



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**DETECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS, RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS E
CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU
REFRIGERADO PROVENIENTES DE LATICÍNIOS DA MICRORREGIÃO DE
IMPERATRIZ, MA.**

ELINE OLIVEIRA PACHECO

SÃO LUÍS – MA

2014

ELINE OLIVEIRA PACHECO

**DETECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS, RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS E
CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM AMOSTRAS DE LEITE CRU
REFRIGERADO PROVENIENTES DE LATICÍNIOS DA MICRORREGIÃO DE
IMPERATRIZ, MA.**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Neide Costa

SÃO LUÍS – MA

2014

Pacheco, Eline Oliveira

Detecção de micro-organismos, resíduos de antimicrobianos e células somáticas provenientes de laticínios da microrregião de Imperatriz, Maranhão/ Eline Oliveira Pacheco. 2014.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2014.

Orientação: Prof^ª. Dra. Francisca Neide Costa.

1. Qualidade do leite. 2. Antimicrobianos. 3. Células Somáticas.
I. Título.

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: _____ de _____ de
2014 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Lúcia Maria Coelho Alves – UEMA

1º membro

Prof. Dr. Helder de Moraes Pereira – UEMA

2º membro

Profa. Dra. Francisca Neide Costa – UEMA

Orientadora

Aos meus pais e a minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, pela proteção e permissão da realização de mais uma etapa na minha vida.

Aos meus queridos pais que são minha base e fonte de inspiração.

As minhas irmãs que sempre me acompanham mesmo de longe.

As minhas colegas de turma pela união, que mesmo com pouco contato durante a execução do projeto, vinham com palavras de incentivo, carinho e apoio.

As minhas amigas Cláudia Lima e Rafaela Castro, pela amizade de sempre, pelo auxílio quando eu preciso, que só amigas de verdade fariam, e pelas alegrias compartilhadas desde a época do colégio e graduação.

Aos meus tios Ademir, Francisca e Enock que me acolheram em seus lares com carinho e respeito durante os anos do curso.

Ao filho do meu primo, Andrew, pelo afeto e a minha prima Elaine pela simpatia.

Ao meu primo Felipe Pacheco, em especial, que me fez companhia quando estava na casa da tia Francisca, onde conversávamos e dávamos muitas risadas.

Ao Felipe Medrado, aluno da graduação do campus de Imperatriz, por ter me ajudado nas primeiras coletas.

A secretária do mestrado Francisca pelo seu ótimo atendimento e intermédio, dando atenção a todos sem exceção.

Ao motorista do curso de mestrado, o senhor Agnaldo, pela paciência e disponibilidade em me acompanhar nas viagens da pesquisa.

A médica veterinária Valnice Dias Pereira Valença por me auxiliar e acompanhar nas coletas das amostras.

A Dona Socorro pelo carinho comigo, por deixar o ambiente sempre limpinho e por estar sempre com o sorriso estampado no rosto alegrando a todos.

A minha orientadora professora Dra. Francisca Neide pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho, pelos seus ensinamentos, ainda que eu sendo uma orientada formada em outra instituição e de outra cidade, mesmo com todos os percalços de se realizar uma pesquisa em outro município e ainda distante, aceitou me orientar da melhor forma possível, desculpe-me as falhas e eu só tenho a agradecer.

A professora Lenka Lacerda que me proporcionou lecionar a sua disciplina durante a prática em docência.

A professora Lúcia Maria, a qual eu sou muito grata, pelos materiais de estudo fornecidos, pelo esclarecimento de algumas dúvidas quando eu realizava as análises e ela estava presente e pela sua solicitude em ser educadora.

Ao corpo docente do curso de Mestrado em Ciência Animal, principalmente às professoras Alana e Ana Lúcia, as quais são sempre atenciosas.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD) NF 0681/10 pelo financiamento da compra do *kit* para as análises.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA pela estrutura oferecida para a educação continuada.

“A melhor maneira que o homem dispõe para se aperfeiçoar, é aproximar-se de Deus”.

Pitágoras

PACHECO, E. O.; COSTA, F. N. **Detecção de micro-organismos, resíduos de antimicrobianos e células somáticas em amostras de leite cru refrigerado provenientes de laticínios da Microrregião de Imperatriz, MA** [Detection of microorganisms, antimicrobial residues and somatic cell count in samples of refrigerated raw milk from dairies in Microregion of Imperatriz, Maranhão]. 2014. f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2014.

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar a qualidade do leite cru refrigerado de laticínios inspecionados da Microrregião de Imperatriz (municípios de Imperatriz, Senador La Rocque e Porto Franco), pesquisando os indicadores de contaminação de contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS), isolar e identificar os micro-organismos *Staphylococcus* sp. e *Escherichia coli*, detectar resíduos de antimicrobianos e verificar o perfil de suscetibilidade microbiana frente aos antimicrobianos testados. A quantificação e a determinação dos micro-organismos foram realizadas por métodos microbiológicos e bioquímicos. Foi utilizado o método de difusão em discos para a avaliação da suscetibilidade antimicrobiana em 18 cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo, 22 de *Staphylococcus aureus* e 2 de *E. coli*, isoladas das amostras de leite. Foram pesquisados os resíduos de antibióticos por meio de kits comerciais. As contagens de células somáticas dos laticínios apresentaram médias de 394.340 CS/mL, estando de acordo com a legislação vigente. Quanto à qualidade microbiológica, detectou-se CBT com índices acima do permitido, elevada frequência de contaminação por bactérias *Staphylococcus* coagulase positivo em 26 (52%) amostras de leite, sendo 19 (38%) amostras contaminadas por *Staphylococcus aureus*. Os resíduos de antimicrobianos foram detectados em 38 (76%) amostras pelos dois kits utilizados. As cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus aureus* e *E. coli* apresentaram-se multirresistentes, sendo os antimicrobianos de maior eficácia para *E. coli* o cotrimoxazol, ampicilina, enrofloxacina e amoxicilina e para *Staphylococcus* coagulase positivo e *Staphylococcus aureus* foi o princípio norfloxacina. Os dados obtidos indicam que o leite analisado está em condições higiênicossanitárias inadequadas, além da existência de resíduos de antimicrobianos no mesmo e os patógenos isolados apresentam multirresistência representando riscos à saúde pública.

Palavras-chaves: Contaminação, micro-organismos, resíduos, suscetibilidade.

PACHECO, E. O.; COSTA, F. N. **Detection of microorganisms, antimicrobial residues and somatic cell count in samples of refrigerated raw milk from dairies in Microregion of Imperatriz, Maranhao** [Detecção de micro-organismos, resíduos de antimicrobianos e células somáticas em amostras de leite cru refrigerado provenientes de laticínios da Microrregião de Imperatriz, MA]. 2014. f. Dissertation (Master of Animal Science) – Universidade Estadual do Maranhao, Sao Luis, 2014.

ABSTRACT

This study aimed to assess the quality of refrigerated raw milk from dairies inspected the Microregion of Imperatriz (municipalities of Imperatriz, Senator La Roque and Porto Franco), researching the contamination indicator CBT and CCS, microorganisms *Staphylococcus* sp. and *Escherichia coli*, detect antimicrobial residues and examine the profile of microbial sensitivity to the antimicrobials. The quantification and the determination of micro-organisms for microbiological and biochemical methods. The disc diffusion method for the assessment of antimicrobial susceptibility in 18 strains of Coagulase-positive *Staphylococcus*, 22 strains of *Staphylococcus* and *Escherichia coli* isolated from milk samples. Residues of antibiotics through trading kits were surveyed. The somatic cell count of dairy products showed averages of 394.340 CS/mL and it accord with current legislation. On the microbiological quality, the CBT with rates above the permitted, high frequency of contamination by bacteria of Coagulase-positive *Staphylococcus* in 26 (52%) samples of milk, being 19 (38%) samples infected by *Staphylococcus aureus* was detected. The antimicrobial residues in 38 (76%) samples for the two kits used, were detected. Strains of Coagulase-positive *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus* and *E. coli* showed up multiresistant, with the most effective antimicrobials for *E. coli* was cotrimoxazole, ampicillin, amoxicillin and enrofloxacin and norfloxacin was for Coagulase-positive *Staphylococcus* and *Staphylococcus aureus*. The data found indicate that milk analyzed has inadequate hygiene conditions, existence of antimicrobial residues and the isolated pathogens are multidrug resistant indicating risks to public health.

Palavras-chaves: Contamination, microorganisms, residues, susceptibility.

SUMÁRIO

	P.
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
7 CONCLUSÕES.....	51
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXOS.....	71
APÊNDICES.....	74

LISTA DE TABELAS

	p.
Tabela 1. Valores médios das contagens de micro-organismos identificados em amostras de leite cru refrigerado provenientes dos laticínios da Microrregião de Imperatriz - MA, 2013.	37
Tabela 2. Contagem de células somáticas (CS/mL) e respectivas médias de amostras de leite cru refrigerado provenientes dos laticínios da Microrregião de Imperatriz - MA, 2013.	40
Tabela 3. Número e frequência de amostras de leite contaminadas por <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de 50 amostras de leite refrigerado provenientes dos 05 laticínios da microrregião de Imperatriz - MA, 2013.	42
Tabela 4. Número e frequência de amostras de leite contaminadas por resíduos de antimicrobianos em 50 amostras de leite refrigerado provenientes de 05 laticínios da Microrregião de Imperatriz - MA, 2013.	45
Tabela 5. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo, <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> isoladas de amostras de leite cru refrigerado de 05 laticínios da Microrregião de Imperatriz - MA, 2013.	48

LISTA DE FIGURAS

	p.
Figura 1. Localização geográfica da Microrregião de Imperatriz, Maranhão. Fonte: SEBRAE LEGAL, 2009.....	28
Figura 2. Percentual de cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo, <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>E. coli</i> resistentes, intermediárias e sensíveis aos princípios antimicrobianos testados, 2013.....	47
Figura 3. Antimicrobianos os quais as cepas de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo apresentaram percentuais acima de 50% de resistência e sensibilidade, 2013.....	49
Figura 4. Antimicrobianos os quais as cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> apresentaram percentuais acima de 50% de resistência e sensibilidade, 2013.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGED – Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão

