphylococcus* spp., 12,5% ao grupo das Enterobactérias e 0,56% de Bactérias Gram Negativas Não Fermentadoras (BGN-NF). Das cepas bacterianas isoladas, 60,8% apresentaram resistência fenotípica a, pelo menos, um dos antibióticos testados. Os resultados indicam que processo de obtenção do leite e a sanidade da glândula mamária dos rebanhos leiteiros de agricultura familiar estudados ainda são insatisfatórios. Os produtores necessitam de assistência técnica contínua para buscar melhorias da qualidade do produto e se adequar aos novos padrões determinados pela normativa vigente.

Palavras-chave: biofilme, mastite bovina, qualidade do leite, resistência antimicrobiana

MICROBIOLOGICAL PROFILE IN FAMILY FARMING DAIRY HERDS IN THE CAIUÁ ARENITO REGION, NORTHWEST PARANÁ

Abstract

The concentration of somatic cells and bacteria determines the quality of the milk, these are related to the health of the animals and herd management techniques. One of the main causes of the decrease in milk quality is mastitis, which continues to be one of the main health problems in the milk production chain. Chronic infections are associated with bacterial growth in biofilm form, being directly related to the persistence of bacteria in the mammary gland and resistance to antimicrobials. The objectives of this study were: to instruct the good management practices of the dairy herd in family farming properties; assess milk quality through CCS and CBT; evaluate the phenotypic biofilm production of raw bovine milk; identify the bacterial groups present in the herds; Evaluate the antimicrobial sensitivity profile of the isolated strains by performing an antibiogram, detecting resistant strains of interest to public health; use the results obtained to implement improvements in family farming properties regarding the correct diagnosis and treatment of mammary gland infections. A total of 422 milk samples were collected from lactating animals from four properties of family farming dairy herds in the region of Arenito Caiuá, northwestern Paraná. As for milk quality, 38.86% of all samples collected during the study period had CCS above 500,000 cells/mL, and 56.25% of the expansion tank samples had CBT above the maximum limits established by IN 77. The phenotypic production of biofilm was characterized in 55.4% of the raw bovine milk samples evaluated. Bacterial strains were isolated in 41.7% of the collected samples. Of these, 24.43% belonged to the *Enterococcus* spp./*Streptococcus* spp. group, 62.5% to the *Staphylococcus* spp., 12.5% to the Enterobacterial group, and 0.56% to BGN-NF. Of the bacterial strains isolated, 60.8% showed phenotypic resistance to at least one of the antibiotics tested. The results show that the process of obtaining milk and the health of the mammary gland in the studied family farm dairy herds are still unsatisfactory. Producers need continuous technical assistance to seek improvements in product quality and adapt to the new standards determined by current regulations.

Keywords: antimicrobial resistance, biofilm, bovine mastitis, milk quality.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características indicadoras de mastite ambiental e contagiosa	9
Tabela 2. Relação entre o número de amostras coletadas e a CCS (cél.mL ⁻¹), das quatro propriedades de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá avaliadas, no período de fevereiro a junho de 2019.	19
Tabela 3. Valores de CBT (UFC.mL ⁻¹) dos resfriadores das quatro propriedades de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá avaliadas, no período de fevereiro a junho de 2019.	20
Tabela 4. Porcentagem de amostras fenotipicamente produtoras de biofilme em leite cru bovino das quatro propriedades de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá avaliadas, no período de fevereiro a maio de 2019.	21
Tabela 5. Amostras de leite de mastite clínica e subclínica analisadas e classificadas em grupos bacterianos, das quatro propriedades de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá todo o período avaliado, fevereiro a junho de 2019.	22
Tabela 6. Resistência por disco-difusão das estirpes isoladas das 4 propriedades de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá, em todo o período de avaliação, fevereiro a junho de 2019.	23

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

>: maior que

<: menor que

APCBRH: Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa

BGN-NF: Bactérias Gram Negativas Não Fermentadoras

CBT: Contagem Bacteriana Total

CCS: Contagem de Células Somáticas

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMT: *California Mastitis Test*

CNA: Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil

CRA: Ágar Vermelho Congo

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPS: Substâncias Poliméricas Extracelulares

EUCAST: *European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDR: Instituto de Desenvolvimento Rural

IN: Instrução Normativa

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PIB: Produto Interno Bruto

PRONAF: Programa de Fortalecimento da Agricultura Familiar

SAL: Sistema Agroindustrial do Leite

UEM: Universidade Estadual de Maringá

UFC: Unidade Formadora de Colônias

SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1. Agricultura familiar e a pecuária leiteira	1
1.2. Qualidade do leite	4
1.3. Mastite bovina.....	7
1.4. Uso de antimicrobianos e resistência antimicrobiana.....	10
1.5. Biofilme	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Coleta das amostras e análises de CCS e CBT	15
3.2. Detecção fenotípica de produção de biofilme.....	16
3.3. Isolamento e caracterização do grupo bacteriano	17
3.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	18
3.5. Extensão rural	18
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
8. DIRETRIZES PARA AUTORES REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIA VETERINÁRIA	32
9. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	35

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Agricultura familiar e a pecuária leiteira

O agronegócio é o setor com maior participação no Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro. Em 2019, a soma de bens e serviços gerados no agronegócio chegou a R\$ 1,55 trilhão ou 21,4% do PIB. Dentre os segmentos, a segunda maior parcela é do ramo agrícola, que corresponde a 68% desse valor (R\$ 1,06 trilhão), a pecuária corresponde a 32% ou R\$ 494,8 bilhões (CNA, 2020).

A bovinocultura leiteira é uma das atividades mais representativas da pecuária brasileira. A partir de 2013, o país passou a ser considerado o quarto maior produtor mundial de leite, com uma produção anual superior a 24 mil toneladas (FAO, 2013; EMBRAPA, 2019).

A pecuária leiteira exerce um amplo papel na sociedade brasileira, uma vez que garante o sustento de grande número de famílias voltadas a esse ramo de atividade. O leite faz parte de uma cadeia produtiva presente nos diferentes estabelecimentos agropecuários do Brasil, sendo que sua produção tem aumentado gradativamente, estimulada pelo incremento da capacidade produtiva e pelo aumento do consumo da sociedade brasileira. No Brasil, a atividade leiteira está muitas vezes ligada a produção de cunho familiar, ou seja, aquela praticada em pequenas propriedades e desenvolvida pelo proprietário da terra e sua família.

As diretrizes que definem o perfil do agricultor familiar estão determinadas pela Lei 11.326, de 24 de julho de 2006. É considerada agricultura familiar o estabelecimento rural que possui gestão da propriedade compartilhada pela família e a atividade produtiva agropecuária é a principal fonte de renda, normalmente aliada à produção de subsistência em conjunto com uma produção destinada ao mercado (BRASIL, 2006).

O reconhecimento da existência da agricultura familiar ocorreu a partir da década de 1990, o qual se deu principalmente por meio de movimentos sociais e por meio da legitimação do Estado com a implantação de políticas públicas como o Programa de Fortalecimento da Agricultura Familiar (PRONAF) (DALCIN, TROIAN; OLIVEIRA, 2008).

De acordo com o último Censo Agropecuário (2017), a agricultura familiar é a base da economia de 90% dos municípios brasileiros com até 20 mil habitantes. Ao todo, entre as mais de 5 milhões de propriedades rurais de todo o Brasil, 77% (cerca de 3.9 milhões) são estabelecimentos agrícolas classificados como pertencentes à agricultura familiar. O índice no estado do Paraná é semelhante ao registrado em nível nacional, a agricultura familiar domina os estabelecimentos rurais, entre as mais de 305 mil propriedades do Estado, quase 229 mil são de agricultores familiares, o que representa 75% do total.

Ocupando apenas 23% da área total dos estabelecimentos agropecuários brasileiros, a agricultura familiar é responsável pela renda de aproximadamente 40% da população economicamente ativa e por mais de 67% de brasileiros ocupados no campo, empregando mais de 10,1 milhões de pessoas (IBGE 2017). De acordo com os dados do Censo Agropecuário 2017, a agricultura familiar foi responsável por 64,2% da produção de leite no país no período de referência do censo (1 de outubro de 2016 a 30 de setembro de 2017).

O Estado do Paraná se destaca na produção de leite no Brasil e atualmente é o terceiro maior produtor com 3,9 bilhões de litros por ano e representa a cadeia produtiva mais importante para os agricultores familiares do Estado. Essa produção é obtida por 110.000 produtores, dos quais 86% são pequenos produtores com até 250 litros/dia (IDR, 2021). Esses números revelam que a agricultura familiar tem uma importância socioeconômica fundamental, tanto na geração de renda como na ocupação de mão de obra e no abastecimento de alimentos no país.

No entanto, embora apresente potencial econômico e social considerável, a agricultura familiar enfrenta dificuldades próprias, características de uma atividade que, segundo Batalha *et al.* (2005), é exercida por produtores pouco qualificados e inseridos em um ambiente altamente competitivo e tecnificado, como o da agricultura brasileira. Segundo Abramovay (1998), algumas restrições ao desenvolvimento da agricultura familiar no Brasil são a dificuldade na construção de capital social e na inserção nos mercados, fatores que impedem que os agricultores familiares valorizem os atributos de sua localização, construam mercados e transformem ao seu favor o ambiente institucional no qual estão inseridos.

Muitos setores produtivos são capazes de associar suas empresas a fim de defender interesses comuns, mas no caso do setor agropecuário, a consolidação de grupos que alvejam ideais parecidos é uma tarefa intrincada e às vezes inviável. O grande número de unidades de produção rural diverge em termos de tamanho, capital e tecnologia, tornando as prioridades individuais diferentes. No caso das propriedades de menor porte, o problema é acentuado, dada à diversidade de sistemas e estratégias produtivas que determinam objetivos difusos. Por consequência, a força do setor é diluída em grupamentos locais (GUILHOTO *et al.*, 2006).

Assim como observado no cenário nacional, a região do Arenito Caiuá, no noroeste do Paraná tem como características de produção leiteira o pequeno estabelecimento rural, com administração de base familiar, produção animal a pasto e tamanho do rebanho variando de acordo com o tamanho da propriedade e nível de tecnificação.

Nos últimos anos, houve uma série de mudanças no Sistema Agroindustrial do Leite (SAL) que impactaram cada segmento de forma particular. Para os produtores de leite, a principal mudança foi a maior necessidade de especialização e profissionalização na atividade, o que criou

algumas dificuldades, principalmente para a agricultura familiar, devido à dificuldade financeira para se adequar às mudanças (SOUZA *et al.*, 2013).

Há contínua necessidade de transferir tecnologias e conhecimentos aos produtores e aos profissionais extensionistas, que sejam adequadas às circunstâncias de escassez de capital e às adversidades físicas e produtivas das propriedades de agricultura familiar. Fatores como as limitações de recursos físicos e financeiros, a falta de informação, a deficiente política de preços do produto, a inadequação de tecnologia a seus recursos naturais e as limitações de ordem econômica dificultam a manutenção desse pequeno produtor na atividade, limitando o seu desenvolvimento. (BARBOSA, 1978; SANTOS, 1986).

Um instrumento para o fortalecimento da atividade é a oferta de assistência técnica e extensão rural, com a finalidade de promover conhecimento no ramo agropecuário e difundir as inovações no meio rural (CASTRO, 2015). Não limitando apenas às tarefas agrícolas estritamente produtivas, mas também com o objetivo de proporcionar cidadania, desenvolvimento sustentável e a ampliação do acesso ao conhecimento e ao mercado (ABRAMOVAY, 1998).

No Estado do Paraná um dos órgãos que dão apoio aos agricultores rurais é o Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR Paraná, antiga EMATER – Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural), que contribui de forma social, assessorando e promovendo a garantia de direitos, aos diversos públicos do meio rural e suas organizações, por meio da assistência técnica e extensão rural social gratuita, com uma estrutura técnica capacitada, que além de executar as políticas públicas, orienta os agricultores nos aspectos de produção, gestão, organização e qualidade do leite (IDR, 2021).

Segundo o IDR Paraná (IDR, 2021), o desafio principal da atividade é aumentar a produtividade e a renda dos produtores que têm o leite como principal fonte de renda. Para tanto, é importante a ação do Estado para construir um ambiente propício em todos os segmentos da cadeia produtiva, para a adoção de tecnologias de produção e de industrialização, organização dos produtores e para estimular relações estáveis entre os diferentes segmentos da cadeia produtiva, especialmente entre os produtores e as indústrias de laticínios, visando garantir um processo de comercialização justo e seguro.

É igualmente importante a ação do Estado no sentido de promover o acesso dos produtores de leite às políticas públicas de crédito, de seguro, de garantia de preços, de mercados institucionais e de capacitação, como forma de estimular os investimentos e qualificar os processos de produção, de gestão e sucessão das unidades produtiva (IDR, 2021).

Estudos de Borchardt e Souza (2013) apontam que conforme os produtores de leite aderem às tecnologias em sua produção, a tendência é de que a produção leiteira tenha aumento considerável, impactando tanto na produção quanto na qualidade.

A agricultura familiar é de extrema importância para o país, seja pela quantidade de agricultores envolvidos, como pela garantia da produção de alimentos à população como um todo. Diante da importância e heterogeneidade da pecuária leiteira nacional, além da crescente atenção do mercado em relação à qualidade do leite, o diagnóstico das propriedades leiteiras se torna fundamental para identificar o perfil de produção adotado em diferentes regiões do Brasil (REIS *et al.*, 2020).

1.2. Qualidade do leite

Da grande variedade de alimentos disponíveis à população, o leite bovino destaca-se pela sua rica constituição, considerado um alimento muito nutritivo e de fácil assimilação. Como produto destinado à alimentação humana, espera-se que o leite a ser consumido apresente boas características microbiológicas (REZENDE *et al.*, 2000). Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 2017), entende-se por leite “o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas”.

A composição química do leite torna-o um alimento altamente perecível, com características intrínsecas ideais para o desenvolvimento de microrganismos, como elevado valor nutricional, alta atividade de água e pH próximo à neutralidade. Segundo Langoni *et al.* (2011), o leite é um meio propício para o desenvolvimento de microrganismos desejáveis e outros patogênicos, sendo necessários cuidados higiênico-sanitários adequados, desde a sua produção até o beneficiamento do produto.

Produzir leite com qualidade é o objetivo de toda a cadeia produtiva e para que seja alcançada deve-se assegurar que o leite destinado ao consumo seja extremamente saudável. No entanto, segundo Fonseca (2009) a qualidade do leite cru produzido no Brasil pode ser considerada como insatisfatória. Apesar de passar por um processo de tecnificação na atividade, problemas reprodutivos e a sanidade da glândula mamária ainda afetam diretamente a produtividade, a qualidade do leite e a rentabilidade de todo o rebanho leiteiro brasileiro.

Diante desse quadro, a partir do final da década de 1990, órgãos governamentais brasileiros intensificaram os esforços voltados a promover ajustes na cadeia produtiva do leite e no estabelecimento de normas legais de parâmetros mínimos mais rigorosos para a qualidade do leite (CERQUEIRA *et al.*, 2012). Dentre os parâmetros de qualidade que passaram a ser mais

monitorados ou sofreram constantes revisões de limites máximos, estavam os índices de Contagem de Células Somáticas no leite (CCS), Contagem Bacteriana Total (CBT) e os resíduos contaminantes no leite, garantindo uma composição adequada dos teores de proteína, gordura e lactose e preservando as características de gosto, cor e cheiro (PAIVA, 2010).

As células somáticas são as células de defesa do animal originadas do sangue que migram para o úbere junto às células de descamação da glândula mamária. Quando bactérias ou outro tipo de patógeno invadem o úbere de uma vaca, ocorre de imediato uma resposta inflamatória a essa invasão, deslocando as células de defesa do sangue e conseqüentemente aumentando o número de CCS no leite (EMBRAPA, 2019). A CCS se relaciona com a saúde do úbere do animal, quando presente no leite [>200 mil Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL)] é considerada mundialmente por profissionais e produtores como indicadora da incidência de mastite no rebanho (SANTOS, 2012).

Altas contagens de células somáticas no leite estão associadas à diminuição do rendimento na elaboração de queijos, aumentos das atividades lipolíticas e proteolíticas do leite e alterações sensoriais no leite e seus derivados (SANTOS *et al.*, 2006). Assim, a CCS é um método indireto de diagnóstico para o monitoramento da saúde da glândula mamária e da qualidade do leite oferecido para o consumo humano (BANSAL *et al.*, 2005).

A contagem de células somáticas é influenciada por vários fatores, mas especialmente pela presença de infecções intramamárias, tornando-se um indicador bastante confiável de sanidade da glândula mamária. Segundo Santos e Fonseca (2007), a elevação da CCS no leite do animal acima de 200.000 células/mL indica a ocorrência de mastite subclínica, a qual reduz a quantidade de leite produzido, além da redução na concentração dos componentes nobres do leite (gordura, caseína e lactose), assim como o aumento das concentrações de sódio e proteínas do soro. Porém, outros fatores podem interferir na CCS, tendo como exemplos a época do ano, raça, estágio de lactação, produção de leite, número de lactações, estresse causado por deficiências no manejo, problemas nutricionais, efeito rebanho, condições climáticas e doenças intercorrentes (OLIVEIRA, 2019).

Além da CCS, a qualidade do leite pode ser monitorada pela CBT, número de bactérias contidas no leite cujo valor numérico é expresso em UFC mL⁻¹ (EMBRAPA, 2018). Seu valor indica as condições gerais de higiene de ordenha e dos utensílios utilizados bem como da refrigeração do leite. Uma alta CBT é indicativa de uma baixa qualidade higiênico-sanitária do leite produzido, estando relacionada à contaminação do leite por bactérias, que podem ser originadas tanto do interior do úbere nos casos de mastite, quanto da superfície externa do úbere, mãos do ordenhador ou utensílios e equipamentos de ordenha (HILL *et al.*, 2011).

As concentrações de células somáticas e de bactérias determinam a qualidade do leite, portanto, cuidados no manejo do rebanho, sanidade dos animais, redução dos índices de mastite, obtenção higiênica do leite e armazenagem adequada exercem importante impacto nas características do produto final (MONTANHINI, 2018).

Segundo Tischer *et al.* (2018), a avaliação do leite pela CCS e CBT tem como objetivo prevenir a disponibilização ao consumidor de um produto com qualidade duvidosa, contaminado ou impróprio para o consumo, por questões sanitárias e de higiene, mas ambos os parâmetros estão relacionados e interferem na qualidade do produto para consumo direto ou para a produção de derivados.

Segundo Langoni (2013) a adoção de práticas de manejo profilático, por meio da capacitação de ordenadores quanto à limpeza e secagem do úbere a cada ordenha, uso do pré e pós-dipping, implantação da linha de ordenha, bem como a adoção de outras Boas Práticas de Ordenha são importantes na redução da CCS e CBT no leite.

Segundo Jamas *et al.* (2018), a baixa qualidade do leite pode ser atribuída às deficiências no manejo, higiene na ordenha, sanidade da glândula mamária, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, além de refrigeração ineficiente ou, até mesmo, inexistente. Por isso, cuidados higiênicos para evitar a contaminação do leite devem ter início na ordenha e seguir até o seu beneficiamento (SANTANA *et al.*, 2001).

As Instruções Normativas 76 e 77 (IN 76 e IN 77) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de 2018 são as mais recentes abordando medidas de controle nas etapas da cadeia produtiva do leite, desde a produção até os critérios finais de qualidade dos leites pasteurizados, incluindo a CBT e CCS, que devem ser seguidas tanto pelo produtor quanto pela indústria, para que se obtenham resultados dentro dos valores de referência cedidos pelas INs. (BRASIL, 2018).

De acordo com a IN 76, para o leite cru refrigerado a média geométrica trimestral da contagem bacteriana total não deverá ultrapassar 300 mil UFC mL⁻¹. Para a contagem de células somáticas a média geométrica trimestral máxima é estabelecida em 500 mil células mL⁻¹.

Para a obtenção de leite de melhor qualidade, além do controle de mastites deve haver um controle rigoroso no processo de ordenha, quanto aos aspectos higiênicos na preparação do animal com lavagem e desinfecção de tetos, higienização de teteiras e cuidados higiênicos do ordenhador. É importante o comprometimento de todos os envolvidos, com a consciência de que a qualidade do leite depende de todos, incluindo-se também os consumidores, que são os elementos finais da cadeia produtiva do leite (LANGONI, 2013).

As atividades de educação sanitária são relevantes para todos os envolvidos no processo produtivo em uma empresa rural e, especificamente no que se refere à cadeia produtiva do leite, os ordenhadores são os principais alvos a serem treinados e monitorados, a fim de se garantir a obtenção higiênica do leite e, conseqüentemente, um produto de melhor qualidade. Dessa forma, seguramente haverá redução na CBT, tanto em propriedades com sistema de ordenha manual como mecânica, bem como diminuição nas taxas de infecções intramamárias, que também estão diretamente relacionadas com o grau de sujidade e contaminação dos tetos (MANZI *et al.*, 2012).

De acordo com Dürr (2011), para melhorar a qualidade do leite no Brasil é necessário além da assistência técnica aos produtores, registrar o desempenho zootécnico dos animais, que permitem um planejamento estratégico da cadeia de lácteos, avaliação genética do rebanho e rastreabilidade dos animais e dos produtos lácteos.

A qualidade do leite nunca recebeu tamanha atenção no Brasil como nos últimos anos. Por isso, várias ações governamentais e do próprio setor lácteo, como regulamentação da produção, investimento financeiro e programas de segurança alimentar foram implementadas com o propósito de aumentar a produção de lácteos e melhoria da qualidade da matéria-prima. Isso representa um indício da influência positiva das Instruções Normativas sobre a cadeia produtiva de lácteos, ou mesmo a conscientização dos produtores e demais agentes integrantes do setor, quanto à necessidade e vantagens da melhoria da qualidade do leite cru refrigerado produzido no Brasil (GUIMARÃES, 2017).

1.3. Mastite bovina

Mastite é a inflamação da glândula mamária, cujos principais causadores são os microrganismos, tais como bactérias que são consideradas os agentes mais importantes, além de bolores, leveduras e algas. A resposta inflamatória da glândula mamária tem como objetivo a eliminação do microrganismo causador, a neutralização de toxinas e a regeneração dos tecidos danificados (SANTOS; FONSECA, 2019).

As células somáticas presentes no leite desempenham papel importante na defesa da glândula mamária contra os agentes infecciosos. Elas são constituídas principalmente pelos leucócitos, cuja função é a defesa do organismo, e compreendem vários tipos celulares. O processo inflamatório resultante da agressão à glândula mamária direciona os leucócitos do sangue para a região afetada e, conseqüentemente, aumenta a CCS no leite (MULLER, 2002).

As mastites continuam sendo um dos principais problemas sanitários nos animais destinados à produção de leite. É considerada a doença que acarreta maiores prejuízos econômicos devido à redução da quantidade e comprometimento da qualidade do leite produzido, às perdas na

evolução genética do rebanho e gastos com medicamentos, serviços veterinários e mão de obra extra, podendo levar à perda total da capacidade secretora da glândula mamária e descarte de animais (GOMES; HENRIQUES, 2016).

De acordo com sua manifestação, a mastite pode ser classificada em dois tipos, clínica ou subclínica. Na primeira há sinais evidentes da doença como edema, aumento de temperatura, rubor e dor na glândula mamária, e alterações macroscópicas do leite como a presença de grumos, podendo ser detectados por meio do teste da caneca de fundo preto. O animal também pode apresentar sinais clínicos sistêmicos como aumento de temperatura retal, depressão, anorexia e desidratação (SANTOS; FONSECA, 2007).

Já na manifestação subclínica não é possível visualizar alterações do processo inflamatório. Testes de campo, como o *California Mastitis Test* (CMT), ou laboratorial, como a CCS são necessários para identificar a mastite subclínica (PANTOJA *et al.*, 2009).

De acordo com Silva (2016), a ausência de sinais clínicos da mastite subclínica relaciona-se diretamente com a alta prevalência dessa doença nos rebanhos leiteiros. Estima-se que a mastite subclínica corresponde a 90-95% dos casos da doença nos rebanhos leiteiros e que sua prevalência seja de 15 a 40 vezes maior que a forma clínica (SANTOS; FONSECA, 2007).

Além das formas de manifestação clínica e subclínica, a mastite também é classificada de acordo com agente causador da infecção em contagiosa ou ambiental (KUANG *et al.*, 2009), sendo essa primeira ocasionada por microrganismos que colonizam o úbere, se multiplicam na glândula mamária infectada e é transmitida de animal para animal, ocasionando alta ocorrência de casos subclínicos. Já a segunda, é causada por microrganismos que se encontram no ambiente onde vivem os animais, capazes de invadir a glândula mamária e gerar respostas inflamatórias, sendo responsáveis por um alto número de casos clínicos (SANTOS; FONSECA, 2019, BERGONIER *et al.*, 2003).

Segundo Arcanjo *et al.* (2017), a mastite contagiosa tem como principal consequência perdas econômicas, uma vez que há diminuição na quantidade e qualidade do leite produzido, necessidade de uso de antibióticos e descarte de animais. Em relação à mastite ambiental, o principal prejuízo em termos econômicos está ligado à ocorrência de casos clínicos, redução na produção leiteira, descarte de leite com resíduos de antibióticos e aos gastos com medicação (LANGONI *et al.*, 2017).

Especificamente na mastite bovina pode-se afirmar que se trata de um entrave para a pecuária leiteira, repercutindo negativamente no que se refere à qualidade do leite, além de prejuízos econômicos e problemas de saúde pública (LANGONI *et al.*, 2017).

A múltipla etiologia da mastite contribui para o elevado impacto sobre a produção leiteira, segundo Bardiau *et al.* (2016), dentre os agentes responsáveis por esta enfermidade, destacam-se bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., que são os principais microrganismos envolvidos no processo patológico, representando cerca de 90 a 95% de todas as infecções dos rebanhos leiteiros.

Staphylococcus aureus é o principal patógeno das mastites contagiosas, geralmente encontrado no interior da glândula mamária, canal do teto ou na sua pele, principalmente quando lesada. A sua prevalência varia de 81 a 94% (CONTRERAS; RODRIGUEZ, 2011).

Os principais agentes da mastite ambiental são bactérias gram-negativas e espécies do gênero *Streptococcus* spp. Dentre as bactérias gram-negativas mais comumente associadas às mastites bovinas estão as pertencentes ao grupo dos coliformes, com destaque para *Escherichia coli* (FONSECA, SANTOS, 2001). Na Tabela 1 estão descritas as características gerais e os principais agentes contagiosos e ambientais relacionados à mastite bovina.

Tabela 1. Principais características indicadoras de mastite ambiental e contagiosa

Indicadores	Mastite	
	Contagiosa	Ambiental
CCS no tanque	> 300.000	< 300.000
% de mastite clínica	Variável	> 3%
Ocorrência de casos	Durante a lactação	Ao parto e início da lactação
Principais vetores	Mãos do ordenhador, utensílios da ordenha	Solo, fezes, lama, cama orgânica
Principais agentes	<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Mycoplasma</i> spp., <i>Corynebacterium bovis</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Streptococcus uberis</i> , fungos e leveduras
Incidência de infecção	Casos subclínicos	Casos clínicos

Fonte: Adaptado de Radostitis *et al.* (2007).

A mastite pode manifestar-se de forma aguda, subaguda ou crônica (DELLA LIBERA, 2007). A mastite crônica é a manutenção da forma subclínica ou a ocorrência alternada entre as duas formas. É comum a perda definitiva da função do quarto mamário devido à fibrose tecidual, definida como uma inflamação dos úberes que continua durante um longo período (FONSECA; SANTOS, 2000).

Alguns fatores podem influenciar na incidência da mastite, como o clima, variação sazonal, densidade populacional e o manejo (COSTA *et al.*, 2013). Para controlar a mastite dentro dos rebanhos é necessário que se adote medidas sanitárias rigorosas. As práticas do pré-dipping e

pós-dipping, assim como o isolamento microbiano dos animais considerados assintomáticos, devem ser consideradas como práticas rotineiras nas propriedades produtoras de leite.

As condições de idade, raça do animal, manejo, fatores climáticos e patógenos envolvidos na infecção são muito variáveis entre as propriedades, sendo importante a avaliação dos fatores de risco individualmente para que se estabeleça um programa de controle com monitoramento da qualidade do leite a partir da CCS e CBT (LANGONI, 2013).

De qualquer forma sempre é muito positiva a realização do monitoramento microbiológico na propriedade, pois se pode avaliar quais são os patógenos prevalentes e se são agentes contagiosos ou ambientais, podendo-se dessa maneira avaliar se as medidas de controle estão adequadas ou se há necessidade de intervenção, pois todo programa de controle deve ser avaliado e adaptado às condições da propriedade, caso necessário (LANGONI, 2013).

Como parte do exame e monitoramento microbiológico é possível avaliar o perfil de sensibilidade microbiana dos patógenos presentes no rebanho, podendo orientar melhor o tratamento e permitir aumentar a probabilidade de um tratamento bem sucedido, apesar de considerar-se que a ação *in vitro* dos antimicrobianos pode ser diferente no foco de infecção, pois há produção de enzimas, presença de restos celulares, alteração de pH local, entre outros fatores que podem alterar a eficácia do tratamento (RIBEIRO, 2008).

1.4. Uso de antimicrobianos e resistência antimicrobiana

A mastite é considerada uma das principais causas para o uso de antibióticos em bovinos leiteiros, sendo esse um componente importante no controle da enfermidade (KALIWAL *et al.*, 2011). No entanto, o uso prudente e racional de antimicrobianos deve ser respeitado, visto que a utilização dessas substâncias indiscriminadamente pode criar uma pressão seletiva de espécies resistentes e alterar a ecologia bacteriana (GUARDABASSI *et al.*, 2010). Segundo Aslantas e Demir (2016) a resistência aos antibióticos está relacionada ao uso indiscriminado para o tratamento e prevenção da mastite em rebanhos leiteiros.

Dessa forma, ao se iniciar o tratamento para mastite é interessante avaliar cada caso e minimamente optar por antimicrobianos de amplo espectro e de preferência de acordo com o histórico da propriedade e do perfil de sensibilidade dos patógenos isolados dos casos anteriores (LANGONI *et al.*, 2017). A utilização de antimicrobianos no tratamento da mastite deve visar benefícios econômicos e eficácia terapêutica, como o retorno da produção de leite da vaca e redução de quartos afetados, que podem ser fontes de infecção, além de melhorar o bem-estar do animal (SPINOSA *et al.*, 2011).

O sucesso da terapia medicamentosa e alcance dos objetivos dependem de alguns aspectos importantes, como escolha do medicamento adequado, da distribuição dos ativos dentro da glândula mamária, do estado fisiológico do animal, da precocidade com que a terapêutica de tratamento é estabelecida e de qual microrganismo está envolvido. Segundo Costa *et al.*, (2013) é muito importante identificar os patógenos e usar os medicamentos que tenham melhor efeito, visto que microrganismos de uma mesma espécie, dentro do mesmo rebanho, podem ter sensibilidades distintas. A utilização do medicamento deve levar em consideração o respeito às especificações de cada produto, para evitar a presença de resíduos no leite e a ocorrência de resistência bacteriana no rebanho (PHILPOT; NICKERSON, 1991).

A alta resistência das bactérias aos antimicrobianos é um tema de especial interesse na saúde pública, pois os animais infectados constituem fontes de patógenos para quem trabalha diretamente no manejo desses animais e para os consumidores do leite ou derivados indevidamente processados (ACOSTA *et al.*, 2016).

A resistência bacteriana é um fenômeno que ocorre em função da capacidade que a bactéria adquire em resistir ao tratamento com os antibacterianos. Os alimentos de origem animal podem ser considerados como importantes fontes de bactérias resistentes aos antibacterianos, além disso, podem apresentar concentrações indevidas dessas substâncias. Para proteger a saúde pública, limites aceitáveis de resíduos desses fármacos foram estabelecidos para gêneros alimentícios de origem animal (FERREIRA, 2018). Para que os limites não sejam excedidos, e essas substâncias não sejam assimiladas juntamente com a ingestão dos alimentos, a administração dos antibacterianos em animais de produção deve ocorrer de forma criteriosa. O respeito aos períodos de carência específicos de cada medicamento é fundamental nesse processo.

Considera-se que uma bactéria é resistente a um ou vários antibióticos quando esse perde a capacidade de controlar o crescimento bacteriano. O agravamento do nível de resistência é relacionado à sua utilização excessiva e muitas vezes de forma errada praticada ao longo de décadas. Assim, o uso indiscriminado permitiu que os microrganismos conseguissem se adaptar, por mecanismos de aquisição e transferência de genes de resistência aos antibióticos presentes em plasmídeos e transposons, diminuindo a eficácia dos antimicrobianos (SEAN, 2005).

Para que estratégias de controle obtenham êxito é preciso conhecer quais mecanismos são responsáveis pela resistência antimicrobiana. Didaticamente, a origem da resistência pode ser dividida em intrínseca e adquirida. A forma intrínseca advém do fato de que muitos compostos antimicrobianos são moléculas produzidas naturalmente e, como tal, as bactérias que compartilham do mesmo habitat apresentam mecanismos para superar a ação dessas moléculas para sobreviver. Já na forma adquirida, de maior interesse clínico, uma população bacteriana que,

naturalmente era suscetível ao antimicrobiano, torna-se resistente em virtude de mutações em genes cromossômicos ou devido à aquisição de determinantes genéticos externos de resistência (MUNITA; ARIAS, 2016).