APPCC - Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

BHI – *Broth Heart Infusion*

BP - Ágar Baird-Parker

CBT – Contagem Bacteriana Total

CCS – Contagem de Células Somáticas

CS – Células Somáticas

CDC – *Center for control disease*

CLSI - *Clinical Laboratory Standards Institute*

CS/mL – Células Somáticas por mililitro

DDA – Dose Diária Admissível

DTA – Doenças transmitidas por alimentos

EC – Caldo *Escherichia coli*

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMB - Ágar eosina azul de metileno

HCl – Ácido clorídrico

H₂O₂ – Pêroxido de hidrogênio/água oxigenada

IN – Instrução Normativa

KOH – Hidróxido de potássio

LMR (Limite Máximo permitido de Resíduos)

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mcg - Micrograma

mL – Mililitro

MR-VP - Caldo glicose tamponado

NMP/mL – Números mais prováveis por mililitro

PAMVet - Programa de Monitoramento de Resíduos de Medicamentos Veterinários em alimentos

PCA – *Plate Count Agar* ou Ágar padrão para contagem

PNRC - Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. coagulase positivo – *Staphylococcus* coagulase positivo

SIE – Serviço de Inspeção Estadual

SIF - Serviço de Inspeção Federal

TSA – Ágar triptona de soja

TSI - *Triple Sugar Iron*

TSST-1 - Toxina da Síndrome do Choque Tóxico

VB – Caldo verde brilhante

VM - vermelho de metila

VP - Voges-Proskauer

µm - Micrometro

UFC/mL – Unidades formadoras de colônia por mililitro

µg - Micrograma

UHT – *Ultra High Temperature*

U.I - Unidades internacionais

1 INTRODUÇÃO

A microrregião de Imperatriz, onde a pecuária é uma das principais atividades econômicas, possui uma das maiores bacias leiteiras do estado do Maranhão, além da presença de vários laticínios que processam leite e seus derivados, tais como iogurte, doce-de-leite, manteiga e queijo. Há laticínios registrados na região pelo serviço de inspeção estadual e federal e encontram-se nos municípios de Imperatriz, Senador La Rocque e Porto Franco. Dados da Agência de Defesa Agropecuária do Maranhão de (AGED/MA) informam que a microrregião possuía 2.254 propriedades leiteiras com 198.639 bovídeos, sendo 93.568 fêmeas (> 2 anos) no ano de 2013.

A necessidade de melhorar as condições de produção e preservar a qualidade do leite é imprescindível sendo de fundamental importância pesquisas sobre a qualidade do leite nesta região do estado, tendo em vista que são escassos trabalhos científicos para instruir e informar os produtores de bovinos leiteiros, comunidade, bem como, todos os que estão ligados ao setor, ou seja, toda a cadeia produtiva sobre métodos de controle e prevenção de contaminação do produto, sobre boas práticas de produção e manipulação, aspectos sanitários e riscos à saúde pública, podendo o consumidor adquirir resistência antimicrobiana pela ingestão de leite contaminado com resíduos de antibióticos administrados no tratamento de animais enfermos.

A segurança alimentar vem assumindo um papel importante nas últimas décadas, sendo cada vez mais exigida por consumidores e motivo de preocupação para as indústrias. Cabe aos consumidores e setores públicos a exigência por alimentos seguros.

Com o surgimento de doenças como a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE) ou “doença da vaca louca”, Salmonelose, infecções por *Escherichia coli* O157 entre outras doenças veiculadas por alimentos, tornaram os consumidores, principalmente europeus, mais atenciosos e a relevância da segurança dos alimentos foi evidenciada independente do local e renda dos consumidores (SAAB, 1999; VELHO et al., 2009).

A partir da década de 90, os alimentos passaram a ser mundialmente fiscalizados por meio de implantações de programas de monitoramento e rastreabilidade (LIMA, 2006). Com o leite não foi diferente, por ser uma rica fonte alimentar, especialmente para indivíduos com carências e necessidades nutricionais como crianças e idosos, destacando-se entre os alimentos de origem animal.

O leite e produtos lácteos são alimentos suscetíveis de contaminação e podem funcionar como veículos de transmissão de contaminantes. Os riscos do leite ser contaminado são grandes, visto que o mesmo é encaminhado para vários setores, desde a sua obtenção até seu destino final, o consumidor. Devido a este percurso, a cadeia produtiva do leite deve se manter integrada em todos os setores (BIANCHI, 2004).

A qualidade do leite inicia-se desde a produção na glândula mamária do animal e no processo de ordenha. O rebanho leiteiro com mastite, além de causar prejuízos no que se refere à quantidade de leite produzido, também transmite os micro-organismos causadores dessa doença, sendo um dos agentes mais ocorrentes o *Staphylococcus aureus* (SANTOS & FONSECA, 2007).

Enterobactérias incluindo a *Escherichia coli*, a qual é a principal representante do grupo das bactérias de origem fecal, podem estar presentes na água, no solo e em superfícies de objetos. Um local em condições higiênicossanitárias inadequadas, seja de ordenha ou armazenamento do leite, permite a multiplicação destas bactérias tornando o ambiente insalubre (MATTOS et al., 2010).

Exotoxinas produzidas por patógenos, os quais quando se encontram em grandes quantidades nos alimentos, podem resultar em intoxicação alimentar, uma vez que algumas exotoxinas são termoestáveis aos processos térmicos existentes, colocando em risco a saúde dos consumidores (CARMO et al. 2002).

Outro grande problema que afeta à saúde dos consumidores são as substâncias antimicrobianas utilizadas para o combate de agentes infecciosos causadores de mastite entre outras doenças no rebanho, que estão sendo administradas com frequência por produtores, onde os resíduos destas são facilmente excretados no leite (NASCIMENTO et al., 2001). Esses antimicrobianos quando usados em doses e período incorretos promovem o desenvolvimento de resistência bacteriana (COSTA, 1996; JONES, 1999). Sem orientação médica veterinária e sem regulamentação para a comercialização, os antimicrobianos estão sendo utilizados de forma negligenciada, o que é um risco à saúde dos animais e humana (BARBERIO et al., 2002; MOTA et al., 2008)..

2 OBJETIVOS

Diante do exposto, considerando o destaque da produção de leite e a carência de pesquisas que evidenciem a qualidade do leite cru refrigerado na microrregião de Imperatriz, esta pesquisa teve como objetivos:

2.1 Geral

Detectar micro-organismos, resíduos de antimicrobianos e contagem de células somáticas em amostras de leite cru refrigerado provenientes de laticínios da microrregião de Imperatriz, MA.

2.2 Específicos

- Realizar as Contagens de Bactérias Totais (CBT);
- Determinar o Número Mais Provável (NMP) de Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C e efetuar contagens de colônias do gênero *Staphylococcus*;
- Realizar Contagem de Células Somáticas (CCS);
- Pesquisar *Staphylococcus coagulase positivo*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- Aplicar questionário qualitativo sobre procedimentos operacionais e condições higiênicas dos laticínios.
- Detectar a presença de resíduos de antibióticos através dos *Kits Delvotest® SP-NT* e *Eclipse 50 (Cap-Lab®)*;
- Caracterizar o perfil de sensibilidade das cepas de *Staphylococcus coagulase positivo*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* frente aos antimicrobianos mais utilizados para tratamento das enfermidades de rebanhos bovinos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leite e indicadores de contaminação microbiana

O leite é um alimento bastante consumido por ser rico em nutrientes constituído de proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas, cálcio e minerais. Atualmente a qualidade deste produto é bastante discutida no cenário nacional de produção leiteira. Os consumidores estão cada vez mais atentos e exigentes em relação aos seus direitos prezando pela segurança alimentar, devendo os produtores de alimentos e comércio varejista atender a essa demanda (CUNHA & CUNHA, 2007).

É de suma importância assegurar a qualidade do leite produzido, pois sabe-se que o mesmo é indicado ao consumo humano por suprir necessidades protéicas em crianças e 100% das necessidades diárias de cálcio em adultos (FONSECA & SANTOS, 2000).

Produtos lácteos como qualquer outro alimento, é um meio viável para multiplicação de micro-organismos, podendo ser contaminado por estes agentes dentro da glândula mamária, na superfície exterior do úbere e tetos, na superfície de equipamentos, utensílios de ordenha, nas mãos do ordenhador, moscas e tanques (SANTOS & FONSECA, 2001; DANTAS, 2012).

Para que o leite seja considerado de alta qualidade necessita-se que ele possua uma reduzida contaminação microbiana, um baixo número de células somáticas (CCS), ser isento de patógenos e outros contaminantes como resíduos de antibióticos e pesticidas. Estes parâmetros estão cada vez mais exigidos (SANTOS, 2004).

As células somáticas são indicativos de presença de células microbianas na glândula mamária. Segundo Pedersen et al. (2003) quando há invasão da glândula mamária por um agente patogênico, o organismo do animal reage, enviando para o local células de defesa, principalmente leucócitos, para tentar reverter o processo infeccioso. Essas células de defesa somadas às células de descamação do epitélio resultam em células somáticas.

As células de defesa passam por entre duas células secretoras de leite, no interior dos alvéolos, com o intuito de combater os patógenos, perfazendo a destruição destas células, gerando queda na produção de leite (SOMMERHAUSER et al., 2003). Desse modo, a presença de micro-organismos patogênicos na glândula mamária, resultante de

resposta inflamatória instalada, eleva a contagem de células somáticas acima de 300.000 cél./mL de leite (CASSOL, 2010). Outros fatores que podem influenciar a CCS são o estágio de lactação, idade do animal, estação do ano e vários outros tipos de estresses (BEAUDEAU et al., 2002).

O aumento na CCS é a principal indicativo para o diagnóstico da mastite subclínica (RUPP et al., 2000). Para a realização da contagem, podem ser utilizados métodos indiretos, como CMT (Califórnia Mastite Teste) e WMT (Wisconsin Mastitis Test), e de forma direta, como a contagem microscópica (manual) e a contagem eletrônica de células somáticas (SANTOS, 2005). Ao contrário da contagem manual, a contagem eletrônica é rápida e precisa, sendo baseada na contagem de DNA das células, corado por produtos químicos e irradiado por raio laser (RÉVILLION, 2012).

De acordo com a IDF (1981), estabeleceu-se um limite máximo de 500.000 células somáticas (CS/mL) para leite normal, tornando um referencial máximo para países que queiram ingressar no mercado internacional de exportação de leite. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) alterou a legislação sobre a produção de leite por meio da Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011, a qual estabeleceu novos prazos estipulando o limite máximo de CCS de 600.000 células somáticas/mL de leite para as regiões Norte e Nordeste (SANTOS, 2002).

A composição do leite *in natura*, a contaminação nos processos de ordenha, durante a manipulação, beneficiamento, equipamentos, binômio tempo/temperatura de estocagem e o transporte podem elevar os níveis de patógenos existentes (OKURA et al., 2008). A temperatura e o período de tempo de armazenagem do leite estão diretamente ligados à multiplicação de micro-organismos presentes no mesmo ocasionando aumento na contagem bacteriana totais (CBT) (FONSECA, 1998).

Assim como CBT e CCS, micro-organismos patogênicos são indicadores de contaminação do leite. O índice de contaminação microbiana é considerado um dos principais itens para o julgamento da qualidade intrínseca do leite e revela as condições sanitárias de produção e saúde do rebanho. As bactérias presentes no leite podem causar alterações químicas, entre elas degradação de gorduras, de proteínas, ou de carboidratos, liberando enzimas e no caso das patogênicas, há liberação de toxinas (exotoxinas), tornando o produto impróprio para o consumo e industrialização (COUSIN, 1982).

3.2 *Staphylococcus* sp. e *Escherichia coli* no leite e suas implicações

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* e *Escherichia coli*, destacam-se como agentes patogênicos de importância para a saúde pública. A presença de espécies do grupo *Staphylococcus* coagulase positivo denota má qualidade na manipulação do produto e pode levar à intoxicações estafilocócicas àqueles que consumirem o leite contaminado (PARK et al., 1992; WONG & BERGDOLL, 2002).

Um dos principais agentes da mastite bovina é o *Staphylococcus* sp., sendo o *Staphylococcus aureus* mais comumente associado à doença. Este patógeno indica contaminação por meio de contágio, que pode ser humano ou por animais (SANTOS & FONSECA, 2007). Quando ocorre a instalação do *Staphylococcus* sp. dentro da glândula mamária do animal, haverá comprometimento da mesma, resultando em mastite bovina contagiosa (RADOSTITS et al., 2002).

Para verificar as condições higiênicossanitárias dos alimentos, destacam-se também os bioindicadores Coliformes totais (Coliformes a 35°C) e Coliformes termotolerantes (Coliformes a 45°C). Do grupo dos Coliformes termotolerantes o principal representante é a *Escherichia coli* (GARPAROTTO et al., 2008).

Existem linhagens enteropatogênicas e enterotoxigênicas de *Escherichia coli* que podem acometer homens e animais e também é um dos agentes causadores de mastite bovina considerada neste caso de mastite ambiental, pois pode ser transmitida no meio ambiente por excretas de origem fecal presentes no ambiente (RADOSTITS et al., 2002; MATTOS, et al., 2010)

Ambos, o *S. aureus* e a *Escherichia coli* podem estar presentes no ambiente, nas mãos dos manipuladores, fossas nasais e mucosa oral, e a disseminação desses patógenos é possibilitada por falhas nos processos de higienização (CAMPOS et al., 2006).

Segundo Adams e Motarjemi (2002), o *Staphylococcus aureus* encontra-se presente na pele e nasofaringe de 20% a 50% dos humanos, sendo estes considerados portadores dessa bactéria. Neste contexto, os processos de higienização, como lavagem das mãos antes do manuseio do alimento, são necessários para evitar a contaminação.

O gênero *Staphylococcus* apresenta 38 espécies e 24 subespécies, sendo as espécies *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, pertencentes ao grupo dos *Staphylococcus* coagulase positivo, frequentemente associadas a surtos de intoxicação alimentar

(EUZÉBY, 1997; KLOOS & BANNERMAN, 1999). Embora a produção de enterotoxinas estafilocócicas tenha sido relatada não só em espécies de *Staphylococcus* coagulase positivo como também em *Staphylococcus* coagulase negativo, a participação deste em surtos ainda não foi identificada (SANTOS, 2003).

As exotoxinas produzidas por *S. aureus* promovem vários tipos de alergias, doenças auto-imunes e até a Síndrome do Choque Tóxico (BALABAN & RASOOLY, 2000). Estudos recentes caracterizam as exotoxinas que causam o choque tóxico como superantígenos capazes de induzir a hipersensibilidade em indivíduos à exotoxinas (PEREIRA & SIQUEIRA JÚNIOR, 1995). Contagens de 10^5 a 10^6 de *S. aureus* aumenta o risco de causar intoxicação alimentar por enterotoxinas (CARMO et al., 2002).

Casos fatais de intoxicação estafilocócica são raros, porém pode ocorrer em pessoas imunologicamente debilitadas, em crianças de pouca idade e idosos. A sintomatologia varia em diversos casos, sendo em sua maioria alterações como diarreia, vômitos, cefaléias, náuseas e sudorese. O período para o surgimento dos primeiros sinais varia de a 6 horas podendo durar até 2 dias (BALABAN & RASOOLY, 2000).

De acordo com Yi & Lee-Wong (1997) para causar sinais de intoxicação em humanos são necessários de 15 a 357 ng de enterotoxina estafilocócica por kg de peso corporal. Segundo Almeida et al. (1998) a grande preocupação incide sobre a presença de toxinas no leite, pois estas são resistentes à processos de pasteurização. Reibnitz et al., (1998) afirmam que o queijo é um dos produtos alimentícios que mais proporcionam casos de toxinfecção por alimento, devido a manipulação e práticas de higiene impróprias.

As intoxicações causadas pelas toxinas pré-formadas durante a multiplicação bacteriana em sua maioria são veiculadas por alimentos de origem animal por meio de ingestão dos mesmos. Crianças, gestantes, pessoas imunologicamente deficientes e idosos compõem a população de maior risco de ocorrência de toxinfecções alimentares (BREWER, 1991). Problemas gastrointestinais provocados por agentes patogênicos representam 38,6 milhões de casos por ano no mundo, e destes, 13,6 milhões (36%) são devidas às doenças transmitidas por alimentos (DTA) segundo o Centro para Controle e Prevenção de doenças (CDC- *Center for Diseases Control*) (SANTANA et al., 2010).

Nos Estados Unidos 4,5% dos DTA são decorrentes da presença de *Staphylococcus aureus* nos alimentos. Já no Japão em 2000, ocorreu um surto de

intoxicação causada pela presença de enterotoxinas estafilocócicas A e H em leite desnatado reconstituído atingindo 13.420 pessoas (IKEDA et al., 2005).

Quase não se tem informações sobre DTA no Brasil e os dados existentes concentram-se nas regiões sul e sudeste do país (SANTANA et al., 2010). Pereira et al. (1994) afirmam que intoxicações estafilocócicas são comuns no Brasil, mas muitas vezes não há registro dos casos.

Entre os anos de 2001 e 2002, 25 surtos de intoxicação causados por *S. aureus* acometendo 200 pessoas foram registrados em São Paulo (CVE, 2003). Já a Fundação Ezequiel Dias (FUNED) relata que entre 1995 e 2001 foram notificadas intoxicações em 12.820 pessoas, sendo que 17 vieram à óbito após ingestão de alimentos contaminados, entre os quais estavam o leite e derivados como o queijo (CARMO, 2002).

Dentre os derivados do leite causadores de DTAs, os queijos são os que mais se destacam, representando cerca de 33% do total de leite industrializado no país, onde os queijos tipo mussarela e prato têm mais saída (TEIXEIRA & FONSECA, 2008).

Em grande parte do nordeste brasileiro, os derivados de leite mais consumidos são o queijo coalho e a manteiga, principalmente nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco (SEBRAE, 2008). O queijo coalho é tradicionalmente produzido de forma artesanal a partir do leite cru sem tratamento térmico, contrariando a Portaria nº 146 de 07 de março de 1996, que determina a pasteurização do leite na obtenção do queijo (BRASIL, 1996). Na região tocantina do estado do Maranhão, a qual corresponde à microrregião de Imperatriz, há produção tanto de queijos frescos quanto dos tradicionais mussarela e prato (SEBRAE, 2003).

Os alimentos mantidos em temperatura ambiente por muitas horas ou acondicionados em grandes recipientes contribuem para a produção pelo microorganismo de enterotoxinas resistentes ao calor (PEREIRA & PEREIRA, 2005). Esta produção é influenciada pelo pH, temperatura, fonte de carbono e nitrogênio, concentração de sal, condições do substrato, inóculo, entre outros fatores (WONG & BERGDOLL, 2002). Alimentos lácteos, principalmente, se expostos às elevadas temperaturas apresentam maior probabilidade de produção de enterotoxinas (LANCETTE & TATINI, 1992).

Quanto maior o número de *S. aureus* presente no alimento maior a produção de toxinas, o que aumenta as chances de causar intoxicação alimentar, sendo que estas exotoxinas por serem termorresistentes, tornam-se uma preocupação, visto que o

tratamento térmico muitas vezes não funciona. Para inativar a toxina é necessário uma temperatura de 121°C por 3 a 8 minutos (WONG & BERGDOLL, 2002; BAIRD-PARKER, 1990).

Para a World Health Organization (1995) 70% das diarreias em crianças com idade inferior à cinco anos em países desenvolvidos são de origem alimentar.

Em Trinidad e Tobago, 42,9% das cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite de tanques de estocagem produziam uma ou mais tipos de enterotoxinas das cepas dos tanques (ADESYUN et al., 1998). Carvalho et al. (2002) encontrou em 31 amostras de leite *in natura* e de 64 alimentos de surtos de intoxicação alimentar, a toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) em 87,1% das amostras de leite e a enterotoxina estafilocócica B em 65,63% em todas as amostras.