Preocupações sobre os níveis de uso de antimicrobianos na produção de alimentos e da potencial associação com o desenvolvimento e surgimento de resistência já causam impactos em políticas de uso de drogas em vários países. Questões relacionadas ao uso de antimicrobianos em sistemas de produção leiteira a serem consideradas são: uso sem supervisão de um Médico Veterinário, a utilização sem indicação para a mastite, o relacionamento entre as práticas de uso de antibióticos e o risco para o desenvolvimento da resistência antimicrobiana, o desenvolvimento e validação de métodos para quantificar e documentar práticas de uso de antimicrobianos, e por fim o efeito do uso prudente. (BARLOW, 2011).

O uso exagerado de antimicrobianos em animais de criação é uma das principais preocupações atualmente, devido aos efeitos sobre os animais de criação, o meio ambiente e a saúde pública. Nesse contexto, destacam-se a seleção artificial de cepas de microrganismos resistentes, e a presença de resíduos dos compostos ativos e seus metabólitos no leite (RUEGG *et al.*, 2017). Principalmente na pecuária leiteira, o acesso dos produtores é de alguma forma, facilitado pela intensa competição entre as indústrias farmacêuticas, o que torna o custo desses medicamentos bastante acessível, onde os antimicrobianos podem ter ampla distribuição sendo comercializados, em grande parte, sem prescrição.

O uso de antimicrobianos com cautela na indústria leiteira é importante e necessário, e estratégias envolvendo seu uso de maneira prudente abrangem a identificação do patógeno causador da infecção, a determinação de susceptibilidade e a resistência do patógeno para avaliar o antibiótico mais indicado para o tratamento e a duração do tratamento suficiente para garantir concentrações efetivas e eliminar os microrganismos (OLIVER; MURINDA, 2012).

Para se avaliar *in vitro* se as bactérias são sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos existem comitês como *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* e *European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases (EUCAST)* que estabeleceram metodologias padronizadas para os testes de susceptibilidade a antimicrobianos, como os tamanhos de halos no caso da disco difusão em ágar e pontos de interrupção no caso da concentração inibitória mínima (CIM) (CLSI, 2008; EUCAST, 2015).

O teste de disco difusão em ágar *Mueller Hinton* permite conhecer informações sobre susceptibilidade microbiana *in vitro*. O teste fornece resultados qualitativos e é um dos métodos de suscetibilidade mais confiável e utilizado pelos laboratórios de microbiologia. O seu princípio

básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o antimicrobiano, após a semeadura do inóculo bacteriano (ORSI, 2017).

A presença de isolados microbianos multirresistentes no leite bovino e em isolados clínicos mostra a importância da escolha e a utilização de agentes antimicrobianos adequados para o tratamento efetivo da mastite (KREWER *et al.*, 2013).

Atualmente se discute o papel dos fatores de virulência de bactérias causadoras de mastite, como a produção de biofilme, na persistência e disseminação no hospedeiro, na expressão da doença grave e na interferência do tratamento com antimicrobianos (ISRAEL *et al.*, 2018).

1.5. Biofilme

Biofilmes são descritos como aglomerações de células embebidas em matriz heterogênea extracelular, que resultam em estruturas tridimensionais com características fisiológicas específicas e dificultam a ação dos macrófagos, além de aumentarem a resistência a diversos antimicrobianos (MARQUES *et al.*, 2013). A matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que envolve as células microbianas é formada por uma série de componentes, como polissacarídeos, proteínas, fosfolipídios e ácido teicóico. A composição química e a estrutura da matriz do biofilme têm fundamental importância para a sobrevivência dos microrganismos ali presentes (SHI; ZHU, 2009).

O biofilme segue uma sequência organizada de formação, que não difere muito entre as espécies bacterianas, sendo constituído por três fases: aderência ou fixação, acumulação e maturação, e separação e dispersão. Durante a fase de ligação, as células planctônicas aderem às superfícies bióticas ou abióticas e proliferam em agregados adesivos chamados de micro colônias. À medida que essas micro colônias se desenvolvem, as células bacterianas produzem uma matriz extracelular que serve como um suporte essencial para estabelecer a arquitetura tridimensional. Ao atingir uma densidade celular específica, é desencadeado um mecanismo de degradação da matriz, o qual libera células para dispersar e reiniciar o desenvolvimento do biofilme em locais diferentes (MOORMEIER; BAYLER, 2017).

Biofilmes podem ser compostos por comunidades homogêneas, derivadas de uma única espécie ou por comunidades heterogêneas, formadas por comunidades de várias espécies bacterianas ou até mesmo por fungos, leveduras, algas e outros organismos unicelulares. O primeiro caso é raro e incomum na natureza. Biofilmes heterogêneos são os mais comumente encontrados (SAUER; RICKARD; DAVIES, 2007).

A formação dos biofilmes depende tanto dos microrganismos quanto do material sobre o qual a estrutura é formada. São diversas as vantagens que microrganismos crescendo em biofilmes

têm em relação à vida planctônica: proteção contra a atuação de antibióticos e desinfetantes, sobrevivência à escassez de nutrientes, comunicação intercelular, entre outras (GARRET, 2008).

A formação do biofilme cria uma barreira de proteção contra os antimicrobianos. As falhas nos tratamentos antimicrobianos podem ser causadas por um ou por vários mecanismos de resistência do biofilme. Um desses mecanismos é a incapacidade do agente antimicrobiano de penetrar no biofilme, o qual neste caso funciona como uma barreira física. Além disso, as substâncias poliméricas são conhecidas por retardar a difusão dos antibióticos. Os antibióticos podem penetrar no biofilme facilmente em alguns casos e mal em outros, dependendo do agente que está formando o biofilme, pois, o tipo de estrutura do biofilme determina o transporte de nutrientes e conseqüentemente de antimicrobianos (ORSI, 2017).

Segundo Aguilar *et al.* (2011), a produção do biofilme é considerada um importante fator de virulência das bactérias, pois permite a adesão das estirpes, favorecendo à colonização na superfície epitelial da glândula mamária, quando comparadas às estirpes não produtoras. Causas descritas como responsáveis pela resistência são: a penetração limitada do agente antibiótico pela matriz do biofilme, a alteração da taxa de crescimento dos microrganismos que compõem o biofilme assim como outras alterações fisiológicas, incluindo a expressão de possíveis genes de resistência (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Com relação à mastite bovina, os microrganismos capazes de produzir biofilme podem se aderir em diversos substratos: tanto no próprio tecido da glândula mamária quanto em materiais utilizados nos tanques de refrigeração e em outros equipamentos de ordenha (materiais em inox, emborrachados e de silicone). Tal capacidade se explica porque os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídios, carboidratos e sais minerais que auxiliam na adesão às camadas superficiais, debaixo das quais os microrganismos continuam a se multiplicar mesmo diante da ação de agentes físicos e químicos, como os utilizados nos procedimentos de higienização (RICKARD *et al.*, 2003).

Outro fator importante em relação aos biofilmes na cadeia produtiva do leite é que a habilidade de algumas bactérias de aderirem à superfície do epitélio da glândula mamária está associada à produção destas estruturas. Desta forma, se não houver o emprego adequado das boas práticas de ordenha, o leite poderá ser fonte de contaminação de microrganismos patogênicos (MELO *et al.*, 2012).

Outra consideração é que a formação de biofilmes nas superfícies de plantas de processamento de alimentos por bactérias patogênicas é uma fonte de risco de contaminação cruzada, pois as bactérias aderentes ao biofilme podem contaminar os alimentos durante a sua produção ao terem contato com as superfícies impregnadas por biofilmes (SOUZA *et al.*, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil microbiológico, a partir da coleta de amostras de leite individual, de rebanhos bovinos leiteiros de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá, Noroeste do Paraná.

2.2. Objetivos específicos

Instruir as boas práticas de manejo do rebanho leiteiro em propriedades de agricultura familiar;

Avaliar a qualidade do leite por meio da CCS e CBT;

Avaliar a produção fenotípica de biofilme do leite cru bovino;

Identificar os grupos bacterianos presentes nos rebanhos selecionados;

Avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana das estirpes isoladas por meio da realização de antibiograma, detectando cepas resistentes de interesse em saúde pública;

Utilizar os resultados obtidos para implantar melhorias nas propriedades de agricultura familiar quanto ao correto diagnóstico e tratamento das infecções da glândula mamária.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das amostras e análises de CCS e CBT

Inicialmente, em parceria com a IDR Paraná (antiga EMATER), foram selecionadas quatro propriedades rurais caracterizadas como agricultura familiar, situadas na região do Arenito Caiuá, Noroeste do Paraná. As propriedades rurais possuíam a pecuária leiteira como atividade econômica principal e faziam parte das propriedades classificadas como modelo pelo IDR Paraná.

Amostras de 50 mL de leite foram coletadas em frascos estéreis, após as etapas de higienização do úbere e pré-dipping dos tetos, de todos os animais em lactação das quatro propriedades rurais selecionadas. Os animais variaram em cada mês devido a mudanças no estágio de produção (lactação ou período seco).

As coletas foram realizadas mensalmente, durante o período compreendido entre fevereiro a junho de 2019, totalizando 422 amostras, sendo 77 da propriedade 1 (P1), 122 da propriedade 2 (P2), 30 da propriedade 3 (P3) e 193 da propriedade 4 (P4).

Primeiramente, no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá UEM - Campus de Tecnologia de Umuarama - PR, as amostras foram submetidas individualmente ao teste de CMT e de formação de coágulo por fermentação. Para as análises de CCS, CBT e composição centesimal, foram encaminhadas ao Laboratório do Programa de Análise do Leite da

Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), localizado em Curitiba, Paraná.

As amostras foram coletadas conforme o manual de operações de campo da APCBRH, e acondicionadas em recipientes de polietileno estéreis contendo conservantes apropriados, o agente bacteriostático azidiol para análise de CBT e o bronopol, para análise de CCS. Foram mantidas refrigeradas e encaminhadas em caixa de isopor para o laboratório para a realização das análises por meio de equipamento automático, cujo princípio analítico baseia-se na citometria de fluxo, conforme descrito em ISO 13366-2/IDF 148-2, sendo os resultados expressos em células/mL.

A partir dos resultados de CMT, formação de coágulo por fermentação, produção de biofilme pelo leite cru e CCS foram selecionadas amostras com CCS > 200.000 CS/mL de cada propriedade para análise de identificação bacteriana e posterior teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

3.2. Detecção fenotípica de produção de biofilme

Freeman *et al.* (1989), desenvolveram um método alternativo com alta sensibilidade e rapidez para determinar a produção de biofilmes, denominado “Ágar Vermelho Congo”. Este método baseia-se na adição de corante em um meio sólido, com alta concentração de sacarose, sendo esta, essencial para a indução da produção do biofilme. O mecanismo exato da reação é desconhecido pelo autor, embora se acredite que a mudança de cor acontece nas fases finais da incubação bacteriana, processo oriundo da formação de um produto secundário.

A produção fenotípica de biofilme das amostras avaliadas foi determinada pelo cultivo bacteriano em Ágar Vermelho Congo (CRA), segundo Freemann *et al.* (1989) modificado, constituído de ágar nutriente (Himedia®) 28 g/L, sacarose (Synth®) 50 g/L e corante Vermelho Congo (Synth®) 0,8 g/L.

Alíquotas de 10uL das amostras individuais de leite foram semeadas em placas CRA, incubadas à temperatura de 37°C por 48 horas. A partir da produção de colônias rugosas e pretas foram consideradas estirpes produtoras de biofilme, quando acompanhadas pela mudança da coloração do meio adjacente para preto, entretanto, as colônias lisas e vermelhas foram consideradas como não produtoras de biofilme (FREEMANN *et al.*, 1989).

Para cada mês foi considerado o percentual de amostras com formação de biofilme positiva em relação ao total de animais em lactação das propriedades individualmente.

3.3. Isolamento e caracterização do grupo bacteriano

De cada amostra foi realizado o estriamento, utilizando alças esterilizadas, de aproximadamente 10 µL em placas de Petri contendo Ágar Nutriente para o isolamento da contaminação bacteriana, sendo incubadas à temperatura de 37°C por 48 horas.

Das amostras de leite de animais que apresentaram mastite clínica ou subclínica foram realizadas novas sementeiras das colônias isoladas previamente em Ágar Nutriente para identificação do grupo e realização do antibiograma.

No laboratório de Microbiologia Animal do Campus Fazenda da Universidade Estadual de Maringá (UEM), as amostras selecionadas foram semeadas separadamente em ágar nutriente (Himedia®) e incubadas por 24 horas à 36°C. A identificação do grupo bacteriano foi realizada por características morfo-tintoriais sendo realizado o esfregaço de cada colônia, corado pelo método de Gram e visualizado por microscopia ótica no aumento de 100x sob imersão.

De acordo com as características das colônias (cor, aspecto, tamanho e presença de hemólise) e observação por microscopia óptica após a coloração de Gram, os cocos Gram-positivos foram submetidos ao teste da catalase e os cocos Gram-negativos ao teste da oxidase. Estirpes cocos Gram-positivos catalase positivos foram classificadas como sendo do gênero *Staphylococcus* spp. e estirpes cocos Gram-positivos catalase negativos, como *Streptococcus* spp. / *Enterococcus* spp. Estirpes cocos Gram-negativos oxidase positivos foram classificadas como sendo do grupo de Bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) e estirpes cocos Gram-positivos oxidase negativos, como Enterobactérias. Dessa forma as amostras foram classificadas em quatro grupos, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. / *Enterococcus* spp., Enterobactérias e BGN-NF.

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é utilizado para detectar a produção da catalase bacteriana. Uma colônia bacteriana foi transferida para uma lâmina de vidro limpa e sobre ela foi adicionada uma gota do peróxido de hidrogênio. O borbulhamento imediato indicou uma reação positiva (ATLAS; SNYDER, 2011).

O teste da oxidase é baseado na produção intracelular da enzima oxidase pela bactéria, presente no citocromo C. O teste é realizado em tiras impregnadas com um reagente como N, N, N, N-tetrametil-p-fenilenodiamina ou N, N-dimetil-p-fenilenodiamina, que é um indicador redox. As tiras reagentes quando oxidadas ficam com uma coloração púrpura quando positivas e neutras quando negativas. É utilizado na identificação de bactérias Gram-negativas, permitindo a distinção entre a maior parte das bactérias da Ordem Enterobacteriales (as Enterobactérias), que são oxidase-negativas e outros cocos e bacilos Gram-negativos que são oxidase-positivos (ORTIZ *et al.*, 2018).

3.4. Teste de sensibilidade a antimicrobianos

A sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos foi avaliada pelo método de disco-difusão em ágar (BAUER *et al.*, 1966), de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Os isolados foram classificados como resistentes ou sensíveis aos antimicrobianos.

Os antimicrobianos testados variaram conforme o grupo bacteriano. Sendo eles: ampicilina (10 µg), penicilina (10 UI), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacino e ceftriaxona para *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp.; Sulfazotrim (25 µg), cefoxitina (30 µg), penicilina G (10 UI), tetraciclina (1 µg), gentamicina (10 µg), e ciprofloxacino para *Staphylococcus* spp.; Ampicilina (10 µg), ceftriaxona, tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacino e sulfazotrim (25 µg) para Enterobactérias e gentamicina (10 µg), ciprofloxacino e ceftriaxona para BGN-NF.

Para o teste, foram utilizadas colônias bacterianas provenientes de cultura com crescimento inferior a 24 horas em ágar nutriente (Himedia®). Com uma alça bacteriológica esterilizada suspendeu-se a colônia a ser testada em tubos estéreis contendo solução salina esterilizada (NaCl 0,85%) até obter-se uma turvação equivalente a 0,5 na escala MacFarland. Em seguida, com auxílio de um *swab* esterilizado a solução de suspensão bacteriana foi semeada de forma suave e abrangendo toda a superfície, em pelo menos cinco direções, na placa de Petri contendo ágar *Mueller Hinton* (MH - Himedia®). Então, foram colocados os discos de antibióticos sobre a superfície do meio inoculado, com auxílio de uma pinça flambada e resfriada, exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Os resultados de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos foram expressos em sensível ou resistente, sendo que os isolados que apresentaram sensibilidade intermediária foram considerados resistentes. A leitura dos halos de inibição de crescimento foi realizada com a medição do diâmetro em milímetros e utilizada para classificar a sensibilidade ou resistência dos isolados em relação aos antimicrobianos de acordo com os critérios do CLSI (2015).

3.5. Extensão rural

Após obtenção dos resultados, os médicos veterinários da IDR Paraná levavam as informações até os produtores durante visitas mensais e discutiam e orientavam sobre as boas práticas de manejo, com o objetivo de reduzir as contagens de CCS e CBT no rebanho.

Os produtores foram instruídos para a melhor condução do tratamento, com indicação da forma e tempo corretos de administração de medicamentos, sobre a necessidade do descarte do

leite durante o tratamento com antibióticos, a terapia da vaca seca e a segregação ou até mesmo descarte de animais cronicamente infectados.

Também foram instruídos sobre o manejo correto dos animais para evitar a contaminação do restante do rebanho, estabelecendo a sugestão de uma linha de ordenha onde a ordem seriam vacas de primeira lactação sadias, vacas de duas lactações ou mais com CCS inferior a 200.000 células/mL⁻¹ ou teste de CMT negativo; animais que apresentaram alta CCS ou teste de CMT positivo; e vacas com grumos no leite ou em tratamento, das quais o leite deveria ser descartado.

4. RESULTADOS

Na Tabela 2 é possível observar os números de amostras coletadas mensalmente em cada propriedade e a quantidade de amostras que apresentaram valor de CCS maior que o estipulado pelas Instruções Normativas 76 e 77 (IN 76 e IN 77) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de 2018.

Tabela 2. Relação entre o número de amostras coletadas e a CCS (cél.mL⁻¹), das quatro propriedades de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá avaliadas, no período de fevereiro a junho de 2019

PROPRI IDADE	FEVEREIRO			MARÇO			ABRIL			MAIO			JUNHO		
	N1	N2	%	N1	N2	%	N1	N2	%	N1	N2	%	N1	N2	%
P1	20	9	45	20	12	60	10	6	60	12	7	58,3	15	8	53,3
P2	23	9	39,1	27	8	29,6	26	5	19,2	22	3	13,6	24	2	8,3
P3	9	6	66,6	5	2	40	7	3	42,8	2	2	100	7	6	85,7
P4	43	17	39,5	40	22	55	39	12	30,7	41	11	26,8	30	14	46,6

N1: número total de animais; N2: número de animais com CCS>500.000; P1: Propriedade 1; P2: Propriedade 2; P3: Propriedade 3; P4: Propriedade 4. Fonte: MAIOCHI, 2021.

Analisando P1, durante todo o período, 42 amostras (54,54%) apresentaram contagens maiores que 500.000 células/mL, limite máximo estabelecido pela IN 77 (2018) que passou a vigorar durante a realização do estudo. Já para a P2, 27 amostras (22,13%) apresentaram CCS acima dos parâmetros vigentes.

A P3 foi a que apresentou o menor número de animais durante o estudo, porém com a maior porcentagem de animais com alta CCS, chegando a 63,33% (19 amostras durante o período). Além disso, é relevante pontuar que esta foi a propriedade estudada com menor tecnificação.

Das 193 amostras coletadas da P4, 76 (39,38%) apresentaram alto valor de CCS, sendo que os meses de maior prevalência foram fevereiro e março, com 39,53% e 51,16%, respectivamente, de animais acima dos limites preconizados pela IN 77.

Na Tabela 3 são apresentados os valores de CBT mensais para os resfriadores de cada propriedade.

Tabela 3. Valores de CBT (UFC.mL⁻¹) dos resfriadores das quatro propriedades de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá avaliadas, no período de fevereiro a junho de 2019

PRODUTOR	FEV	MARÇO	ABRIL	MAIO	JUNHO
P1	-	15.000	3.916.000	2.452.000	1.030.000
P2	-	13.000.000	4.202.000	3.047.000	1.920.000
P3	-	90.000	32.000	23.000	9.000
P4	-	18.000.000	34.000	3.047.000	646.000

Fonte: MAIOCHI, 2021.

No mês de fevereiro não foram encaminhadas ao laboratório terceirizado as amostras dos resfriadores, porém realizou-se a inoculação das amostras utilizando a técnica *pour plate* e os resultados obtidos estavam abaixo dos parâmetros definidos pelas INs 76 e 77.

De acordo com as IN 76 e 77, o valor máximo para CBT é de 900.000 UFC/mL. É possível observar na Tabela 3 que a P2 apresentou todos os resultados mensais fora do padrão estabelecido pela legislação.

Quanto à qualidade do leite das propriedades de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá, noroeste do Paraná avaliadas, 38,86% de todas as amostras coletadas durante o período de estudo apresentaram CCS acima de 500.000 células/mL, e 56,25% das amostras dos tanques de expansão apresentaram CBT acima dos limites máximos estabelecidos pela IN 77.

Quanto à capacidade de formação de biofilme, após avaliação visual das placas de CRA contendo a sementeira das amostras de leite, aquelas que apresentaram produção de colônias rugosas e pretas foram consideradas produtoras de biofilme quando acompanhadas pela mudança da coloração do meio adjacente para preto, entretanto, as colônias lisas e vermelhas foram consideradas como não produtoras de biofilme (FREEMANN *et al.*, 1989). Observam-se na Tabela 4 as porcentagens mensais de amostras fenotipicamente produtoras de biofilme de fevereiro a maio.

Tabela 4. Porcentagem de amostras fenotipicamente produtoras de biofilme em leite cru bovino das quatro propriedades de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá avaliadas, no período de fevereiro a maio de 2019.

PROPRIEDADE	FEVEREIRO		MARÇO		ABRIL		MAIO	
	N	%	N	%	N	%	N	%
P1	20	85%	20	70%	10	100%	12	58,3%
P2	23	65,2%	27	37%	26	57,7%	22	63,6%
P3	9	66,7%	5	80%	7	85,7%	6	83,3%
P4	43	62,8%	40	32,5%	39	41%	43	37,2%

Fonte: MAIOCHI, 2021.

A produção fenotípica de biofilme em CRA é interpretada pela alteração da coloração do meio, considerando-se positivas as amostras que apresentaram alteração da coloração do meio (Figura 1 A) e negativas as que não apresentaram alteração (Figura 1 B).

Considerando todo o período avaliado, a P1 apresentou 77,4% das amostras produtoras de biofilme, a P2 55%, a P3 77,8% das amostras e a P4 37,2%. Das 352 amostras avaliadas de todas as propriedades em todo o período, 55,4% foram consideradas produtoras de biofilme.



Figura 1 A

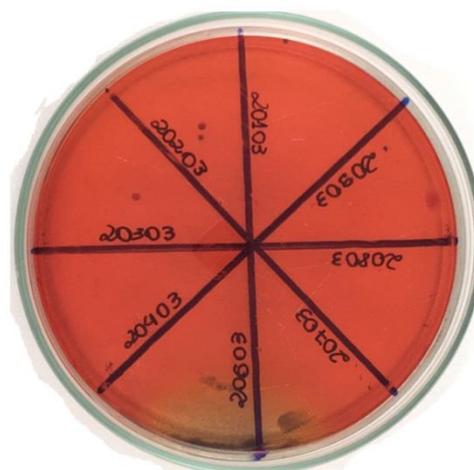


Figura 1 B

Figura 1. Amostras de leite cru bovino semeadas em ágar vermelho congo (CRA). A – Amostra produtora de biofilme; B – Amostra não produtora de biofilme. Fonte: MAIOCHI, 2021.

Foi verificada presença de microrganismos fenotipicamente produtores de biofilme nas amostras de leite analisadas em todas as propriedades e em todo o período de estudo, implicando em risco de contaminação por esses microrganismos em toda a cadeia produtiva do leite e seus derivados.

Na Tabela 5 estão apresentados os isolados por grupo bacteriano das amostras de leite de mastite clínica e subclínica das quatro propriedades de agricultura familiar durante todo o período avaliado.

Tabela 5. Amostras de leite de mastite clínica e subclínica analisadas e classificadas em grupos bacterianos, das quatro propriedades de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá todo o período avaliado, fevereiro a junho de 2019.

Grupos Bacterianos	P1		P2		P3		P4	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Enterococcus</i> spp./ <i>Streptococcus</i> spp.	20	38,46	3	10,34	0	0	20	23,8
<i>Staphylococcus</i> spp.	29	55,77	16	55,77	10	91	55	65,48
Enterobactérias	3	5,77	9	31	1	9	9	10,7
BGN-NF	0	0	1	3,45	0	0	0	0
Total de isolados	52	100	29	100	11	100	84	100

N = número de cepas isoladas por grupo bacteriano de cada propriedade, P1 = Propriedade 1, P2 = Propriedade 2, P3 = Propriedade 3, P4 = Propriedade 4. Fonte: MAIOCHI, 2021.

Foram isoladas cepas bacterianas em 41,7% das amostras coletadas. Dessas, 24,43% pertencentes ao grupo dos gêneros *Enterococcus* spp. /*Streptococcus* spp., 62,5% ao gênero *Staphylococcus* spp., 12,5% ao grupo das Enterobactérias e 0,56% de BGN-NF.

Em todo o período avaliado, foram isoladas cepas bacterianas em 67,5% das amostras selecionadas da propriedade 1 (P1), em 23,77% das amostras selecionadas da propriedade 2 (P2), em 36,67% da propriedade 3 (P3) e em 43,52% da propriedade 4 (P4).

Dentre os grupos bacterianos, o gênero *Staphylococcus* spp. foi o de maior incidência em todas as propriedades, sendo que chegou a 65,48% dos isolados da P4, maior número observado no estudo. Em seguida, o grupo de *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp. também apresentaram incidência elevada, chegando a 38,46% dos isolados da P1.

Na Tabela 6 observa-se a distribuição por grupos e por propriedades das resistências aos antimicrobianos avaliados pelo teste de disco-difusão.

Tabela 6. Resistência por disco-difusão das estirpes isoladas das 4 propriedades de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá, em todo o período de avaliação, fevereiro a junho de 2019.

Grupo bacteriano	Antimicrobiano	P1		P2		P3		P4	
		n R	%	n R	%	n R	%	n R	%
<i>Enterococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.	Ampicilina	0	0	0	0	0	0	0	0
	Penicilina	0	0	1	33,33	0	0	0	0
	Gentamicina	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tetraciclina	10	50	2	66,66	0	0	0	0
	Ceftriaxona	0	0	1	33,33	0	0	0	0
	Ciprofloxacino	0	0	2	66,66	0	0	1	5
<i>Staphylococcus</i> spp.	Penicilina	20	68,96	9	56,25	7	70	21	38,18
	Gentamicina	1	3,45	3	18,75	0	0	2	3,64
	Tetraciclina	8	27,6	5	31,25	1	10	11	20
	Sulfazotrim	4	13,8	6	37,5	0	0	6	10,9
	Ciprofloxacino	4	13,8	7	43,75	3	30	11	20
	Cefoxitina	4	13,8	1	6,25	0	0	8	14,54
Enterobactérias	Ampicilina	3	100	7	77,77	1	100	3	33,33
	Tetraciclina	3	100	4	44,44	1	100	1	11,11
	Ceftriaxona	3	100	6	66,66	1	100	4	44,44
	Gentamicina	0	0	1	11,11	0	0	2	22,22
	Ciprofloxacino	1	33,33	3	33,33	1	100	2	22,22
	Sulfazotrim	3	100	2	22,22	1	100	0	0
BGN-NF	Gentamicina	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ciprofloxacino	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ceftriaxona	0	0	1	100	0	0	0	0

NR = Número de resistentes; P1 = propriedade 1; P2 = propriedade 2; P3 = propriedade 3; P4 = propriedade 4; BGN-NF = Bactérias Gram Negativas Não-Fermentadoras. Fonte: MAIOCHI, 2021.

Das cepas bacterianas isoladas, 60,8% apresentaram resistência fenotípica a pelo menos um dos antibióticos testados.

Verificou-se resistência das estirpes a mais de um princípio ativo, sendo que a maior resistência ocorreu frente às penicilinas dos isolados do gênero *Staphylococcus* spp. em todas as propriedades avaliadas. Todavia, em 69 amostras observou-se a sensibilidade a todos os antimicrobianos testados e nenhuma das amostras foi resistente a todos às classes de antimicrobianos.

Em relação à resistência por grupos bacterianos da P1, das 20 amostras isoladas de *Enterococcus* spp. / *Streptococcus* spp., 50% se apresentaram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados. Enquanto que, dos 29 isolados de *Staphylococcus* spp. 82,75% foram resistentes a, pelo menos, um antimicrobiano. Todas as três amostras isoladas de Enterobactérias foram resistentes.

Na P2 observou-se resistência bacteriana a no mínimo um antibiótico em todos os 3 isolados de *Enterococcus* spp. / *Streptococcus* spp., em 75% dos 16 isolados de *Staphylococcus* spp., em 77,77% dos 9 isolados de Enterobactérias e no único isolado de BGN-NF.

Para a P3 foram observadas resistências em 70% das 10 amostras de *Staphylococcus* spp. e no único isolado de Enterobactéria.

Quanto às resistências avaliadas em P4, no grupo de *Enterococcus* spp. / *Streptococcus* spp., apenas 1 das 20 amostras apresentou resistência, enquanto para o grupo de *Staphylococcus* spp. e Enterobactérias, as taxas de resistência, a pelo menos um antimicrobiano, foram de 60% e 55,55%, respectivamente.

Do total de 422 amostras de leite, de todo o período e de todas as propriedades, analisadas após cultivo e identificação microbiológica, foram isoladas 176 cepas das quais 107 (60,8%) foram resistentes a pelo menos um antibiótico testado.

Dentre os isolados de *Streptococcus* spp. / *Enterococcus* spp. da P1, 50% apresentaram resistência à tetraciclina. Esta baixa susceptibilidade ao microbiano também foi observada nos isolados do mesmo grupo da P2.

Pode-se observar que os isolados do grupo de Enterobactérias das quatro propriedades apresentaram baixa suscetibilidade aos antimicrobianos testados.

5. DISCUSSÃO

Segundo Xavier *et al* (2018) a qualidade do leite é influenciada pelo grau de tecnologia utilizada em sua produção, portanto o leite cru produzido por agricultores familiares brasileiros de pequeno porte, que possuem pouca tecnificação, podem apresentar uma qualidade microbiológica não satisfatória, o que corrobora com os resultados encontrados neste estudo, tanto frente aos resultados de CCS quanto de CBT. Verificou-se que das quatro propriedades avaliadas, apenas uma apresentou resultados de CBT do tanque de expansão de todos os meses de acordo com os valores máximos estipulados pelas IN 76 e 77. No entanto, a P2 apresentou todos os resultados mensais fora do padrão estabelecido pela legislação. Esse é um grande problema para atividade leiteira, que deveria produzir leite com melhor qualidade microbiológica para oferecer um maior rendimento industrial.

A produção de leite no Brasil está dispersa em propriedades rurais heterogêneas, com características contrastantes em relação ao tamanho, número de animais e manejo. As de pequena e média produção, juntamente com a agricultura familiar representam grande parte da produção de leite no Brasil e são importantes quando se avalia a produção do país como um todo. É importante conhecer os fatores que afetam a qualidade do produto e de seus derivados nas atividades produtivas e operacionais de pequenos produtores de leite, sendo essencial para o desenvolvimento de diretrizes que propiciem a melhoria da qualidade desejada. Percebe-se que os pequenos produtores em sua maioria estão desestimulados e produzem leite de qualidade inferior devido à pouca tecnificação e ao baixo investimento.

Como a CBT é uma medida direta de contaminação do leite, alguns fatores relacionados ao animal também atuam de forma importante e podem explicar porque um produtor pode ser capaz de controlar a CBT e não a CCS (BOZO *et al.*, 2013). Este fator pode ser verificado em avaliação da P3, sendo a propriedade que apresentou as taxas de CBT mais baixas em todos os meses de estudo, todavia com a maior porcentagem de animais com alta CCS, chegando a 63,33% (19 amostras durante o período) sugerindo afecção dos animais por mastite.

Pela detecção fenotípica da capacidade de produção de biofilme, considerando todas as propriedades e o período total deste estudo, encontrou-se que 46,21% das estirpes isoladas foram produtoras de biofilme. Entretanto, essa incidência foi menor que detectada no estudo de Darwish *et al.* (2013) onde 70,4% dos isolados de leite bovino foram produtores de biofilme em CRA, e por Melo (2011) que detectou pelo CRA que 79,4% das estirpes foram produtoras de biofilme dos 316 isolados de leite bovino.

Jain e Agarwal (2009) descreveram que a formação de biofilme é um fator de virulência importante para diversas bactérias, inclusive *Staphylococcus* spp. e a patogênese da mastite é

atribuída à combinação de diversos fatores celulares e extracelulares, sendo a formação de biofilme um dos principais mecanismos para a infecção bacteriana persistente ou crônica (COSTERTON *et al.* 1999).