3.3 Problemas gerados pela presença de Resíduos de antimicrobianos em leite

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite representa grandes riscos à saúde do consumidor, principalmente pelo desencadeamento de reações alérgicas em indivíduos sensíveis, pelos efeitos tóxicos, teratogenia, por serem carcinogênicos, pelo desequilíbrio da flora intestinal e desenvolvimento de resistência bacteriana (BRASIL, 1999; FOLLY; MACHADO, 2001; NASCIMENTO et al., 2001). Esses resíduos são fatores de desclassificação, visto que não há inativação destas substâncias por nenhum tratamento tecnológico, tornando o produto inadequado para o setor industrial e para o consumo. (SANTOS, 2003).

A existência de resíduos de antimicrobianos é economicamente inviável para o setor industrial, tendo em vista que os resíduos interferem no cultivo de culturas fermentadoras para a elaboração de queijos e leites fermentados. Tornam o sabor de iogurtes e queijos desagradáveis em virtude do desequilíbrio do fermento lácteo acarretando perdas na produção por proporcionar quantidades menores de produtos finais (BRITO, 2005).

Devido à recomendação do consumo de leite para crianças, gestantes e idosos, estes indivíduos são considerados grupos de risco, levando em consideração a menor resistência e a maior exposição dos mesmos aos resíduos de medicamentos no leite ocasionando um maior risco de reações adversas. Os efeitos que os resíduos de antimicrobianos dependendo da sua concentração, podem provocar em gestante e fetos,

sendo que as tetraciclinas podem alterar o desenvolvimento ósseo do feto e a coloração dos dentes; a eritromicina pode ocasionar hepatite colestática; os aminoglicosídeos são ototóxicos; o metronidazol e o trimetropim possibilita teratogenicidade; as sulfonamidas podem causar hemólise no recém-nascido, o qual pode apresentar desordens no sistema nervoso central; as quinolonas levam à anormalidade na formação das cartilagens e a vancomicina pode causar ototoxicidade (COSTA, 2006).

As reações mais comuns em casos de intoxicação alimentar por resíduos de antimicrobianos são as reações alérgicas como urticária ou erupção cutânea, prurido, sintomas de asma, edema de glote e até choque anafilático podendo ser fatal. Podem surgir também reações de emese, náuseas, diarreias, cefaléias e problemas digestivos como constipação e indigestão (FOLLY & MACHADO, 2001).

Resíduos de antimicrobianos provocam desequilíbrio na microbiota intestinal de humanos e determinam resistência crônica de micro-organismos patogênicos, sendo importante testes de suscetibilidade antimicrobiana (COSTA, 1996; JONES, 1999; SILVA, 2012).

No Brasil, a aplicação de antimicrobianos de maneira inadequada e desordenada, acentua o problema de resistência de micro-organismos, apesar de existir a disponibilidade de diversos antimicrobianos para tratamento de mastite (COETZER & THOMPSON, 1994; MOTA et al., 2005). Aproximadamente 17% a 20% da população de vacas leiteiras já apresentaram mastite alguma vez na vida produtiva, gerando prejuízos na produção de leite em virtude da redução em 10% a 15% do volume de leite produzido, sendo justificado o uso de antimicrobianos pelos produtores a fim de sanar o problema.

Os antimicrobianos não são utilizados apenas para fins terapêuticos, também podem ser usados como aditivos na alimentação animal para melhorar a conversão alimentar e o desempenho produtivo animal. Tais procedimentos são realizados de maneira inadequada conduzindo à persistência de resíduos de medicamentos nos alimentos (NASCIMENTO et al., 2001).

A existência de resíduos de antimicrobianos pode indicar fraude também, onde são adicionados a fim de inibir o crescimento bacteriano para testes de qualidade em laticínios (FONSECA & SANTOS, 2000).

Além do uso indiscriminado de antimicrobianos nos animais, não há o cumprimento do período de carência dos medicamentos. O período de carência é o

tempo de eliminação do medicamento no organismo. Quando não há respeito a esse período, seja pelo fato dos produtores não quererem ter prejuízos com a falta de venda do leite ou pela falta de informação ou de orientação veterinária, onde muitas vezes a compra de medicamentos veterinários faz-se sem prescrição médica veterinária, os resíduos dos antimicrobianos estarão presentes no leite (BARBERIO et al., 2002; MOTA et al., 2008).

A persistência de resíduos depende do antimicrobiano, da dose utilizada e da via de administração e o estado de saúde do animal (COSTA, 2006). Se a dose for aplicada de forma oral, a persistência média de eliminação do medicamento pelo leite será de 86 horas, se a via de administração for intramuscular a persistência varia de 72 a 96 horas, se a administração for por via intravenosa será uma média de 44 horas (COSTA, 1996).

De acordo com Jones (1999), alguns medicamentos permanecem mais tempo do que o estabelecido. Para a penicilina, o tempo estabelecido é de 72 horas, contudo, resíduos persistem por até 18 dias no leite.

Os processos de pasteurização e esterilização do leite tem pouca ou nenhuma influência sobre os resíduos de antimicrobianos, sendo que a penicilina, por exemplo, necessita de 100°C de temperatura por três horas para ser eliminada do leite e o tratamento de ultrapasteurização (UHT), onde utiliza-se temperatura de 121°C a 140°C durante 2 a 4 segundos, não é capaz de inativar tal substância (MEDEIROS, 1999).

Os grupos de antimicrobianos mais utilizados em animais cuja finalidade é a produção de alimentos, são classificados pelo seu modo de ação como: beta-lactâmicos, tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos, quinolonas e sulfonamidas (COSTA, 2006). Os antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos são os mais aplicados para tratamento de mastites e conseqüentemente o mais detectado no leite, destacando-se a penicilina como o antimicrobiano mais frequente do grupo (COSTA, 2006; NERO, 2007).

Os beta-lactâmicos possuem ação bactericida e bacteriostática de amplo espectro, atingindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (FONSECA, 2000). Os antibióticos pertencentes ao grupo são as penicilinas e as cefalosporinas. A portaria nº 56, de 1990, regulamenta a detecção de resíduos de beta-lactâmicos em testes de leite cru (BRITO, 2001).

Há um percentual alto de indivíduos hipersensíveis à penicilina e em virtude de seu constante uso em rebanhos leiteiros torna-se um risco aos consumidores. Estima-se

que cerca de 5% a 10% da população mundial apresentam reações alérgicas à penicilina (JONES, 1999; FONSECA, 2000).

O cloranfenicol já foi bastante utilizado, porém seu uso veterinário está proibido pela Portaria nº 448, de setembro de 1998 do MAPA, pois seus resíduos oferecem risco em potencial pela sua alta toxicidade podendo causar diversos problemas hematológicos, entre eles discrasia sanguínea, supressão reversível da medula e anemia aplástica em indivíduos hipersensíveis (BRASIL, 1998; COSTA, 2006).

A Instrução Normativa nº 62, determina que a concentração de resíduos de antibióticos não deve ser superior ao limite máximo de resíduos (LMR) de cada antimicrobiano (BRASIL, 2011; ANVISA, 2003). O LMR (Limite Máximo permitido de Resíduos) é a concentração máxima de resíduos presentes no alimento. Este limite é baseado na dose diária que não acarreta riscos ao consumidor se for ingerida por toda a vida do indivíduo. Tal dose é chamada de DDA (Dose Diária Admissível) (SILVA, 2012).

O Codex Alimentarius, do latim Código Alimentar, cuja comissão é formada pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é o responsável por estabelecer e reconhecer como aceitáveis no alimento, os LMRs das substâncias veterinárias, os quais são recomendados à países que não possuem padronização própria (BRITO, 2003). No Brasil, o LMR é estabelecido pelo Ministério da Saúde conforme IN 42 de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 1999; BRITO, 2003; CERQUEIRA, 2003).

A portaria nº 46 de 1998 do MAPA obriga as indústrias sob Serviço de Inspeção Federal (SIF) a implantarem o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Neste sistema a identificação de substâncias químicas no leite, como resíduos de medicamentos e agrotóxicos, é fundamental (RIBEIRO FURTINI & ABREU, 2006).

Em 1999, criou-se o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNRC) para o conhecimento e controle do uso indevido de substâncias químicas de uso veterinário e ambiental. Posteriormente em 2002, foi aprovada a Portaria nº 78 de 2002 do MAPA, que estabelece os Programas de Controle de Resíduos em Carne, Leite, Mel e Pescado nos pontos de distribuição dos mesmos (BRASIL, 1999; BRASIL, 2003).

Um ano após a implantação dos Programas de Controle de Resíduos em alimentos de origem animal pelo MAPA, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária criou o Programa de Monitoramento de Resíduos de Medicamentos Veterinários em alimentos (PAMVet) em 2003, em interface com o MAPA, cuja finalidade é de avaliar a qualidade dos produtos de origem animal. O produto de escolha para as avaliações iniciais foi o leite, devido à relevância deste alimento para a nutrição humana (MORAIS, 2003).

O processo de verificação de resíduos de antibióticos no leite torna-se dificultoso de detectá-los em um único teste, tendo em vista a diversidade de antimicrobianos, devendo a detecção dos mesmos ser realizada de forma rápida no leite cru antes dele ser beneficiado (CERQUEIRA, 2003).

Os problemas ocasionados pela existência de resíduos de antibióticos no leite são de caráter multidisciplinar envolvendo organismos de saúde pública, médicos, farmacêuticos, médicos veterinários, setores agropecuários e agroindustriais e comunidade (BIANCHI, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e Amostragem

A pesquisa foi realizada em 05 laticínios inspecionados (3 SIE – Serviço de Inspeção Estadual e 2 SIF- Serviço de Inspeção Federal), identificados como A, B, C, D e E, localizados nos municípios de Imperatriz (A, D e E), Senador La Roque (C) e Porto Franco (B), pertencentes à Microrregião de Imperatriz, no sudoeste do Estado do Maranhão, durante o período de março de 2013 a novembro de 2013 (Figura 1).



Figura 1. Localização geográfica da Microrregião de Imperatriz, Maranhão.

Fonte: SEBRAE LEGAL, 2009.

Os laticínios recebem aproximadamente uma média de 4.000 a 5.000 litros de leite diários, os quais são provenientes de propriedades dos municípios de Imperatriz, Cidelândia, João Lisboa, Senador La Rocque, Buritirana, Ribamar Fiquene, Lajeado Novo, Campestre, Porto Franco, Sítio Novo, São João do Paraíso e Montes Altos.