Mota *et al.* (2012) isolaram 39,3% de bactérias do gênero *Staphylococcus* em 1080 amostras de leite bovino. No presente estudo, o gênero *Staphylococcus* spp. foi o mais isolado em todas as propriedades em todos os meses, sendo 55,77% das amostras isoladas da P1 e P2, chegando a 91% dos isolados da P3 e 65,48% da P4.

Segundo estudos de Aslantas *et al.* (2016), das 112 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas, a maior resistência no teste de disco-difusão foi frente à penicilina 45,5%. Bal *et al.* (2010), determinaram em seu estudo que a maior resistência dos *Staphylococcus* spp. coagulase negativo, testados pelo método de disco-difusão, foi à penicilina em 58% das 69 amostras isoladas. Os valores apresentados por Aslantas *et al.*, (2016) e Bal *et al.*, (2010) corroboram nossas observações nos isolados do gênero *Staphylococcus* spp. de todas as propriedades avaliadas no presente estudo.

Por outro lado, De Jong *et al.* (2018), analisando amostras de mastite clínica de nove países europeus, observaram que apenas 25% dos *S. aureus* foram resistentes à penicilina. Essa diferença sugere que a suscetibilidade dos estafilococos à penicilina varia de acordo com o país ou região.

As variações nos níveis de sensibilidade podem ser explicadas pelo uso indiscriminado da penicilina na medicina veterinária, possibilitando a seleção de cepas resistentes e a produção de β -lactamases em cepas de *Staphylococcus* spp. Segundo Ardic *et al.* (2005), como consequência do uso indiscriminado de antimicrobianos, há um aumento elevado no grau de resistência às classes de antimicrobianos.

6. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que o processo de obtenção do leite e a sanidade da glândula mamária dos rebanhos leiteiros de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá estudados ainda são insatisfatórios. Os produtores necessitam de assistência técnica contínua para buscar melhorias da qualidade do produto e se adequar aos novos padrões determinados pela normativa vigente.

Outros estudos deverão ser realizados para a detecção genotípica da produção de biofilmes de propriedades de agricultura familiar e detecção genotípica de resistência frente aos antimicrobianos mais utilizados na pecuária leiteira da região.

Atividades extensionistas devem ser realizadas voltadas à conscientização das boas práticas de manejo, controle da mastite subclínica e uso racional de antimicrobianos no rebanho leiteiro.

Houve intuito em realizar um dia de campo para levar os resultados obtidos nesta pesquisa para uma maior parcela dos produtores leiteiros de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá, no entanto devido à Pandemia do Coronavírus o mesmo não pôde ser programado.

As parcerias firmadas com a IDR Paraná e a APCBRH foram fundamentais na consolidação dos objetivos traçados para a execução da pesquisa, de forma integradora e colaborativa para a execução das coletas e análises propostas. Foi possível constatar a importância do respaldo de análises de CCS, CBT e antibiograma para uma ação mais efetiva junto às propriedades rurais, em relação à mastite bovina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOVAY, R. Agricultura familiar e desenvolvimento territorial. **Reforma Agrária**, v.28, n.1, p.1-21. 1998.
- ACOSTA, A.C.; SILVA, L.B.G. DA; MEDEIROS, E.S.; PINHEIRO-JUNIOR, J.W.; MOTA, R.A. Mastites em ruminantes no Brasil. Artigo de Revisão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.36, n.7, p.565-573, 2016.
- AGUILAR, B.; ITURRALD, M. Binding of a surfasase protein of Staphylococcus aureus to cultured ovine mammary gland epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, v.82, p.165-175, 2011.
- ARCANJO, A. H. M.; OLIVEIRA, P. C. S.; MOREIRA, L. C.; JAYME, C. G.; SOARES, N. A.; OLIVEIRA, A. R.; PEREIRA, K. A.; NOGUEIRA, M. A. R. Programa dos seis pontos de controle da mastite em rebanhos leiteiros. **Global Science and Technology**, Goiânia, v. 10, n. 1, p.78-88, 2017.
- ARDIC, N.; OZYURT, N.; SARRYUPOGLU, B.; HAZNEDAROGLU, T. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 213–218, 2005.
- ASLANTAS, Õ.; DEMIR, C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of Staphylococcus aureus from subclinical bovine mastitis cases. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p.8607-8613, 2016.
- ATLAS, R. M.; SNYDER, J. W. **Reagents, Stains, and Media: Bacteriology**. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; WARNOCK, D. W. (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 10. ed. Washington: ASM Press, p. 272-307. 2011.
- BAL, E.B.; BAYAR, S.; BAL, M.A. Antimicrobial Susceptibilities of Coagulase-Negative Staphylococci (CNS) and Streptococci from Bovine Subclinical Mastitis Cases. **Journal of Medical Microbiology**, v 48, n. 3, p. 267-274, 2010.
- BANSAL, B. K.; HAMANN, J.; GRABOWSKI, N. T.; SINGH, K. B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 144-152, 2005.
- BARBOSA, T. Agricultura de baixa renda: questão e opções de desenvolvimento. **Revista de Economia Rural**, Brasília, v.16,n.3, p. 28-32, 1978.

BARDIAU, M.; CAPLIN, J.; DETILLEUX, J.; GRABER, H.; MORONI, P.; TAMINIAU, B.; MAINIL, J. G. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival, capsular profile and agrotyping. **Veterinary Microbiology**, v. 185, p. 1-6, 2016.

BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p 383-407, 2011.

BATALHA, M. O., BUAINAIN, A. M., & SOUZA FILHO, H. M. **Tecnologia de gestão e agricultura familiar**. In M. O. Batalha & H. M. Souza Filho (Org.), *Gestão Integrada da Agricultura Familiar* (19 p.). São Carlos: EdUFSCar. 2005.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.2413-2315, 1966.

BERGONIER D.; CREMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, v.3, n.5, p.689-716. 2003.

BORCHARDT, M. A.; PAES-DE-SOUZA, M. Pacote tecnológico da Embrapa: aplicação do programa Balde Cheio em Rondônia. Em: XII CONGRESSO INTERNACIONAL DO LEITE, 2013, Porto Velho. **XII CIL - Congresso Internacional do Leite**. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 1-20, 2013.

BOZO, G. A.; ALEGRO, L. C. A.; SILVA, L. C.; SANTANA, E. H. W.; OKANO, W.; SILVA, L. C. C. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. Arquivo. **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, 2013

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa n. 76 de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União, Brasília, 30 de novembro de 2018.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa n. 77 de 26 de novembro de 2018. Critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. Diário Oficial da União, Brasília, 30 de novembro de 2018.

BRASIL, 2017. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

CASTRO, C. N. **Desafios da agricultura familiar: o caso da assistência técnica e extensão rural** (Boletim Regional, Urbano e Ambiental, No. 12, pp. 49-59). Brasília: IPEA. 2015.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; approved standard, 25th ed. Informational Supplement. CLSI document M100-A25. Wayne, PA, USA. 2015.

CERQUEIRA, M., PAIVA, C. A. V., LEITE, M., FONSECA, L., SOUZA, M., & PENNA, C. Impacto da qualidade da matéria-prima na indústria de laticínios. 2012

CONTRERAS G.A. & RODRÍGUEZ J.M. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. **Journal Mammary Gland Biology and Neoplasia** v.16, n.4, p.339-356. 2011.

COSTA, R. P. da. *et al.* TILOSINA: Um importante antibiótico não monitorado em leite no Brasil. **Revista Segurança Alimentar e Nutricional**. Campinas, v. 20, n. 2, p. 245-259, 2013.

- COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, v.284, p. 1318-1322, 1999.
- DALCIN, D.; TROIAN, A.; OLIVEIRA, S. V. A importância da atividade leiteira na renda dos agricultores familiares: um estudo de caso no município de Caiçara-RS. In: Revista OnLine CONGREGA, v.4, n.4 (Nov. 2008). Bagé, URCAMP, 2008.
- DARWISH, S.F.; ASFOUR, H.A.E. Investigation of Biofilm Forming Ability in Staphylococci Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays. *The Scientific World Journal*, p.1-9, 2013.
- DE JONG A, GARCH FE, SIMJEE S, MOYAERT H, ROSE M, YOUALA M, et al. Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Veterinary Microbiology*, v.213, p.73-81. 2018.
- DELLA LIBERA, A. M. M. P.; ARAÚJO, W. P.; BLAGITZ, M. G.; BASTOS, C. R.; AZEDO, M. R.; TRLADI, A. S. Mastitis after induced mammogenesis in a nulliparous goat. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 29-31, 2007.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.
- DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V.O compromisso com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo: Editora UPF. p.38-55. 2004.
- EMBRAPA. **Anuário do leite 2019**. Agropecuária, Empresa Brasileira de Pesquisa, p. 104, 2019.
- EUCAST. 2013. EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.
- FAO. **Perspectivas dos alimentos - uma análise dos mercados mundiais (leite e produtos lácteos)**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/ai474e/ai474e10.htm>>.
- FERREIRA, P. F. S. **Utilização de Antibióticos em Medicina Veterinária e a Emergência de Resistência Bacteriana**. 2018. Monografia (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Coimbra, 2018.
- FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, v. 42, p. 872-874, 1989.
- GARRET, T.R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, v.18, p. 1049-1056, 2008.
- GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of bovine mastitis: old and recent therapeutic approaches. *Current Microbiology*, New York, v. 72, n. 4, p. 377-382, 2016.
- GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- GUILHOTO, J. J. M., SILVEIRA, F. G., ICHIHARA, S. M., AZZONI, C. R. A importância da agricultura familiar no Brasil. *RER*, Rio de Janeiro, vol. 44, nº 03, p. 355-382, jul/set 2006.
- GUIMARÃES, A. J. S. Avaliação da qualidade do leite cru refrigerado em relação ao enquadramento legal e o efeito da sazonalidade sobre o preço pago aos produtores. 2017.
- HILL, J. A. G.; SILVEIRA, A. L. F.; MIGLIORINI, F.; et al.; **Qualidade do leite na região sudoeste do Paraná. Londrina: IAPAR**. 56 p. (IAPAR, Boletim técnico, 76). 2011.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home>. Acesso em: 20 mar. 2021.

IDR Paraná – Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná. Disponível em: <http://www.idrparana.pr.gov.br/>. Acesso em: 24 abr. 2021.

ISRAEL L.F.S., Rabello R.F., Domingos S.C.B., Medeiros L.S. Produção de biofilme por *Staphylococcus chromogenes* isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos com mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.6, p.1943-1949, 2018.

JAIN, A.; AGARWAL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of Microbiological Methods**, v.76, p.88-92, 2009.

JAMAS L.T., SALINA A., ROSSI R., MENOZZI B.D. & LANGONI H. Parâmetros de qualidade do leite bovino em propriedades de agricultura familiar. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.38, n4, p.573-578. 2018.

KALIWAL, B.B.; SADASHIV, S.O.; KURJOGI, M.M.; SANAKAL, R.D. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci isolated from Bovine Mastitis. **Veterinary World**, v.4, n.4, p.158- 161, 2011.

KUANG, Y. *et al.* Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture independent PCR-DGGE method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, p. 76-81, 2009.

LANGONI, H *et al.* Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.12, p. 1059-1065, dez. 2011.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 620-626, 2013.

LANGONI, H.; SALINA, A.; OLIVEIRA, G. C.; JUNQUEIRA, N. B.; MENOZZI, B. D.; JOAQUIM, S. F. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 11, p. 1261-1269, 2017.

MANZI, M. P.; NOBREGA, D.B.; FACCIOLI, P.Y.; TRONCARELLI, M.Z.; MENOZZI, B.D.; LANGONI, H. Relationship between teat-end condition, udder cleanliness and bovine subclinical mastitis. **Research In Veterinary Science**. Oxford: Elsevier B.V., v. 93, n. 1, p. 430-434, 2012.

MARQUES, V.F.; SOUZA, M.M.S.; MENDONÇA, E.C.L. *et al.* Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, p.161-170, 2013.

MELO, P. C.; FERREIRA, L. M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L.F.; VICENTE, H.I.G. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastites subclínica bovina. **Biociência Journal**, v.28, n.1, p.94-99, 2012.

MONTANHINI M. T. M. **Influência da qualidade do leite cru em produtos processados**, 2018. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/influencia-da-qualidade-do-leite-cru-em-produtos-lacteos-processados-209474>>. Acesso em 18 mar. 2021.

MOORMEIER; BAYLER. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organismo. **Molecular Microbiology**, v. 104 p. 365-376, 2017.

MOTA, R.A.; DE MEDEIROS, E.S.; DOS SANTOS, M.V; JÚNIOR, J.W.P.; MOURA, A.P.B.L; COUTINHO, L.C.A. Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.13, n.1, p.124-130. 2012.

- MULLER, 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**, p. 206-2017, 2002.
- MUNITA, J. M. e ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum** v.16, P.02-37, 2016.
- OLIVEIRA, J. L. R. **48p Perfil físico-químico e microbiológico do leite coletado de pequenos produtores rurais do Sul Goiano - Morrinhos, 2019**. 19 p. Monografia (Graduação em Tecnologia em Alimentos) -- Instituto Federal Goiano, Campus Morrinhos, 2019.
- OLIVER, S.P.; GILLESPIE, B.; HEADRICK, S.; MOOREHEAD, H.; LUNN, P.; DOWLEN, H.; JOHNSON, D.; LAMAR, K.; CHESTER, S.; MOSELEY, W. Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. **Journal Dairy of Science**, v,87, p.2393-2400, 2004.
- ORSI, A. M. **Capacidade de formação de biofilme e resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* causadores de mastite bovina**. 2017. Dissertação (Pós Graduação em Nutrição e Produção Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2017.
- ORTIZ, P. C.; ROCHA, M. S.; ALVES, K. R.; CARDOZA, Y. F. Bacteriologia: Três testes básicos. Agriporticus. 2018. Disponível em: <<http://www.agronomicabr.com.br/agriporticus/detalhe.aspx?id=804>>. Acesso em: 15 abr. 2021.
- PAIVA, C. A. V. **Efeitos da produção e da Sazonalidade Sobre a qualidade do Leite Cru Refrigerado Processado em uma Indústria de Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal, Curso de Pós-Graduação da Escola de Veterinária da UFMG. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.
- PANTOJA, J. C. F.; REINEMANN, D. J; RUEGG, P. L. Associations among milk quality indicators in raw bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.10, p.4978-4987.
- PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, 278–282, 2009.
- PHILPOT, W. N. *et al.* **Mastitis: counter attack**. Naperville: Babson Bros. PRADO, R. M., PAULIN, M. F., PRADO, I. N., SANTOS, G. T., BENCHAAAR, C. & PETITI. 1991.
- RADOSTITS, O.M. *et al.* **Clínica Veterinária – Um tratado de doenças dos Bovinos, Ovinos, Suínos, Caprinos e Equinos**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 541- 62, 2007.
- REIS, E. M. B.; VIEIRA, J. A.; LOPES, M. A.; DEMEU, F. A.; BRUHN, F. R. P.; VICENTE, F. H.; PEREIRA, A. B.; FILHO, L. M. S. Diagnóstico de propriedades leiteiras e fatores associados à qualidade higiênico sanitária do leite. **Pubvet** v.14, n.2, a508, p.1-15, Fev., 2020
- REZENDE, N. C. M.; ROSSI, O. D. J.; NADER, A. F.; AMARAL, L. A. Ocorrência de microrganismos indicadores em leite UHT (“ultra-high-temperature”) integral. **Revista Brasileira da Ciência Veterinária**, v. 7, n. 1, p. 58-60, 2000.
- RIBEIRO, M.G. **Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia**, p.759-771. In: Andrade S.F. (Ed.), **Manual de Terapêutica Veterinária**. 3ª ed. Roca, São Paulo. 2008.

RIBEIRO M.G., LANGONI H., DOMINGUES P.F. & PANTOJA J.C.F. **Mastite em animais domésticos**, p.1155-1205. In: Megid J., Ribeiro M.G. & Paes A.C. (Eds), Doenças Infecciosas em Animais de Produção e de Companhia. Roca, Rio de Janeiro. 2016.

RUEGG, P. *et al.* **On-Farm Culturing for Better Milk Quality**. Western Dairy Management Conference. March, 2017, Reno, Nevada, USA, p.149-159, 2017.

SANTANA, E. H. W., Beloti, V., Barros, M. d. A. F., Moraes, L. B., Gusmão, V. V. & Pereira, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n.2, p.145-154. 2001.

SANTOS, R.F. **Presença de vieses de mudança técnica na agricultura brasileira**. São Paulo: IPE/USP, p. 39-78. 1986.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo: Editora Manole,314p. 2007.

SANTOS, M. V; FONSECA, L. F. L. **Controle da mastite e qualidade do leite: Desafios e soluções**. Pirassununga/SP: Edição dos autores, 301p. 2019.