Foram coletadas 10 amostras de cada laticínio totalizando 50 amostras e realizada de forma periódica em intervalos regulares de 15 em 15 dias. O cálculo do tamanho da amostra baseou-se na norma para plano de amostragem e procedimentos na inspeção ABNT NBR 5429 (ABNT, 1985; PINTO, 2006).

Cada amostra consistiu 250 mL de leite cru refrigerado coletada dos tanques de estocagem, a qual foi colocada em frasco de vidro esterilizado e identificado após homogeneização com coletor de aço inoxidável de acordo com Brito et al. (2007) (Apêndice B). No momento da coleta foi aferida a temperatura de estocagem do leite por meio de termômetro localizado no próprio tanque. Não foram medidas as temperaturas dos caminhões-tanque porque tratavam-se de caminhões isotérmicos, nos quais não há refrigeração do leite, eles só mantêm a temperatura até os mesmos chegarem nos estabelecimentos.

Informações sobre a origem, transporte, armazenamento, tratamento da água utilizada nos processos de higienização, limpeza dos tanques e caminhões-tanque, tipo de ordenha e dados das propriedades distribuidoras, foram obtidas dos registros dos laticínios e da Agência de Defesa Agropecuária Estadual (AGED/MA. Foi aplicado questionário observacional e interrogativo com perguntas aos funcionários conforme diretrizes de BRASIL (1992).

Os estabelecimentos industriais produziam diversos tipos de derivados do leite. O laticínio A (SIE) tinha como produto final o leite pasteurizado; o laticínio B (SIE) produzia queijo; o laticínio C (SIE) destinava o leite para a produção de iogurtes e queijos prato e mussarela; o laticínio D (SIF) fabricava doce-de-leite e o laticínio E (SIF) fornecia leite pasteurizado e manteiga.

4.2 Contagem de Células Somáticas, Contagem Bacteriana Total, Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C

Após a coleta as amostras foram armazenadas em caixa isotérmica com gelo reutilizável em temperatura em torno de 2° a 6°C e encaminhadas em até 24 horas, a partir do horário da ordenha (BRITO et al., 2007), ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da UEMA (Cidade Universitária Paulo VI), São Luís – MA, onde foram realizadas as análises.

A contagem bacteriana total (CBT) foi realizada por meio de contagem padrão em placas de Petri estéreis em Agar padrão para contagem (PCA) (Apêndice C), onde para cada amostra das 50 amostras de leite realizaram-se 3 diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em água peptonada tamponada. Alíquotas de 1 mL das diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) de leite foram colocadas pela técnica de semeadura profunda homogeneizadas em placas e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24-48 horas segundo American Public Health Association (APHA, 2001). Após 24-48 horas de incubação utilizou-se o contador eletrônico para a contagem bacteriana total (LUZ et al., 2011).

Para a determinação do número mais provável (NMP/mL) de Coliformes totais ou a 35°C, foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos em meio de cultura caldo *Lauryl Triptose* e caldo bile verde brilhante 2% (VB) em três tubos para cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) para posteriormente serem incubadas a 35°C por 24 a 48 horas. Tubos positivos para Coliformes a 35°C foram repicados em tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC) e incubados em banho-maria a 45°C durante 24 horas para determinação do NMP/mL de Coliformes a 45°C (APHA, 2001). Os tubos positivos apresentaram turvação e fermentação de lactose observada no interior dos tubos de Durahn (Apêndice C).

Para a realização da Contagem de Células Somáticas das amostras coletadas foi utilizado o contador eletrônico de células somáticas DeLaval Cell Counter® (Apêndice B).

4.3 Isolamento Bacteriano

4.3.1 *Staphylococcus coagulase positivo* e *Staphylococcus aureus*

4.3.1.1 Crescimento bacteriano

Alíquotas de 0,1 mL das diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) das amostras em caldo *Lauryl Triptose*, foram semeadas em Ágar Baird-Parker (BP) e incubadas a 37°C por 48 horas. A identificação das colônias (UFC/mL) foi realizada com base em características morfológicas, cuja coloração é negra e possuem formato circular com halo transparente em volta, e foram contadas no contador eletrônico (Apêndice D). Estriou-se de 2 a 3 colônias típicas em Ágar Triptona de Soja (TSA) inclinado e incubou-se por 24 horas a

35°C para conservação e realização dos demais testes (HOLT, J.G et al., 1994; APHA, 2001; QUINN et al., 2005; LUZ et al., 2011).

4.3.1.2 Coloração de Gram

Culturas retiradas do TSA inclinado foram colocadas em lâminas para a realização do esfregaço e observação das características morfológicas pela técnica de coloração Gram. As bactérias que eram cocos Gram-positivos e arranjadas de forma semelhante a cachos de uva, caracterizavam-se como *Staphylococcus* sp. (APHA, 2001; QUINN et al., 2005).

4.3.1.3 Identificação bioquímica

Após a identificação morfológica, as colônias de *Staphylococcus* sp. foram submetidas aos testes bioquímicos testes de catalase, de coagulase em plasma de coelho-EDTA, testes DNase, Voges-Proskauer e fermentação dos carboidratos maltose e trealose (aerobiose) e manitol (aerobiose e anaerobiose) (Apêndice D) (MAC FADDIN, 1976; HOLT, J.G et al., 1994; APHA, 2001).

- **Teste de catalase:** Neste teste, verteu-se uma gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em lâmina de vidro, e acrescentou-se uma alça com culturas em caldo BHI (*Broth Heart Infusion*) cultivadas após 24 horas de incubação a 37°C. As colônias que reagiram ao contato do H₂O₂ e formaram bolhas/espumas foram positivas ao teste.

- **Teste de coagulase:** Foram realizadas provas de coagulase livre em tubo, onde foram adicionados em tubos estéreis 0,5 mL de plasma de coelho-EDTA (Newprov®) e 0,5 mL do inóculo de BHI. Posteriormente, os tubos foram incubados em banho-maria à temperatura de 35°C a 37°C e observou-se a formação de coágulos após leitura a uma, duas, três, quatro e 24 horas. As amostras positivas demonstraram formação de coágulos em diversos graus classificados como Grau “1+” quando há apresentação de coágulos pequenos e desorganizados; Grau “2+”, com produção de coágulos pequenos organizados; Grau “3+”, representado por coágulos grandes e organizados e Grau “4+” quando há coagulação completa.

- **Teste de DNase:** As cepas coagulase e catalase positivo crescidas em TSA foram repicadas com auxílio de *swab* em Ágar DNase e incubadas a 37°C. Após 24 horas, verificou-se a linha de crescimento e acrescentou-se em cima HCl 1N. Após 3 minutos, as amostras positivas formavam um halo transparente ao redor da linha, devido à liberação de DNase pelo micro-organismo.

- **Prova de Voges-Proukauer:** Tubos com as cepas de estafilococos em 1 mL de caldo MR-VP foram incubados a 37°C por 24 horas. A partir deste período, adicionou-se 0,6 mL de alfa-natol a 5% e 0,2 mL de hidróxido de potássio a 40% nos tubos. O desenvolvimento de coloração vermelha em até 15 minutos indicava reações positivas da prova.

- **Prova dos carboidratos (Manitol, Maltose e Trealose):** As provas de manitol, maltose e trealose foram realizadas para verificar a utilização ou não dos açúcares. Para o teste de manitol em anerobiose foram utilizadas as cepas de estafilococos cultivadas em TSA, onde semeou-se em Ágar-Base Vermelho de Fenol e incubou-se a 37°C durante 24 horas. Para o teste de manitol em aerobiose, as cepas foram inoculadas no meio de cultura caldo Vermelho de Fenol com 1% do referido carboidrato, o qual foi filtrado por membrana de 0,45 µm de poro e adicionado ao meio, em ambiente estéril na câmara de fluxo laminar. Da mesma forma, foram submetidas aos testes de maltose e trealose em aerobiose as cepas inoculadas em caldo Vermelho de Fenol com 1% dos respectivos carboidratos, em tubos separados para cada um. A positividade ao teste foi representada pelo surgimento da cor amarela indicando a mudança de pH do meio.

4.3.2 *Escherichia coli* (*E. coli*)

4.3.2.1 Crescimento bacteriano

A partir de tubos de caldo EC positivos, alíquotas foram estriadas em ágar eosina azul de metileno (EMB) e incubadas a 35°C por 24-48 horas. Após o período de

incubação, 2 a 3 colônias com aparência verde-metálico, características de *E. coli* (Apêndice E), foram semeadas em TSA inclinado e incubadas a 35°C durante 24 horas (ICMSF, 2000; APHA, 2001; QUINN et al., 2005; LUZ et al., 2011).

4.3.2.2 Coloração de Gram

Do crescimento em TSA realizaram-se esfregaços para a coloração de Gram. As bactérias sugestivas de *Escherichia coli* apresentaram-se Gram-negativas e com formato de bastonetes (APHA, 2001; QUINN et al., 2005).

4.3.2.3 Identificação bioquímica

Foram realizados os testes bioquímicos *Triple Sugar Iron* (TSI), Citrato de Simmons, INDOL (meio SIM), Voges-Proskauer (VP) e Vermelho de Metila (VM) para a confirmação da espécie (Apêndice E) (ICMSF, 2000; APHA, 2001; QUINN et al., 2005).

- **Teste TSI:** Repicou-se o inóculo com agulha estéril culturas a partir do TSA, perfurando o Ágar e retirando realizando estrias na superfície inclinada do meio. O aparecimento da cor amarela significava teste positivo. Este teste funciona como teste de triagem para a execução dos outros, por ser um teste bastante sensível.

- **Teste do INDOL:** Inoculou-se cultivos do TSA em tubos contendo o meio SIM (Sulfeto Indol Motilidade), introduzindo-as através de agulha estéril dentro do meio em forma de linha sem tocar o fundo dos tubos e estes foram incubadas a 37°C por 24 horas. Decorrido o período de incubação, verificou-se o crescimento difuso do micro-organismo a partir da linha de inoculação e acrescentou-se 0,2 mL de reagente Kovacs. A prova era considerada positiva quando formava um anel vermelho.