SANTOS, M. V. Cuidados com higiene melhoram contagem bacteriana total. **Revista Mundo do Leite**, v.55, p.13-16, 2012.

SAUER, K.; RICKARD, H.; DAVIES, D.G. Biofilms and biocomplexity. **Microbe**, v.2, n. 7, p. 347-353, 2007.

SEAN, S. K. **Antibiotic Resistance: New Approaches to a Historical Problem**, **Action Bioscience**. 2005.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 407-413, 2009.

SOUZA J. B. L.; ALVES, A. F.; CULTI, M. N.. A pecuária leiteira e o risco de exclusão nos municípios de Peabiru e Quinta do Sol. **INTERAÇÕES**, Campo Grande, v. 14, n. 2, p. 203-211, jul./dez. 2013.

SPINOSA, H. S., GONIAK, S. L., BERNADI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5º ed. Guanabara-Koogan, 2011.

TISCHER, N. F.; HASSE, V. G.; COPETTI, K. L.; ULSENHEIMER, B. C.; VIERO, L. M. Boas práticas de higiene durante a ordenha. **Brazilian Journal Animal and Environmental Research**, Curitiba, v. 1, n. 1, p. 179-187, jul./set. 2018.

XAVIER, B. C. P.; ROMA JÚNIOR, L. C.; DIZERÓ, M. F. C.; CASTELANI, L.; ARCARO, J. R. P. Impacto da assistência técnica sobre as características higiênicas de produção e sua relação com a melhoria da qualidade do leite. **12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018 01 a 03 de agosto de 2018** – Campinas, São Paulo ISBN 978-85-7029-145-5. 2018.

8. DIRETRIZES PARA AUTORES REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIA VETERINÁRIA

Os manuscritos devem ser redigidos na forma impessoal, espaço entre linhas duplo (exceto nas tabelas e figuras), fonte Times New Roman tamanho 12, em folha branca formato A4 (21,0 X 29,7 cm), com margens de três cm, páginas numeradas sequencialmente em algarismos arábicos, não excedendo a 20, incluindo tabelas e figuras (inclusive para artigos de revisão). As páginas

devem apresentar linhas numeradas (a numeração é feita da seguinte forma: menu arquivo/configurar página/layout/números de linha../numerar linhas). Não utilizar abreviações não-consagradas e acrônimos, tais como: "o T2 foi menor que o T4, e não diferiu do T3 e do T5". Quando se usa tal redação dificulta-se o entendimento do leitor e a fluidez do texto.

Citações no texto: são mencionadas com a finalidade de esclarecer ou completar as ideias do autor, ilustrando e sustentando afirmações. Toda documentação consultada deve ser obrigatoriamente citada em decorrência aos direitos autorais. As citações de autores no texto são em letras minúsculas, seguidas do ano de publicação. Quando houver dois autores, usar “e” e, no caso de três ou mais autores, citar apenas o sobrenome do primeiro, seguido de et al. (não-italico). Menciona-se a data da publicação que deverá vir citada entre parênteses, logo após o nome do autor. As citações feitas no final do parágrafo devem vir entre parênteses e separadas por ponto e vírgula, em ordem cronológica. Deve-se evitar referências bibliográficas oriundas de publicações em eventos técnico-científicos (anais de congressos, simpósios, seminários e similares), bem como teses, dissertações e publicações na internet (que não fazem parte de periódicos científicos). Deve-se, então, privilegiar artigos publicados em periódicos com corpo editorial (observar orientações percentuais e cronológicas no último parágrafo do item “Referências”). Citação de citação (apud): não é aceita.

Língua: Portuguesa, Inglesa ou Espanhola.

Tabela: deve ser mencionada no texto como Tabela (por extenso) e refere-se ao conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. São construídas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico (Ex.: Tabela 1. Ganho médio diário de ovinos alimentados com fontes de lipídeos na dieta). Ao final do título não deve conter ponto final. Não são aceitos quadros.

Figura: deve ser mencionada no texto como Figura (por extenso) e refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. Os desenhos, gráficos e similares devem ser feitos com tinta preta, com alta nitidez. As fotografias, no tamanho de 10 × 15 cm, devem ser nítidas e de alto contraste. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico (Ex.: Figura 1. Produção de leite de vacas Gir sob estresse térmico nos anos de 2005 e 2006). Chama-se a atenção para as proporções entre letras, números e dimensões totais da figura: caso haja necessidade de redução, esses elementos também são reduzidos e correm o risco de ficar

ilegíveis. Final do título não deve conter ponto final. Tanto as tabelas quanto as figuras devem vir o mais próximo possível, após sua chamada no texto.

Artigos científicos: devem ser divididos nas seguintes seções: título, título em inglês, autoria, resumo, palavras-chave, summary, keywords, introdução, material e métodos, resultados e discussão, agradecimentos (opcional) e referências; os títulos de cada seção devem ser digitados em negrito, justificados à esquerda e em letra maiúscula.

Título: Em português (negrito) e em inglês (itálico), digitados somente com a primeira letra da sentença em maiúscula e centralizados. Devem ser concisos e indicar o conteúdo do trabalho. Evitar termos não significativos como “estudo”, “exame”, “análise”, “efeito”, “influência”, “avaliação” etc.

Autores: A nomeação dos autores deve vir logo abaixo do título em inglês. Digitar o nome completo por extenso, tendo somente a primeira letra maiúscula. Os autores devem ser separados por vírgula. Todos devem estar centralizados. (Ex.: Roberto Carlos de Oliveira). A cada autor deverá ser atribuído um número arábico sobrescrito ao final do sobrenome, que servirá para identificar as informações referentes a ele. No rodapé da primeira página deverá vir justificada a esquerda e em ordem crescente a numeração correspondente, seguida pela afiliação do autor: Instituição; Unidade; Departamento; Cidade; Estado e País. Deve estar indicado o autor para correspondência com o respectivo endereço eletrônico.

Resumo e Summary: Devem conter entre 200 e 250 palavras cada um, em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase deve ser uma informação e não apresentar citações. Deve se iniciar pelos objetivos, descrever o material e métodos e apresentar os resultados seguidos pelas conclusões. Toda e qualquer sigla deve vir precedida da explicação por extenso. Ao submeter artigos em outra língua, deve constar o resumo em português.

Palavras-chave e keywords: Entre três e cinco, devem vir em ordem alfabética, separadas por vírgulas, sem ponto final, com informações que permitam a compreensão e a indexação do trabalho. Não são aceitas palavras-chave que já constem do título.

Introdução: Deve conter no máximo 2.500 caracteres com espaços. Explicação de forma clara e objetiva do problema investigado, sua pertinência, relevância e, ao final, os objetivos com a realização do estudo.

Material e Métodos (exceto para artigos de revisão e relato de caso): Não são aceitos subtítulos. Devem apresentar sequência lógica da descrição do local, do período de realização da pesquisa, dos tratamentos, dos materiais e das técnicas utilizadas, bem como da estatística utilizada na

análise dos dados. Técnicas e procedimentos de rotina devem ser apenas referenciados. Conter número de protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Instituição de no qual o estudo foi realizado.

Resultados e Discussão (exceto para artigos de revisão e relato de caso): Os resultados podem ser apresentados como um elemento do texto ou juntamente com a discussão, em texto corrido ou mediante ilustrações. Interpretar os resultados no trabalho de forma consistente e evitar comparações desnecessárias. Comparações, quando pertinentes, devem ser discutidas e feitas de forma a facilitar a compreensão do leitor.

Conclusões: Não devem ser repetição dos resultados e devem responder aos objetivos expressos no artigo.

Desenvolvimento (exclusivo para artigos de revisão): Deve ser escrita de forma crítica, apresentando a evolução do conhecimento, as lacunas existentes e o estado atual da arte com base no referencial teórico disponível na literatura consultada.

Agradecimentos: O uso é opcional. Deve ser curto e objetivo.

Referências: Devem ser relacionadas em ordem alfabética pelo sobrenome e contemplar todas aquelas citadas no texto. Menciona-se o último sobrenome em maiúsculo, seguido de vírgula e as iniciais abreviadas por pontos, sem espaços. Os autores devem ser separados por ponto e vírgula, digitadas em espaço simples, com alinhamento justificado a esquerda. As referências devem ser separadas entre si (a separação deve seguir o caminho parágrafo/espacamento e selecione: depois seis pontos). No mínimo 50% das referências devem ser de artigos publicados nos últimos dez anos. Referências de livros, anais, internet, teses, dissertações, monografias, devem ser evitadas.

9. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

1 **Perfil microbiológico em rebanhos leiteiros de agricultura familiar da região do**
2 **Arenito Caiuá, Noroeste do Paraná**

3 *Microbiological profile in family farming herds in the Caiuá Arenito region,*
4 *northwestern Paraná*

5 Rafaela Rosa Maiochi^{1*}, Sheila Rezler Wosiacki¹¹

6
7 **RESUMO**

8 Objetivos desse estudo foram: instruir as boas práticas de manejo do rebanho leiteiro em
9 propriedades de agricultura familiar; avaliar a qualidade do leite por meio da CCS e
10 CBT, avaliar a produção fenotípica de biofilme do leite cru bovino, identificar os grupos
11 bacterianos presentes nos rebanhos, avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana das
12 estirpes isoladas por meio da realização de antibiograma, detectando cepas resistentes
13 de interesse em saúde pública, utilizar os resultados obtidos para implantar melhorias
14 nas propriedades de agricultura familiar quanto ao correto diagnóstico e tratamento das
15 infecções da glândula mamária. Foram coletadas 422 amostras de leite individuais de
16 quatro propriedades de rebanhos leiteiros de agricultura familiar da região do Arenito
17 Caiuá, Noroeste do Paraná. Frente à qualidade do leite, 38,86% de todas as amostras
18 coletadas durante o período de estudo apresentaram CCS acima de 500.000 células/mL,
19 e 56,25% das amostras dos tanques de expansão apresentaram CBT acima dos limites
20 máximos estabelecidos pela IN 77. A produção fenotípica de biofilme foi caracterizada
21 em 55,4% das amostras de leite cru bovino avaliadas. Foram isoladas cepas bacterianas
22 em 41,7% das amostras coletadas. Destas, 24,43% pertencentes ao grupo dos gêneros
23 *Enterococcus spp./Streptococcus spp.*, 62,5% ao gênero *Staphylococcus spp.*, 12,5% ao

¹ Universidade Estadual de Maringá, Campus Fazenda, Departamento de Medicina Veterinária, Umuarama, Paraná, Brasil. Email: rafaelarmaiochi@gmail.com. Autora para correspondência.

24 grupo das Enterobactérias e 0,56% de BGN-NF. Das cepas bacterianas isoladas, 60,8%
25 apresentaram resistência fenotípica a pelo menos um dos antibióticos testados. Os
26 resultados mostram que processo de obtenção do leite e a sanidade da glândula mamária
27 dos rebanhos leiteiros de agricultura familiar estudados ainda são insatisfatórios. Os
28 produtores necessitam de assistência técnica contínua para buscar melhorias da
29 qualidade do produto e se adequar aos novos padrões determinados pela normativa
30 vigente.

31 **Palavras-chave:** biofilme, mastite bovina, qualidade do leite, resistência antimicrobiana

32

33 **SUMMARY**

34 The concentration of somatic cells and bacteria determines the quality of the milk, these
35 are related to the health of the animals and herd management techniques. One of the
36 main causes of the decrease in milk quality is mastitis, which continues to be one of the
37 main health problems in the milk production chain. Chronic infections are associated
38 with bacterial growth in biofilm form, being directly related to the persistence of
39 bacteria in the mammary gland and resistance to antimicrobials. The objectives of this
40 study were: to instruct the good management practices of the dairy herd in family
41 farming properties; assess milk quality through CCS and CBT; evaluate the phenotypic
42 biofilm production of raw bovine milk; identify the bacterial groups present in the
43 herds; Evaluate the antimicrobial sensitivity profile of the isolated strains by performing
44 an antibiogram, detecting resistant strains of interest to public health; use the results
45 obtained to implement improvements in family farming properties regarding the correct
46 diagnosis and treatment of mammary gland infections. A total of 422 individual milk
47 samples were collected from four properties of family farming dairy herds in the region
48 of Arenito Caiuá, Northwestern Paraná. As for milk quality, 38.86% of all samples

49 collected during the study period had CCS above 500,000 cells/mL, and 56.25% of the
50 expansion tank samples had CBT above the maximum limits established by IN 77. The
51 phenotypic production of biofilm was characterized in 55,4% of the raw bovine milk
52 samples evaluated. Bacterial strains were isolated in 41.7% of the collected samples. Of
53 these, 24.43% belonged to the *Enterococcus* spp. /*Streptococcus* spp. group, 62.5% to
54 the *Staphylococcus* spp., 12.5% to the Enterobacterial group, and 0.56% to BGN-NF.
55 Of the bacterial strains isolated, 60.8% showed phenotypic resistance to at least one of
56 the antibiotics tested. The results show that the process of obtaining milk and the health
57 of the mammary gland in the studied family farm dairy herds are still unsatisfactory.
58 Producers need continuous technical assistance to seek improvements in product quality
59 and adapt to the new standards determined by current regulations.

60 **Keywords:** antimicrobial resistance, biofilm, bovine mastitis, milk quality

61

62 INTRODUÇÃO

63 A bovinocultura leiteira é uma das atividades mais representativas da pecuária
64 brasileira. A partir de 2013, o país passou a ser considerado o quarto maior produtor
65 mundial de leite, com uma produção anual superior a 24 mil toneladas (FAO, 2013;
66 EMBRAPA, 2019).

67 De acordo com o último Censo Agropecuário (2017), a agricultura familiar é a base
68 da economia de 90% dos municípios brasileiros com até 20 mil habitantes. Ao todo,
69 entre as mais de 5 milhões de propriedades rurais de todo o Brasil, 77% (cerca de 3.9
70 milhões) são estabelecimentos agrícolas classificados como pertencentes à agricultura
71 familiar. O índice no estado do Paraná é semelhante ao registrado em nível nacional, a
72 agricultura familiar domina os estabelecimentos rurais, entre as mais de 305 mil

73 propriedades do estado, quase 229 mil são de agricultores familiares, o que representa
74 75% do total.

75 A composição química do leite torna-o um alimento altamente perecível, com
76 características intrínsecas ideais para o desenvolvimento de microrganismos, como
77 elevado valor nutricional, alta atividade de água e pH próximo à neutralidade. Segundo
78 Langoni et al. (2011), o leite é um meio propício para o desenvolvimento de
79 microrganismos desejáveis e outros patogênicos sendo necessário cuidados higiênico-
80 sanitários adequados desde a sua produção até o beneficiamento do produto. No entanto,
81 quando o animal apresenta um quadro clínico de infecção, pode ocorrer a contaminação
82 do leite pelo agente infeccioso, como o que ocorre nos animais acometidos por mastite.

83 Além da contaminação do leite pelo agente patogênico, a mastite bovina é uma
84 doença onerosa que afeta a rentabilidade da indústria do leite, devido à redução da
85 produção de leite pelo animal acometido (VILLA-ARCILA et al., 2017), além de
86 aumentar a contagem de células somáticas e provocar danos nos tecidos secretores das
87 glândulas mamárias, ocasionados por micro-organismos presentes (FORSBACK et al.,
88 2009)

89 As concentrações de células somáticas e de bactérias determinam a qualidade do
90 leite, portanto, cuidados no manejo do rebanho, sanidade dos animais, redução dos
91 índices de mastite, obtenção higiênica do leite e armazenagem adequada exercem
92 importante impacto nas características do produto final (MONTANHINI, 2018;
93 RUIZCORTÉS et al., 2012).

94 A mastite é considerada uma das principais causas para o uso de antibióticos em
95 bovinos leiteiros, sendo este um componente importante no controle da enfermidade
96 (KALIWAL et al., 2011). No entanto, o uso prudente e racional de antimicrobianos
97 deve ser respeitado, visto que a utilização dessas substâncias indiscriminadamente pode

98 criar uma pressão seletiva de espécies resistentes e alterar a ecologia bacteriana
99 (GUARDABASSI et al., 2010). Segundo (ASLANTAS; DEMIR, 2016) a resistência
100 aos antibióticos está relacionada ao uso indiscriminado para o tratamento e prevenção
101 da mastite em rebanhos leiteiros.

102 Os microrganismos possuem capacidade de adaptação ao estresse ambiental e
103 diversidade metabólica. As bactérias possuem dois estágios de vida, sendo classificadas
104 como células planctônicas, aquelas que possuem vida livre, importantes para a
105 proliferação, propagação e as sésseis, conhecidas como biofilme, as quais possuem
106 características de cronicidade (TRENTIN et al., 2013).

107 Biofilmes são descritos como aglomerações de células embebidas em matriz
108 heterogênea extracelular, que resultam em estruturas tridimensionais com características
109 fisiológicas específicas e dificultam a ação dos macrófagos, além de aumentarem a
110 resistência a diversos antimicrobianos (MARQUES et al., 2013). Atualmente se discute
111 o papel dos fatores de virulência de bactérias causadoras de mastite, como a produção
112 de biofilme, na persistência e disseminação no hospedeiro, na expressão da doença
113 grave e na interferência do tratamento com antimicrobianos (ISRAEL et al., 2018).

114 A agricultura familiar é de extrema importância para o país, seja pela quantidade de
115 agricultores envolvidos, como pela garantia da produção de alimentos à população
116 como um todo. Diante da importância e heterogeneidade da pecuária leiteira nacional,
117 além da crescente atenção do mercado em relação à qualidade do leite, o diagnóstico
118 das propriedades leiteiras se torna fundamental para identificar o perfil de produção
119 adotado em diferentes regiões do Brasil (REIS et al., 2020).

120

121 MATERIAL E MÉTODOS

122 Inicialmente, em parceria com a IDR Paraná (antiga EMATER), foram selecionadas
123 quatro propriedades rurais caracterizadas como agricultura familiar, situadas na região
124 do Arenito Caiuá, Noroeste do Paraná. As propriedades rurais possuíam a pecuária
125 leiteira como atividade econômica principal e faziam parte das propriedades
126 classificadas como modelo pelo IDR Paraná.

127 Amostras de 50 mL de leite foram coletadas em frascos estéreis, após as etapas de
128 higienização do úbere e pré-dipping dos tetos, de todos os animais em lactação das
129 quatro propriedades rurais selecionadas. Os animais variaram em cada mês devido a
130 mudanças no estágio de produção (lactação ou período seco).

131 As coletas foram realizadas mensalmente, durante o período compreendido entre
132 fevereiro a junho de 2019, totalizando 422 amostras, sendo 77 da propriedade 1 (P1),
133 122 da propriedade 2 (P2), 30 da propriedade 3 (P3) e 193 da propriedade 4 (P4).

134 No Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá UEM -
135 Campus De Tecnologia de Umuarama - PR, as amostras foram submetidas
136 individualmente ao teste de CMT e de formação de coágulo por fermentação. Para as
137 análises de CCS, CBT e composição centesimal, as mesmas foram encaminhadas ao
138 Laboratório do Programa de Análise do Leite da Associação Paranaense de Criadores de
139 Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), localizado em Curitiba, Paraná.

140 As amostras foram coletadas conforme o manual de operações de campo da
141 APCBRH, e acondicionadas em recipientes de polietileno estéreis contendo
142 conservantes apropriados, o agente bacteriostático azidiol para análise de CBT e o
143 bronopol, para análise de CCS. As amostras foram mantidas refrigeradas e
144 encaminhadas em caixa de isopor para o laboratório para a realização das análises por
145 meio de equipamento automático, cujo princípio analítico baseia-se na citometria de

146 fluxo, conforme descrito em ISO 13366-2/IDF 148-2, sendo os resultados expressos em
147 células/mL.

148 A partir dos resultados de CMT, formação de coágulo por fermentação, produção de
149 biofilme pelo leite cru e CCS foram selecionadas amostras com CCS > 200.000 CS/mL
150 de cada propriedade para análise de identificação bacteriana e posterior teste de
151 sensibilidade aos antimicrobianos.

152 A produção fenotípica de biofilme das amostras avaliadas foi determinada pelo
153 cultivo bacteriano em Ágar Vermelho Congo (CRA), segundo Freemann et al. (1989)
154 modificado, constituído de ágar nutriente (Himedia®) 28 g/L, sacarose (Synth®) 50 g/L
155 e corante Vermelho Congo (Synth®) 0,8 g/L.

156 Alíquotas de 10uL das amostras individuais de leite foram semeadas em placas
157 CRA, incubadas à temperatura de 37°C por 48 horas. A partir da produção de colônias
158 rugosas e pretas foram consideradas estirpes produtoras de biofilme, quando
159 acompanhadas pela mudança da coloração do meio adjacente para preto, entretanto, as
160 colônias lisas e vermelhas foram consideradas como não produtoras de biofilme
161 (FREEMANN *et al.*, 1989). Para cada mês foi considerado o porcentual de amostras
162 com formação de biofilme positiva em relação ao total de animais em lactação das
163 propriedades individualmente.

164 De cada amostra foi realizado o estriamento de 10 µL em placas de Petri contendo
165 Ágar Nutriente para o isolamento da contaminação bacteriana, sendo incubadas à
166 temperatura de 37°C por 48 horas. Das amostras de leite de animais que apresentaram
167 mastite clínica ou subclínica foram realizadas novas sementeiras das colônias isoladas
168 previamente em Ágar Nutriente para identificação do grupo e realização do
169 antibiograma (CLSI, 2015).

170 No laboratório de Microbiologia Animal do Campus Regional de Umuarama da
171 Universidade Estadual de Maringá (UEM), as amostras selecionadas foram semeadas
172 separadamente em ágar nutriente (Himedia®) e incubadas por 24 horas à 36°C. A
173 identificação do grupo bacteriano foi realizada por características morfo-tintoriais sendo
174 realizado o esfregaço de cada colônia, corado pelo método de Gram e visualizado por
175 microscopia ótica no aumento de 100x sob imersão.

176 De acordo com as características das colônias (cor, aspecto, tamanho e presença de
177 hemólise) e observação por microscopia óptica após a coloração de Gram, os cocos
178 Gram-positivos foram submetidos ao teste da catalase e os cocos Gram-negativos ao
179 teste da oxidase. Estirpes cocos Gram-positivos catalase positivos foram classificadas
180 como sendo do gênero *Staphylococcus* spp. e estirpes cocos Gram-positivos catalase
181 negativos, como *Streptococcus* spp. / *Enterococcus* spp. Estirpes cocos Gram-negativos
182 oxidase positivos foram classificadas como sendo do grupo de Bacilos Gram-negativos
183 não fermentadores (BGN-NF) e estirpes cocos Gram-positivos oxidase negativos, como
184 Enterobactérias. Dessa forma as amostras foram classificadas em quatro grupos,
185 *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. / *Enterococcus* spp., Enterobactérias e BGN-
186 NF.

187 A sensibilidade dos isolados aos antimicrobianos foi avaliada pelo método de disco-
188 difusão em ágar (BAUER *et al.*, 1966), de acordo com as normas do *Clinical and*
189 *Laboratory Standards Institute* (CLSI). Os isolados foram classificados como
190 resistentes ou sensíveis aos antimicrobianos.

191 Os antimicrobianos testados variaram conforme o grupo bacteriano. Sendo eles e
192 suas respectivas concentrações: ampicilina (10 µg), penicilina (10 UI), tetraciclina (30
193 µg), gentamicina (10 µg), ciprofloxacino e ceftriaxona para *Enterococcus* spp. e
194 *Streptococcus* spp.; Sulfazotrim (25 µg), cefoxitina (30 µg), penicilina G (10 UI),

195 tetraciclina (1 µg), gentamicina (10 µg), e ciprofloxacino para *Staphylococcus* spp.;
196 Ampicilina (10 µg), ceftriaxona, tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg),
197 ciprofloxacino e sulfazotrim (25 µg) para Enterobactérias e gentamicina (10 µg),
198 ciprofloxacino e ceftriaxona para BGN-NF.

199 Os resultados de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos foram expressos em
200 sensível ou resistente, sendo que os isolados que apresentaram sensibilidade
201 intermediária foram considerados resistentes. A leitura dos halos de inibição de
202 crescimento foi realizada com a medição do diâmetro em milímetros e utilizada para
203 classificar a sensibilidade ou resistência dos isolados em relação aos antimicrobianos de
204 acordo com os critérios do CLSI (2015).

205 Após obtenção dos resultados, os médicos veterinários da IDR Paraná levavam as
206 informações até os produtores durante visitas mensais e discutiam e orientavam sobre as
207 boas práticas de manejo, com o objetivo de reduzir as contagens de CCS e CBT no
208 rebanho.

209 Os produtores foram instruídos para a melhor condução do tratamento, com
210 indicação da forma e tempo corretos de administração de medicamentos, sobre a
211 necessidade do descarte do leite durante o tratamento com antibióticos, a terapia da vaca
212 seca e a segregação ou até mesmo descarte de animais cronicamente infectados.

213 Também foram instruídos sobre o manejo correto dos animais para evitar a
214 contaminação do restante do rebanho, estabelecendo a sugestão de uma linha de
215 ordenha onde a ordem seriam vacas de primeira lactação saudáveis, vacas de duas lactações
216 ou mais com CCS inferior a 200.000 células/mL⁻¹ ou teste de CMT negativo; animais
217 que apresentaram alta CCS ou teste de CMT positivo; e vacas com grumos no leite ou
218 em tratamento, das quais o leite deveria ser descartado.

219

220 RESULTADOS E DISCUSSÃO

221 Na Tabela 1 é possível observar os números de amostras coletadas mensalmente em
 222 cada propriedade e a quantidade de amostras que apresentaram valor de CCS maior que
 223 o estipulado pelas Instruções Normativas 76 e 77 (IN 76 e IN 77) do Ministério da
 224 Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de 2018.

225 Tabela 1. Relação entre o número de amostras coletadas e a CCS (cél.mL⁻¹), das quatro
 226 propriedades de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá avaliadas, no período de
 227 fevereiro a junho de 2019

PROPRI IDADE	FEVEREIRO			MARÇO			ABRIL			MAIO			JUNHO		
	N1	N2	%	N1	N2	%	N1	N2	%	N1	N2	%	N1	N2	%
P1	20	9	45	20	12	60	10	6	60	12	7	58,3	15	8	53,3
P2	23	9	39,1	27	8	29,6	26	5	19,2	22	3	13,6	24	2	8,3
P3	9	6	66,6	5	2	40	7	3	42,8	2	2	100	7	6	85,7
P4	43	17	39,5	40	22	55	39	12	30,7	41	11	26,8	30	14	46,6

228 N1: número total de animais; N2: número de animais com CCS>500.000; P1:
 229 propriedade 1; P2: Propriedade 2; P3: Propriedade 3; P4: Propriedade 4. Fonte:
 230 MAIOCHI, 2021.

231 Analisando P1, durante todo o período, 42 amostras (54,54%) apresentaram
 232 contagens maiores que 500.000 células/mL, limite máximo estabelecido pela IN 77
 233 (2018) que passou a vigorar durante a realização do estudo. Já para a P2, 27 amostras
 234 (22,13%) apresentaram CCS acima dos parâmetros vigentes.

235 A P3 foi a que apresentou o menor número de animais durante o estudo, porém com
 236 a maior porcentagem de animais com alta CCS, chegando a 63,33% (19 amostras
 237 durante o período). Além disso, é relevante pontuar que esta foi a propriedade estudada
 238 com menor tecnificação.

239 Das 193 amostras coletadas da P4, 76 (39,38%) apresentaram alto valor de CCS,
 240 sendo que os meses de maior prevalência foram fevereiro e março, com 39,53% e
 241 51,16%, respectivamente, de animais acima dos limites preconizados pela IN 77.

242 Na Tabela 2 são apresentados os valores de CBT mensais para os resfriadores de
 243 cada propriedade.

244

245

246

247 Tabela 2. Valores de CBT (UFC.mL⁻¹) dos resfriadores das quatro propriedades de
 248 agricultura familiar da região do Arenito Caiuá avaliadas, no período de fevereiro a
 249 junho de 2019

PRODUTO R	FEVEREIRO	MARÇO	ABRIL	MAIO	JUNHO
P1	-	15.000	3.916.000	2.452.000	1.030.000
P2	-	13.000.000	4.202.000	3.047.000	1.920.000
P3	-	90.000	32.000	23.000	9.000
P4	-	18.000.000	34.000	3.047.000	646.000

250 Fonte: MAIOCHI, 2021.

251 No mês de fevereiro não foram encaminhadas ao laboratório terceirizado as
 252 amostras dos resfriadores, porém realizou-se a inoculação das amostras utilizando a
 253 técnica *pour plate* e os resultados obtidos estavam abaixo dos parâmetros definidos
 254 pelas INs 76 e 77.

255 De acordo com as IN 76 e 77, os valores máximos para CBT são de 900.000
 256 UFC/mL. É possível observar na tabela acima que a P2 apresentou todos os resultados
 257 mensais fora do padrão estabelecido pela legislação.

258 Como a CBT é uma medida direta de contaminação do leite, alguns fatores
 259 relacionados ao animal também atuam de forma importante e podem explicar por que
 260 um produtor pode ser capaz de controlar a CBT e não a CCS (BOZO et al., 2013). Este
 261 fator pode ser verificado em avaliação da P3, sendo a propriedade que apresentou as
 262 taxas de CBT mais baixas em todos os meses de estudo, todavia com a maior
 263 porcentagem de animais com alta CCS, chegando a 63,33% (19 amostras durante o
 264 período).

265 Segundo Xavier et al (2018) a qualidade do leite é influenciada pelo grau de
 266 tecnologia utilizada em sua produção, portanto o leite cru produzido por agricultores
 267 familiares brasileiros de pequeno porte, que possuem pouca tecnificação, podem
 268 apresentar uma qualidade microbiológica não satisfatória, o que corrobora com os

269 resultados encontrados neste estudo, tanto frente aos resultados de CCS quanto de CBT.
 270 Verificou-se que das quatro propriedades avaliadas, apenas uma apresentou resultados
 271 de CBT do tanque de expansão de todos os meses de acordo com os valores máximos
 272 estipulados pelas IN 76 e 77. No entanto, a P2 apresentou todos os resultados mensais
 273 fora do padrão estabelecido pela legislação. Esse é um grande problema para atividade
 274 leiteira, que deveria produzir leite com melhor qualidade microbiológica para oferecer
 275 um maior rendimento industrial.

276 Quanto à capacidade de formação de biofilme, após avaliação visual das placas
 277 contendo a semeadura das amostras de leite, aquelas que apresentaram produção de
 278 colônias rugosas e pretas foram consideradas produtoras de biofilme quando
 279 acompanhadas pela mudança da coloração do meio adjacente para preto, entretanto, as
 280 colônias lisas e vermelhas foram consideradas como não produtoras de biofilme
 281 (FREEMANN et al., 1989). A Tabela 3 mostra as porcentagens mensais de amostras
 282 fenotipicamente produtoras de biofilme de fevereiro a maio.

283 Tabela 3. Porcentagem de amostras fenotipicamente produtoras de biofilme

PROPRIEDADE	FEVEREIRO		MARÇO		ABRIL		MAIO	
	N	%	N	%	N	%	N	%
P1	20	85%	20	70%	10	100%	12	58,3%
P2	23	65,2%	27	37%	26	57,7%	22	63,6%
P3	9	66,7%	5	80%	7	85,7%	6	83,3%
P4	43	62,8%	40	32,5%	39	41%	43	37,2%

284 Fonte: MAIOCHI, 2021

285 A produção fenotípica de biofilme em CRA é interpretada pela alteração da
 286 coloração do meio, considerando-se positivas as amostras que apresentaram alteração da
 287 coloração do meio e negativas as que não apresentaram alteração.

288 Considerando todo o período avaliado, a P1 apresentou 77,4% das amostras
 289 produtoras de biofilme, a P2 55%, a P3 77,8% das amostras e a P4 37,2%.

290 Pela detecção fenotípica da capacidade de produção de biofilme, considerando todas
 291 as propriedades e o período total deste estudo, encontrou-se que 55,4% das estirpes

292 isoladas foram produtoras de biofilme. Entretanto, essa incidência foi menor que
 293 detectada no estudo de Darwish et al. (2013) onde 70,4% dos isolados de leite bovino
 294 foram produtores de biofilme em CRA, e por Melo (2011) que detectou pelo CRA que
 295 79,4% das estirpes foram produtoras de biofilme dos 316 isolados de leite bovino.

296 Foi verificada presença de microrganismos fenotipicamente produtores de biofilme
 297 nas amostras de leite analisadas em todas as propriedades e em todo o período de
 298 estudo, implicando em risco de contaminação por esses microrganismos em toda a
 299 cadeia produtiva do leite e seus derivados.

300 Na tabela 5 estão apresentados os isolados por grupo bacteriano das amostras de
 301 leite de mastite clínica e subclínica das quatro propriedades de agricultura familiar
 302 durante todo o período avaliado.

303 Tabela 5. Amostras de leite de mastite clínica e subclínica analisadas e classificadas em
 304 grupos bacterianos, das quatro propriedades de agricultura familiar em todo o período
 305 avaliado.