- **Prova de Voges-Proskauer:** Foi realizado o mesmo procedimento utilizado para *Staphylococcus aureus*. Diferindo apenas no período de incubação e de reação, que para *E. coli* foi esperado 48 horas e após a adição dos reagentes de até 2 horas

respectivamente. A reação era considerada positiva quando o meio evidenciava coloração vermelha ou rósea.

- **Teste Vermelho de Metila:** Inoculou-se as culturas em tubos contendo caldo MR-VP por 48 horas de incubação a 35°C. Decorrido esse prazo, acrescentou-se 4 gotas de vermelho de metila. A mudança de coloração para o vermelho indica positividade ao teste.

- **Teste do Citrato:** Semeou-se cultura de *E. coli* em tubos contendo Ágar Citrato de Simmons, perfurando com agulha estéril sem tocar o fundo, estriando a superfície do Ágar, em seguida, os tubos foram incubados a 37°C durante 48-96 horas. A permanência da cor verde indicou positividade do teste para *E. coli* e a alteração para a cor azul representou que o teste foi negativo para este micro-organismo.

4.4 Detecção de resíduos antibióticos

A detecção de resíduos de antimicrobianos foi realizada utilizando-se *kit* comercial Delvotest[®] SP-NT, conforme as recomendações do fabricante. Este método utiliza ampolas de meio de cultura contendo o *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Com o auxílio de micropipetas descartáveis, foi adicionado 0,1mL de cada amostra de leite nos receptáculos do *kit* contendo o microrganismo e indicador de pH, onde foram mantidos em temperatura de 64°C±0,5, durante 3 horas, em banho-maria. A alteração na coloração do Ágar, indicando se havia ou não a presença de resíduos (RIBEIRO et al, 2009). Posteriormente utilizou-se o *kit* Eclipse 50 (CAP-Lab[®]), que também é baseado na inibição do crescimento bacteriano e contém meio de cultivo com esporos de *Geobacillus stearothermophilus* em recipientes que foram incubados a temperatura de 65°C para verificar se houve inibição ou crescimento bacteriano e conseqüente modificação da cor do meio de acordo com a preconização do fabricante (Apêndice F). Por se tratarem de testes qualitativos e sensíveis, não especificam exatamente qual ou quais os antibióticos cujos resíduos estão presentes, somente informam a existência ou não de resíduos de determinados princípios pertencentes a grupos de antimicrobianos. Os dois *kits* detectam resíduos de

antimicrobianos do grupo β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolidas, sulfonamidas e tetraciclina (Anexo 1 e 2).

4.5 Suscetibilidade antimicrobiana

Testou-se 42 cepas, sendo 18 de *Staphylococcus coagulase*, 22 de *Staphylococcus aureus* positivo e 2 de *Escherichia coli* frente aos antimicrobianos mais utilizados para tratamento de mastites, tais como: gentamicina (10 μ g), penicilina (10 U.I.), ampicilina (10 μ g), vancomicina (30 μ g), oxacilina (1 μ g), estreptomicina (10 μ g), eritromicina (15 μ g), tetraciclina (30 μ g), amoxicilina (10 μ g), lincomicina (2 μ g), norfloxacin (10 μ g), enrofloxacin (5 μ g), bacitracina (10 U.I.) e cotrimoxazol (sulfametoxazol (23,75 mcg) + trimetropima (1,25 mcg)), utilizando-se Ágar Müeller Hinton, sendo as placas incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Os testes foram realizados pelo método de difusão em discos, segundo recomendações do CLSI (2003) (Apêndice G).

4.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva, calculando-se a amplitude de variação, médias, frequências absoluta e relativa para os diferentes parâmetros avaliados (SAMPAIO, 1998).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas elevadas contagens de micro-organismos nas amostras coletadas, onde a CBT apresentava-se valores acima do permitido pela Instrução Normativa 62/ 2011 do MAPA que institui índices de no máximo $6,0 \times 10^5$ UFC/mL para CBT em leite cru refrigerado (Tabela 1) (BRASIL, 2011). Semelhante ao presente estudo, Beloti et al. (2011) verificaram que 37,42% de 61 amostras de leite cru refrigerado em Sapopema - PR, também apresentaram CBT maiores que o recomendado.

Houve contaminação por Coliformes em todas as amostras, onde a contagem média de Coliformes a 35°C e a 45°C foi acima de 10^3 NMP/mL em todos os laticínios (Tabela 1). Embora não exista legislação que estabeleça quantidades de Coliformes para leite cru, números maiores que 10^3 NMP/mL configuram falta de higienização na obtenção do leite durante a produção. De acordo com Freitas et al. (2013) e Carvalho et al. (1995), elevadas contagens de coliformes no leite cru são observadas em todo o país, sendo prejudicial, visto que, o aumento da microbiota compromete o processo tecnológico do produto .

A quantificação de *Staphylococcus* sp. foi $>10^5$ UFC/mL em 37 (95%) amostras, sendo que as médias das amostras em todos os laticínios foram a partir de $4,46 \times 10^5$ (Tabela 1). Freitas et al. (2013) evidenciaram em amostras de leite cru contagens de *Staphylococcus* sp de $2,3 \times 10^2$ a $1,2 \times 10^6$ UFC/mL no estado da Paraíba. Em amostras de leite recolhidas em plataforma de recepção de um estabelecimento em Juiz de Fora, MG, analisadas por Borges et al. (2008) encontraram em 25 (78,8%) amostras *S. aureus* com contagens elevadas entre $2,7 \times 10^5$ e $1,2 \times 10^7$ UFC/mL.

Conforme exposto na Tabela 1, as altas contagens de Coliformes a 45°C e de *Staphylococcus* sp em conjunto, também podem ter influenciado para que a CBT se tornasse alta, por exemplo, no laticínio C observou-se CBT acima de 10^6 juntamente com altos índices de Coliformes a 45° C e *Staphylococcus* sp.. Entretanto, este fato não ocorreu no laticínio E, pois embora tenha apresentado elevados níveis de Coliformes a 45° C, os níveis de *Staphylococcus* sp. não estavam altos o suficiente para elevar a CBT.

Tabela 1. Valores médios das contagens de micro-organismos identificados em amostras de leite cru refrigerado provenientes dos laticínios da Microrregião de Imperatriz - MA, 2013.

Laticínios	CBT¹ (UFC/ml)*	Coliformes a 35°C (NMP/ml)**	Coliformes a 45°C (NMP/ml)**	<i>Staphylococcus</i> sp. (UFC/ml)*
A (SIE)	8,76 x 10 ⁵	2,40 x 10 ³	1,92 x 10 ³	6,27 x 10 ⁵
B (SIE)	6,23 x 10 ⁵	2,40 x 10 ³	1,08 x 10 ³	6,17 x 10 ⁵
C (SIE)	> 1 x 10 ⁶	2,40 x 10 ³	2,40 x 10 ⁵	7,24 x 10 ⁵
D (SIF)	7,08 x 10 ⁵	2,40 x 10 ³	9,87 x 10 ²	7,83 x 10 ⁵
E (SIF)	4,16 x 10 ⁵	2,40 x 10 ³	2,40 x 10 ⁵	4,46 x 10 ⁵

*UFC/mL= Unidades formadoras de colônia por mL.

**NMP/mL= Número mais provável por mL.

¹CBT = contagem bacteriana total

Em relação à média da Contagem Bacteriana Total referente a cada laticínio, observou-se no laticínio C a maior média (> 1 x 10⁶ UFC/mL), e no estabelecimento A, cuja média foi 8,76 x 10⁵ UFC/mL (Tabela 1), o que sugere que o tempo e temperatura inadequada são fatores que podem ter contribuído para a elevação da CBT das amostras, pois os referidos laticínios recolhem o leite de fazendas distantes e de difícil acesso, onde são transportados em camionetes com carrocerias abertas. Desta forma, contribui para um maior tempo e temperatura, influenciando na CBT. Outros fatores que podem ser atribuídos são as falhas nas ações de boas práticas de produção, onde foi observado nestes dois laticínios material inapropriado para a lavagem dos latões, os quais eram lavados com panos umedecidos com água e detergente, em vez de escovas de material sintético. O laticínio A encontrava-se em condições estruturais e de higiene inadequadas.

Os estabelecimentos B e D também apresentaram altos números de CBT (Tabela 1). Estes valores podem ser atribuído às falhas na higiene dos tanques dos postos ou dos próprios estabelecimentos e até mesmo dos caminhões. A limpeza dos tanques isotérmicos dos caminhões era realizada logo após a retirada do leite ou no final do dia e às vezes no dia seguinte, quando o caminhão iria recolher o leite, sendo que a limpeza no final do dia ou no outro dia não é recomendada. Segundo Silva et al. (2009), este tipo

de procedimento pode promover a produção de biofilmes pelas bactérias, os quais elevam a CBT. Pinto et al. (2006) demonstraram que o leite estocado na indústria possuíam CBT mais alta do que o leite de tanques de expansão das propriedades. No laticínio B, o leite ficava estocado por mais tempo, cerca de 24 a 48 horas, até a expedição para outras indústrias, pois funcionava também como posto de recebimento.

Segundo informações de funcionários dos laticínios e de técnicos de órgãos de fiscalização, os laticínios que recebem leite através de caminhões-tanque (B, D e E) recolhem os leites armazenados em tanques de postos de refrigeração situados entre as propriedades e as indústrias, e os mesmos são colocados nestes tanques de refrigeração após a ordenha, sendo transportados a granel. Este procedimento justifica-se pelo fato das propriedades se localizarem distantes dos laticínios. No entanto, devido ao transporte ser a granel e ao fato das fazendas leiteiras da região adotarem o sistema de exploração pecuária extensivo e o rebanho ser mestiço e nelore, onde a produção de leite é baixa, induz a um tempo de espera maior do leite pelas indústrias, o qual permanece mais tempo nos postos de refrigeração. Consoante isso, embora os laticínios B, D e E se encontrassem em boas condições de higiene e instalações, o tempo de armazenamento do leite pode ter favorecido para o aumento dos índices dos microorganismos.