Grupos Bacterianos	P1		P2		P3		P4	
	n	%	n	%	n	%	N	%
<i>Enterococcus</i> spp./ <i>Streptococcus</i> spp.	20	38,46	3	10,34	0	0	20	23,8
<i>Staphylococcus</i> spp.	29	55,77	16	55,77	10	91	55	65,48
Enterobactérias	3	5,77	9	31	1	9	9	10,7
BGN-NF	0	0	1	3,45	0	0	0	0
Total de isolados	52	100	29	100	11	100	84	100

306 n = número de cepas isoladas por grupo bacteriano de cada propriedade. Fonte:
 307 MAIOCHI, 2021.

308 Em todo o período avaliado, foram isoladas cepas bacterianas em 67,5% das
 309 amostras coletadas da propriedade 1 (P1), em 23,77% das amostras coletadas da
 310 propriedade 2 (P2), em 36,67% da propriedade 3 (P3) e em 43,52% da propriedade 4
 311 (P4).

312 Dentre os grupos bacterianos, o gênero *Staphylococcus* spp. foi o de maior
 313 incidência em todas as propriedades, sendo que chegou a 65,48% dos isolados da P4,
 314 maior número observado no estudo. Em seguida, o grupo de *Enterococcus* spp. e
 315 *Streptococcus* spp. também apresentaram incidência elevada, dessa vez chegando a
 316 38,46% dos isolados da P1.

317 Na tabela 6, observa-se a distribuição, por grupos e por propriedades, dos isolados
 318 resistentes aos antimicrobianos pelo teste de disco-difusão.

319 Tabela 6. Resistência por disco-difusão das estirpes isoladas das 4 propriedades de
 320 agricultura familiar da região do Arenito Caiuá, em todo o período de avaliação.

Grupo bacteriano	Antimicrobiano	P1		P2		P3		P4	
		n R	%	n R	%	n R	%	n R	%
<i>Enterococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp.	Ampicilina	0	0	0	0	0	0	0	0
	Penicilina	0	0	1	33,33	0	0	0	0
	Gentamicina	0	0	0	0	0	0	0	0
	Tetraciclina	10	50	2	66,66	0	0	0	0
	Ceftriaxona	0	0	1	33,33	0	0	0	0
	Ciprofloxacino	0	0	2	66,66	0	0	1	5
<i>Staphylococcus</i> spp.	Penicilina	20	68,96	9	56,25	7	70	21	38,18
	Gentamicina	1	3,45	3	18,75	0	0	2	3,64
	Tetraciclina	8	27,6	5	31,25	1	10	11	20
	Sulfazotrim	4	13,8	6	37,5	0	0	6	10,9
	Ciprofloxacino	4	13,8	7	43,75	3	30	11	20
	Cefoxitina	4	13,8	1	6,25	0	0	8	14,54
Enterobactérias	Ampicilina	3	100	7	77,77	1	100	3	33,33
	Tetraciclina	3	100	4	44,44	1	100	1	11,11
	Ceftriaxona	3	100	6	66,66	1	100	4	44,44
	Gentamicina	0	0	1	11,11	0	0	2	22,22
	Ciprofloxacino	1	33,33	3	33,33	1	100	2	22,22
	Sulfazotrim	3	100	2	22,22	1	100	0	0
BGN-NF	Gentamicina	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ciprofloxacino	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ceftriaxona	0	0	1	100	0	0	0	0

321 Fonte: MAIOCHI, 2021.

322 NR = Número de resistentes; P1 = propriedade 1; P2 = propriedade 2; P3 =
 323 propriedade 3; P4 = propriedade 4; BGN-NF = Bactérias Gram Negativas Não-
 324 Fermentadoras.

325 Verificou-se resistência das estirpes a mais de um princípio ativo, sendo que a maior
326 resistência ocorreu frente às penicilinas dos isolados do gênero *Staphylococcus* spp. em
327 todas as propriedades avaliadas. Todavia, em 69 amostras observou-se a sensibilidade a
328 todos os antimicrobianos testados e nenhuma das amostras foi resistente a todos às
329 classes de antimicrobianos.

330 Em relação à resistência por grupos bacterianos da P1, das 20 amostras isoladas de
331 *Enterococcus* spp. / *Streptococcus* spp., 50% se apresentaram resistentes a pelo menos
332 um dos antibióticos testados. Enquanto que, dos 29 isolados de *Staphylococcus* spp.
333 82,75% foram resistentes a, pelo menos, um antimicrobiano. Todas as três amostras
334 isoladas de Enterobactérias foram resistentes.

335 Na P2 observou-se resistência bacteriana a no mínimo um antibiótico em todos os 3
336 isolados de *Enterococcus* spp. / *Streptococcus* spp., em 75% dos 16 isolados de
337 *Staphylococcus* spp., em 77,77% dos 9 isolados de Enterobactérias e no único isolado
338 de BGN-NF.

339 Para a P3 foram observadas resistências em 70% das 10 amostras de *Staphylococcus*
340 spp. e no único isolado de Enterobactéria.

341 Quanto às resistências avaliadas em P4, no grupo de *Enterococcus* spp. /
342 *Streptococcus* spp., apenas 1 das 20 amostras apresentou resistência, enquanto que para
343 o grupo de *Staphylococcus* spp. e Enterobactérias, as taxas de resistência a pelo menos
344 um antimicrobiano foi de 60% e 55,55%, respectivamente.

345 Do total de 422 amostras de leite, de todo o período e de todas as propriedades,
346 analisadas após cultivo e identificação microbiológica, foram isolados 176 cepas das
347 quais 107 (60,8%) foram resistentes a pelo menos um antibiótico testado.

348 Dentre os isolados de *Streptococcus* spp. / *Enterococcus* spp. da P1, 50%
349 apresentaram resistência à tetraciclina. Esta baixa susceptibilidade ao microbiano
350 também foram observados nos isolados do mesmo grupo da P2.

351 Pode-se observar que os isolados do grupo de Enterobactérias das quatro
352 propriedades apresentaram baixa suscetibilidade aos antimicrobianos testados.

353 Segundo Bardiau et al. (2016), dentre os agentes responsáveis pela mastite,
354 destacam-se bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. Mota et al.
355 (2012) isolaram 39,3% de bactérias do gênero *Staphylococcus* em 1080 amostras de
356 leite bovino. No presente estudo, o gênero *Staphylococcus* spp. foi o mais isolado em
357 todas as propriedades em todos os meses, sendo 55,77% das amostras isoladas da P1 e
358 P2, chegando a 91% dos isolados da P3 e 65,48% da P4.

359 Segundo Aslantas et al. (2016), das 112 amostras de *Staphylococcus aureus*
360 isoladas, a maior resistência no teste de disco-difusão foi frente à penicilina 45,5%. Bal
361 et al. (2010), determinaram em seu estudo que a maior resistência dos *Staphylococcus*
362 spp. coagulase negativo, testados pelo método de disco-difusão, foi à penicilina com
363 (58%) das 69 amostras isoladas. Os valores apresentados por Aslantas et al., (2016) e
364 Bal et al., (2010) corroboram nossas observações nos isolados do gênero
365 *Staphylococcus* spp. de todas as propriedades avaliadas no presente estudo.

366 Por outro lado, De Jong et al. (2018), analisando amostras de mastite clínica de nove
367 países europeus, observaram que apenas 25% dos *S. aureus* foram resistentes à
368 penicilina. Essa diferença sugere que a susceptibilidade dos estafilococos à penicilina
369 varia de acordo com o país ou região.

370 As variações nos níveis de sensibilidade podem ser explicadas pelo uso
371 indiscriminado da penicilina na medicina veterinária, possibilitando a seleção de cepas
372 resistentes e a produção de β -lactamases em cepas de *Staphylococcus* spp. Segundo

373 Ardic et al. (2005), como consequência do uso indiscriminado de antimicrobianos, há
374 um aumento elevado no grau de resistência às classes de antimicrobianos.

375 **CONCLUSÃO**

376 Os resultados indicam que o processo de obtenção do leite e a sanidade da glândula
377 mamária dos rebanhos leiteiros de agricultura familiar da região do Arenito Caiuá
378 estudados ainda são insatisfatórios. Os produtores necessitam de assistência técnica
379 contínua para buscar melhorias da qualidade do produto e se adequar aos novos padrões
380 determinados pela normativa vigente.

381 Outros estudos deverão ser realizados para a detecção genotípica da produção de
382 biofilmes de propriedades de agricultura familiar e detecção genotípica de resistência
383 frente aos antimicrobianos mais utilizados na pecuária leiteira da região.

384 Atividades extensionistas devem ser realizadas voltadas à conscientização das boas
385 práticas de manejo, controle da mastite subclínica e uso racional de antimicrobianos no
386 rebanho leiteiro.

387 As parcerias firmadas com a IDR Paraná e a APCBRH foram fundamentais na
388 consolidação dos objetivos traçados para a execução da pesquisa, de forma integradora
389 e colaborativa para a execução das coletas e análises propostas. Foi possível constatar a
390 importância do respaldo de análises de CCS, CBT e antibiograma para uma ação mais
391 efetiva junto às propriedades rurais, em relação à mastite bovina.

392 **REFERÊNCIAS**

393 ARDIC, N.; OZYURT, N.; SARRYUPOGLU, B.; HAZNEDAROGLU, T.
394 Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant
395 staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, p. 213–218, 2005.

396 ASLANTAS, Õ.; DEMIR, C. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-
397 forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. *Journal*
398 *of Dairy Science*, v. 99, n. 11, p.8607-8613, 2016.

399 BAL, E.B.; BAYAR, S.; BAL, M.A. Antimicrobial Susceptibilities of Coagulase-
400 Negative Staphylococci (CNS) and Streptococci from Bovine Subclinical Mastitis
401 Cases. *Journal of Medical Microbiology*, v 48, n. 3, p. 267-274, 2010.

- 402 BARDIAU, M.; CAPLIN, J.; DETILLEUX, J.; GRABER, H.; MORONI, P.;
403 TAMINIAU, B.; MAINIL, J. G. Existence of two groups of *Staphylococcus aureus*
404 strains isolated from bovine mastitis based on biofilm formation, intracellular survival,
405 capsular profile and agrotyping. *Veterinary Microbiology*, 2016.
- 406 BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk
407 method. *Am. J. Clin. Microbiol.*, 40: 2413-5, 1966.
- 408 BOZO, G. A.; ALEGRO, L. C. A.; SILVA, L. C.; SANTANA, E. H. W.; OKANO, W.;
409 SILVA, L. C. C. Adequação da contagem de células somáticas e da contagem
410 bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação. *Arq. Bras. Med.*
411 *Vet. Zootec*, v. 65, n. 2, 2013
- 412 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.
413 76 de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as
414 características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite
415 pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. *Diário Oficial da União, Brasília*, 30 de
416 novembro de 2018.
- 417 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.
418 77 de 26 de novembro de 2018. Critérios e procedimentos para a produção,
419 acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em
420 estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. *Diário Oficial da União*,
421 *Brasília*, 30 de novembro de 2018.
- 422 BRASIL, 2017. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem
423 Animal (RIISPOA). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- 424 CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved
425 standard, 25th ed. Informational Supplement. CLSI document M100-A25. Wayne, PA,
426 USA. 2015.
- 427 DARWISH, S.F.; ASFOUR, H.A.E. Investigation of Biofilm Forming Ability in
428 *Staphylococci* Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays. *The*
429 *Scientific World Journal*, p.1-9, 2013.
- 430 DE JONG A, GARCH FE, SIMJEE S, MOYAERT H, ROSE M, YOUALA M, et al.
431 Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of
432 clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Vet Microbiol.* 213:73-
433 81. 2018.
- 434 DELLA LIBERA, A. M. M. P.; ARAÚJO, W. P.; BLAGITZ, M. G.; BASTOS, C. R.;
435 AZEDO, M. R.; TRLADI, A. S. Mastitis after induced mammogenesis in a nulliparous
436 goat. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 74, n. 1, p. 29-31, 2007.
- 437 EMBRAPA. Anuário do leite 2019. Agropecuária, Empresa Brasileira de Pesquisa, p.
438 104, 2019.
- 439 EUCAST. 2013. EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL
440 SUSCEPTIBILITY TESTING. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone
441 diameters.
- 442 FAO. Perspectivas dos alimentos - uma análise dos mercados mundiais (leite e produtos
443 lácteos). Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/ai474e/ai474e10.htm>>.

- 444 FORSBACK, L.; MANSSON, H. L.; ANDREN, A.; AKERSTEDT, M.;
445 SVENNERSTEN, K. S. Udder quarter milk composition at diferente levels of somatic
446 cell count in cow composite milk. *Animal*, v. 3, n. 5, p. 710-717, ano 2009.
- 447 FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime
448 production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, v. 42, p.
449 872-874, 1989.
- 450 GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. Guia de antimicrobianos em
451 veterinária. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- 452 IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:
453 <http://www.ibge.gov.br/home>.
- 454 IDR Paraná – Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná. Disponível em:
455 <http://www.idrparana.pr.gov.br/>
- 456 ISRAEL L.F.S. , Rabello R.F. , Domingos S.C.B. , Medeiros L.S. Produção de biofilme
457 por *Staphylococcus chromogenes* isolados de amostras de leite provenientes de
458 rebanhos bovinos com mastite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.70, n.6, p.1943-1949,
459 2018.
- 460 KALIWAL, B.B.; SADASHIV, S.O.; KURJOGI, M.M.; SANAKAL, R.D. Prevalence
461 and Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci isolated from
462 Bovine Mastitis. *Veterinary World*, v.4, n.4, p.158- 161, 2011.
- 463 LANGONI, H et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesquisa*
464 *Veterinária Brasileira*,p. 1059-1065, dez. 2011.
- 465 MARQUES, V.F.; SOUZA, M.M.S.; MENDONÇA, E.C.L. et al. Análise fenotípica e
466 genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como
467 contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.33, p.161-170, 2013.
- 468 MELO, P. C.; FERREIRA, L. M.; NADER-FILHO, A.; ZAFALON, L.F.; VICENTE,
469 H.I.G. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de
470 *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastites subclínica bovina. *Biociência*
471 *Journal*, 28(1): 94-99, 2012.
- 472 MONTANHINI M. T. M. Influência da qualidade do leite cru em produtos processados,
473 2018. Disponível em: <[https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-](https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/influencia-da-qualidade-do-leite-cru-em-produtos-lacteos-processados-209474)
474 [laticinios/influencia-da-qualidade-do-leite-cru-em-produtos-lacteos-processados-209474](https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria-de-laticinios/influencia-da-qualidade-do-leite-cru-em-produtos-lacteos-processados-209474)
- 475 MOTA, R.A.; DE MEDEIROS, E.S.; DOS SANTOS, M.V; JÚNIOR, J.W.P.;
476 MOURA, A.P.B.L; COUTINHO, L.C.A. Participação dos *Staphylococcus* spp na
477 etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). *Ci. Anim.*
478 *Bras.*, Goiânia, 13(1):124-130. 2012.
- 479 REIS, E. M. B.; VIEIRA, J. A.; LOPES, M. A.; DEMEU, F. A.; BRUHN, F. R. P.;
480 VICENTE, F. H.; PEREIRA, A. B.; FILHO, L. M. S. Diagnóstico de propriedades
481 leiteiras e fatores associados à qualidade higiênico sanitária do leite. *Pubvet* v.14, n.2,
482 a508, p.1-15, Fev., 2020

- 483 RUIZCORTÉS, T et al. Factores que afectan el recuento de UFC en la leche en tanque
484 en hatos lecheros del norte de Antioquia-Colombia. Revista U.D.C.A Actualidad &
485 Divulgación Científica. v. 15, n. 1, p. 147-155, 2012.
- 486 TRENTIN, D.S.; GIORDAN, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos:
487 aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. Revista Liberato, Novo
488 Hamburgo v.12, n.22, p.113-238, jul./dez, 2013.
- 489 VILLA-ARCILA, N, A.; SANCHEZ, J.; RATTO, M. H.; RODRIGUEZ-LECOMPTE,
490 J. C.; DUQUE-MADRID, P. C.; SANCHEZ-ARIAS, S.; CEBALLOS-MARQUEZ, A.,
491 A associação entre a mastite subclínica em torno de parto e desempenho reprodutivo em
492 pastagem de vacas leiteiras. Ciência Reprodução Animal, v. 185, p. 109-117, ano 2017.
- 493 XAVIER, B. C. P.; ROMA JÚNIOR, L. C.; DIZERÓ, M. F. C.; CASTELANI, L.;
494 ARCARO, J. R. P. Impacto da assistência técnica sobre as características higiênicas de
495 produção e sua relação com a melhoria da qualidade do leite. 12º Congresso
496 Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018 01 a 03 de agosto de 2018 –
497 Campinas, São Paulo ISBN 978-85-7029-145-5. 2018.