Para Silva et al. (2009), a elevada CBT observada em seu estudo, deveu-se à falta de higiene de equipamentos e utensílios, ao transporte, à temperatura e ao tempo de estocagem, que foram respectivamente, cerca de 10°C e 48 horas, tendo em vista que houve aumento da CBT em 61,54% das amostras de leite colhidas na plataforma de recebimento do laticínio em comparação das que estavam nos tanques de expansão nas propriedades. Afirmam ainda que, para reduzir a CBT do leite cru refrigerado deve-se monitorar a temperatura em que o leite encontra-se, realizar a correta higiene dos diversos tanques, dos utensílios e dos equipamentos, ou seja, tudo que possa entrar em contato com o leite, objetivando impedir contaminação cruzada.

Quanto à temperatura dos tanques, todos os laticínios apresentaram temperatura de 4°C, estando de acordo com a temperatura exigida pela IN 62 que preconiza até 10°C no estabelecimento processador. Todavia, a temperatura de conservação nos tanques de expansão das propriedades ou nos postos de refrigeração também deve obedecer a legislação nacional, que para estes casos é imposta uma temperatura de 7°C.

Não foram observados nos laticínios estudados análises físico-químicas do leite antes do beneficiamento, exceto no laticínio A que realizava o teste do Alizarol. No momento da recepção do leite havia dois a três funcionários em todos os estabelecimentos. Esta observações denotam deficiência no monitoramento do produto.

No que se refere às Contagens de Células Somáticas (Tabela 2), as médias dos laticínios foram de 394.340 CS/mL de leite, sendo que os laticínios B e C obtiveram as maiores médias, 437.300 CS/mL e 531.600 CS/mL, respectivamente, e a menor média foi registrada no laticínio E com 259.800 CS/mL. Os laticínios A apresentou média de 382.300 CS/mL e o laticínio D de 360.700 CS/mL. Estas contagens estão dentro dos padrões exigidos pela legislação atual, estabelecida pela Instrução Normativa 62 de 2011 do MAPA que determina limites de no máximo 600.000 CS/mL até o ano de 2015 para a região Norte e Nordeste (BRASIL, 2011).

Martins *et al.* (2006) observaram CCS de leite da bacia de Pelotas, Rio Grande do Sul, com médias de 332.000 CS/mL no período chuvoso e 334.000 CS/mL no período seco, resultado um pouco inferior aos valores obtidos no presente no presente trabalho.

Observaram-se variações nas contagens de CS no decorrer das coletas, sendo que os laticínios A, B e C demonstraram maiores variações, onde no laticínio C as CCS as contagens variaram de 285.000 a 1.237.000 CS/mL (Tabela 2), indicando uma amplitude de variação de 952.000 células somáticas/mL. No laticínio D as CCS mantiveram-se mais constantes variando de 297 mil a 423 mil CS/mL e o estabelecimento que apresentou menores CCS foi o laticínio E, variando de 181 mil CS/mL a 349 mil CS/mL, conforme exposto na Tabela 2.

Tabela 2. Contagem de células somáticas (CS/mL) e respectivas médias de amostras de leite cru refrigerado provenientes dos laticínios da Microrregião de Imperatriz - MA, 2013.

Amostras	Laticínio A (SIE)	Laticínio B (SIE)	Laticínio C (SIE)	Laticínio D (SIF)	Laticínio E (SIF)	Média Total
01	407.000	377.000	346.000	367.000	192.000	337.800
02	358.000	448.000	285.000	297.000	215.000	320.600
03	484.000	369.000	342.000	362.000	211.000	353.600
04	596.000	721.000	350.000	344.000	181.000	438.400
05	564.000	409.000	481.000	423.000	240.000	423.400
06	229.000	391.000	706.000	327.000	238.000	378.200
07	194.000	357.000	492.000	407.000	336.000	357.200
08	196.000	458.000	476.000	403.000	323.000	371.200
09	487.000	408.000	601.000	349.000	313.000	431.600
10	308.300	435.300	1.237.000	328.000	349.000	531.400
Médias	382.300	437.300	531.600	360.700	259.800	394.340

Em conformidade com os índices estabelecidos pela IN 62 de 2011, 46 (92%) amostras encontravam-se no padrão e 4 (8%) amostras estavam em desacordo, e destas, uma amostra pertencia ao laticínio B e três eram do laticínio C.

As propriedades distribuidoras de leite em sua maioria realizavam ordenha do tipo manual, o que pode ter interferido para números mais baixos de CCS das amostras. Também Cassiano et al. (2007) foram observados maiores índices de CCS em ordenha mecânica do tipo balde ao pé em comparação com o sistema manual, em virtude da falta de manutenção e calibragem do equipamento causando lesão aos tetos dos animais pelas teteiras, resultando em ocorrência de mastite. Entretanto, quando o equipamento de ordenha mecânica encontra-se bem calibrado os níveis de CCS são mantidos baixos (TAVERNA, 2004).

Vale ressaltar que a elevada CCS denota más condições sanitárias do rebanho e altos valores de CBT representam condições higiênicas insatisfatórias do leite. Segundo Bramley e Mckimon (1990), números de CBT maior que 100.000 UFC/mL implicam em fortes falhas nas práticas de higiene durante a produção do leite, enquanto valores abaixo de 20.000 UFC/mL indicam bons procedimentos de higiene na produção.

Bozo et al. (2013) relataram que após a aplicação de boas práticas em cinco propriedades no estado do Paraná, houve redução da CCS em 74,3% das amostras de leite e da CBT em 94,3% das amostras. Para Valin et al. (2005) e Matsubara et al. (2011). Shaik et al. (2005) a CBT e a CCS são indicadores que não estão

necessariamente relacionados, tendo em vista a existência de diversas influências sobre as mesmas.

Neto et al. (2012) ao pesquisar índices de CCS e CBT em amostras de leite cru refrigerado de laticínios sob serviço de inspeção federal (SIF) em vários estados do Nordeste, encontraram CBT acima de 1×10^6 UFC/mL em todos os estados da região, exceto Pernambuco que apresentou $9,97 \times 10^5$ UFC/mL e Bahia $9,90 \times 10^5$ UFC/mL. Estes resultados refletem más práticas de ordenha e/ou problemas na refrigeração do leite até a chegada do mesmo nos laticínios. Em relação às CCS, observaram-se maiores resultados no estado do Piauí variando de 837.680 a 929.010 CS/mL e menores foram no estado do Maranhão, onde os índices foram de 472.240 a 769.770 CS/mL, sendo similares ao encontrados em algumas amostras do presente estudo. Paula et al. (2004) afirmaram que fatores como o ano, o período da análise e características da microrregião estudada interferem nos valores de células somáticas.

No trabalho de Melo et al. (2013), no estado de Goiás, foi evidenciado, valores de CCS de leite cru colhido em propriedades, de 369 mil CS/mL, e de leite cru oriundo de estabelecimentos, de 525 mil CS/mL, onde os mesmos estão de acordo com o preconizado pela legislação vigente. No entanto, a CBT das amostras avaliadas estava acima do recomendado pela IN 62/2011 que é 600.000 UFC/mL. Conforme Melo et al. (2013) a elevada CBT avaliada foi decorrente principalmente da falta de refrigeração do leite logo após a ordenha. A ocorrência de CCS dentro dos padrões e CBT alta corroboram com os resultados obtidos na presente pesquisa.

Dados encontrados por Silva et al. (2009) indicaram CCS de leite cru refrigerado de um laticínio sob (SIF) do sudoeste de Goiás, dentro dos limites determinados pela legislação e valores de CBT acima dos padrões permitidos. Estes resultados foram semelhantes aos do presente estudo. Entretanto, mesmo os níveis de CCS estando de acordo com os índices exigidos, limites entre 300.000 e 500.000 CS/mL podem representar infecção no animal, dependendo do patógeno instalado, o qual pode influenciar a quantidade de células somáticas produzidas. Isto pode justificar o número de células somáticas encontradas nas amostras deste estudo, que não se apresentaram tão elevadas e nem tão baixas a ponto de descartar prováveis infecções no rebanho.

O *Staphylococcus aureus* geralmente provoca uma quantidade de CCS variando de 400.000 a 600.000 CS/mL, e em associação com outros micro-organismos como *Streptococcus* sp., os níveis podem chegar a mais de 1.000.000 CS/mL. Já a presença de

Corynebacterium bovis promove menores números de CCS, inferiores a 200.000 CS/mL (CASURA et al., 1995; CASSOL et al., 2010). Além disso, os valores de CCS inferiores aos números de CBT e estafilococos pode ser elucidado pela multiplicação bacteriana, o que não ocorre com as células somáticas.

Na pesquisa de patógenos, 50 amostras analisadas, 26 (52%) amostras continham cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo, e destas 26, 19 (38%) amostras foram bioquimicamente identificados como *Staphylococcus aureus*, representando 73% das amostras contaminadas por *Staphylococcus* coagulase positivo (Tabela 3).

Tabela 3. Número e frequência de amostras de leite contaminadas por *Staphylococcus* coagulase positivo e *Staphylococcus aureus* isoladas de 50 amostras de leite refrigerado provenientes dos 05 laticínios da microrregião de Imperatriz - MA, 2013.

Laticínios	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo		<i>Staphylococcus</i> <i>Aureus</i>	
	N	%	N	%
Laticínio A (SIE)	05/10	10	04/10	08
Laticínio B (SIE)	07/10	14	06/10	12
Laticínio C (SIE)	06/10	12	05/10	10
Laticínio D (SIF)	04/10	08	03/10	06
Laticínio E (SIF)	04/10	08	01/10	02
Total	26/50	52	19/50	38

Do total de 50 amostras de leite analisadas quanto à pesquisa de *E. coli*, apenas dois (4%) das amostras estavam contaminadas por este patógeno, um (2%) proveniente do laticínio B e um (2%) do laticínio C, ambos sob o serviço de inspeção estadual (SIE).

Fontana et al. (2010) analisando o leite de propriedades em Jataí – GO, identificaram *Staphylococcus* spp. em 40,9% das amostras, das quais 14,9% foram confirmadas como *Staphylococcus*, também foram identificados *Corynebacterium* sp. (35,6%), *Streptococcus* sp. (19,7%) e *Escherichia coli* (3,8%). Houve uma maior frequência de *Staphylococcus* spp. em relação aos demais gêneros isolados. Também Adornes et al. (1995) e Brito et al. (2001) indicam a prevalência cosmopolita de *S. aureus* em rebanhos bovinos e em outras espécies.

Drescher et al. (2010) em Santa Catarina, analisando o leite de ovelhas identificaram *Staphylococcus* spp. em 31,39% e *Escherichia coli* em 8,2%.

Diferente dos resultados deste estudo, Campos et al. (2006) encontraram contaminação por *E. coli* em 19 (79,2%) de 24 amostras de leite cru provenientes de laticínio no estado de Goiás enquanto Chye et al.(2004) observaram na Malásia que 65% das amostras de leite continham *E. coli*. Já Campos et al. (2006) isolaram *E. coli* em amostras de nasofaringe (6,5%) e das mãos (17,4%) em 46 amostras de cada região do corpo, estando de acordo com Nataro e Kaper (1998), que afirmam que apesar da *E. coli* estar presente na microbiota gastrintestinal humana, há possibilidade de contaminação em outras partes do corpo, como o nariz ou mãos, tornando o manipulador o principal veículo de transmissão. Conforme Arcuri et al. (2006), além da presença de patógenos no leite cru que é um perigo tanto para quem consome quanto para quem o manipula, o leite *in natura* contaminado pode estar presente no ambiente possibilitando à contaminação cruzada.

De acordo com Silva et al. (1999) durante o processo de produção do leite, aumentam-se os riscos de introdução de micro-organismos patogênicos no produto, devido ao contato com pessoas de vários setores, possuir formas de armazenamento diferentes até chegar à mesa do consumidor

Nesta pesquisa, a presença de *E. coli* foi inferior à de *Staphylococcus aureus*. que encontrava-se mais elevada, sugerindo contaminação por contato decorrente de humanos ou animais. Por outro lado, os funcionários dos cinco laticínios trabalhavam uniformizados com botas, avental e touca, entretanto não foi observado o uso de luvas e máscaras, favorecendo o maior contato dos humanos com o produto e ampliando a população de estafilococos. No entanto, segundo Shopsis et al., (2000) a predominância de bactérias do gênero *Staphylococcus*, especialmente *Staphylococcus aureus*, em amostras de leite pode ser devido à mecanismos de competição fazendo com que estes micro-organismos impeçam a instalação ou desenvolvimento de outro.

Okura et al. (2005) isolaram de *E. coli* em 21,6% das amostras de leite, o que revela uma maior frequência desta bactéria à obtida no presente estudo. A existência de *E. coli* também foi evidenciada no trabalho de Moraes et al. (2005), em uma de três coletas de leite de oito propriedades leiteiras do Rio Grande do Sul.

Resultados superiores foram encontrados por Passos et al. (2000) em Londrina e Arapongas - PR, onde em 60% das amostras de queijo Minas frescal estavam

contaminadas por *E. coli* e em 93,3% por *Staphylococcus aureus* sugerindo contaminação cruzada dos produtos avaliados. Em Araguaína – TO, Paneto et al. (2005) detectaram a presença de *E. coli* em 96% de 50 amostras de queijo Minas frescal comercializadas em supermercados.

Adretta et al. (2013) observaram uma contagem maior de bactérias mesófilos aeróbios e *Staphylococcus* coagulase positivo em baldes e teteiras de propriedades com ordenha mecânica do tipo balde ao pé comparando ao sistema de ordenha manual e mecânico de circuito fechado, propondo que a deficiência de higiene em utensílios e equipamentos somados ao manejo inadequado aumentam o risco de contaminação.

Ao pesquisar micro-organismos patogênicos em leite de propriedades com sistema orgânico em São Paulo, Ribeiro et al. (2009) isolaram *S. aureus* com frequência em 25,7% das amostras, *Streptococcus* spp. em 21,4% e *Corynebacterium bovis* em 12,9% e não foram detectadas *E. coli* nas amostras. Andrade et al. (2009) em Curitiba – PR, verificaram a presença de *Staphylococcus* spp. em uma frequência de 32,7%, *Staphylococcus aureus* em 19,5%, *Streptococcus Agalactiae* em 14% e *Escherichia coli* em 13,6% das amostras de leite em propriedades, refletindo maior frequência de micro-organismos do gênero *Staphylococcus*.

A frequência maior de patógenos nos laticínios A, B e C, sugere deficiências higiênicas na obtenção e manipulação do leite, pois as fazendas situam-se mais distantes de grandes centros como o município de Imperatriz. Além da distância de cerca de 100 km, as regiões são carentes de informações e assistência veterinária.

Foi detectada a presença de resíduos de antimicrobianos em 38 (76%) amostras do total de amostras de leite cru refrigerado submetidas aos kits Devoltest® SP-NT e Eclipse 50 (CAP-Lab®). Os dois Kits utilizados nesta pesquisa detectaram igualmente a presença de resíduos de antimicrobianos nas amostras de cada laticínio conforme demonstra a Tabela 4.

Tabela 4. Número e frequência de amostras de leite contaminadas por resíduos de antimicrobianos em 50 amostras de leite refrigerado provenientes de 05 laticínios da Microrregião de Imperatriz - MA, 2013.

Laticínios	Kit Devotest®		Kit Eclipse 50	
	N ¹ /T ¹	%	N ¹ /T ¹	%
Laticínio A (SIE)	6/10	15,80	6/10	15,80
Laticínio B (SIE)	2/10	5,27	2/10	5,27
Laticínio C (SIE)	10/10	26,31	10/10	26,31
Laticínio D (SIF)	10/10	26,31	10/10	26,31
Laticínio E (SIF)	10/10	26,31	10/10	26,31
Total	38/50	100	38/50	100

¹N= n° de amostras contaminadas pela presença de resíduos de antimicrobianos.

¹T= n° total de amostras coletadas em cada laticínio.

O presente estudo demonstrou diferenças significativas em relação às outras pesquisas no estado do Maranhão. Lacerda (2008) não encontrou a presença de resíduos de antibióticos pelo teste Delvotest® SP, ao analisar 20 amostras provenientes de propriedades leiteiras dos municípios Itapecurum-Mirim, Miranda do Norte e Santa Rita, todos localizados no norte do estado. Também Carvalho et al. (2012) em pesquisa sobre resíduos de antimicrobianos em amostras de leite cru de 18 propriedades situadas no município de Araisos – MA, também obtiveram reações negativas ao teste de detecção Delvotest® SP. Comparando os resultados entre as regiões, pode-se sugerir que a administração indiscriminada de antibióticos para tratamento e combate de infecções podem ter inferido nos resultados, visto que a microrregião de Imperatriz e Açailândia são consideradas a bacia leiteira do estado, as quais possuem mais 190.000 bovídeos de leite segundo a Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED/MA), acarretando maiores incidências de doenças em virtude da aglomeração de animais, e por conseguinte o uso de medicamentos em maior frequência.

Ribeiro et al. (2009) também relacionaram o uso incorreto de medicamentos nos animais ao verificar em amostras de leite coletadas diretamente de animais em lactação criados em sistema orgânico de São Paulo, onde obtiveram a presença de resíduos em 2,7% dos animais amostrados, estando em desacordo com a Instruções Normativas n° 07 e n° 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que proíbem a existência de quaisquer resíduos de medicamentos no leite (BRASIL, 1999).

Nero et al. (2007) encontraram 11,4% de amostras de leite cru positivas aos testes de detecção de antibióticos, pertencentes às propriedades leiteiras do Paraná, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo. Já relatos de várias regiões do Brasil evidenciaram de 0 a 70% a presença de resíduos de antimicrobianos em leite cru (COSTA, 1996; CARLOS et al., 2004; FARIAS et al., 2004).

Costa e Lobato (2009) em Seropédia – RJ, identificaram 02 (duas) de 175 amostras de leite UHT contendo resíduos de antimicrobianos, representando 1,1% do total, onde as duas eram de leite integral, refletindo que pode haver uma veiculação maior de antibióticos em meios com maior teor de lipídios. Informações do relatório do PAMVet 2004 e 2005, apontaram em 312 amostras de diversos tipos de leite (em pó, pasteurizado, UHT), 21 amostras (7%) continham resíduos de antibióticos, e destas, 6 (2%) eram de UHT. Esses resultados são preocupantes, tendo em vista a resistência dos antimicrobianos aos processos térmicos tecnológicos e o consumo do leite como parte da dieta humana, principalmente crianças.

Os resultados foram superiores aos detectados por Tetzner e Benedetti (2005), que encontraram resíduos de antibióticos em leite cru da região do Triângulo Mineiro em uma frequência de 33,3% das amostras para antibióticos β -lactâmicos, tais como penicilina, amoxicilina, ampicilina e ceftiofur. Também foram superiores aos de Carlos et al. (2004) que avaliaram a presença de resíduos de penicilina em 43 amostras de leite no Rio de Janeiro, e encontraram resíduos em 32,56% amostras por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Já Nascimento et al. (2001) observaram a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em 50% das amostras de leite tipo A e leite pasteurizado comercializado em Piracicaba - SP. Os resultados foram inferiores aos diagnosticados por Bianchi et al. (2004), que detectaram resíduos em 100% e 80% das amostras de leite cru e de leite pasteurizado, respectivamente, na região do Vale do Paraíba – SP.

O leite destinado às indústrias e usinas de beneficiamento possui mais um agravante em relação à presença de resíduos, de medicamentos, trata-se da incorporação de leite contaminado nos tanques de refrigeração ou estocagem, ocasionando a contaminação geral do leite armazenado. Segundo Fava e Pinto (2010) a condenação do leite contaminado por resíduos de antimicrobianos é realizada quando há a detecção dos mesmos, entretanto este monitoramento muitas vezes não é realizado de maneira efetiva colocando em risco a saúde dos consumidores.

Quanto à suscetibilidade antimicrobiana, foram observadas multirresistência nas 18 cepas testadas de *Staphylococcus* coagulase positivo, 22 cepas de *Staphylococcus aureus* e 2 de *Escherichia coli*, onde nenhum antibiótico foi 100% eficaz para *Staphylococcus* coagulase positivo e *Staphylococcus aureus*. As cepas de *S. coagulase* positivo foram as que obtiveram maior sensibilidade (60,32%) aos antimicrobianos testados (Figura 2).

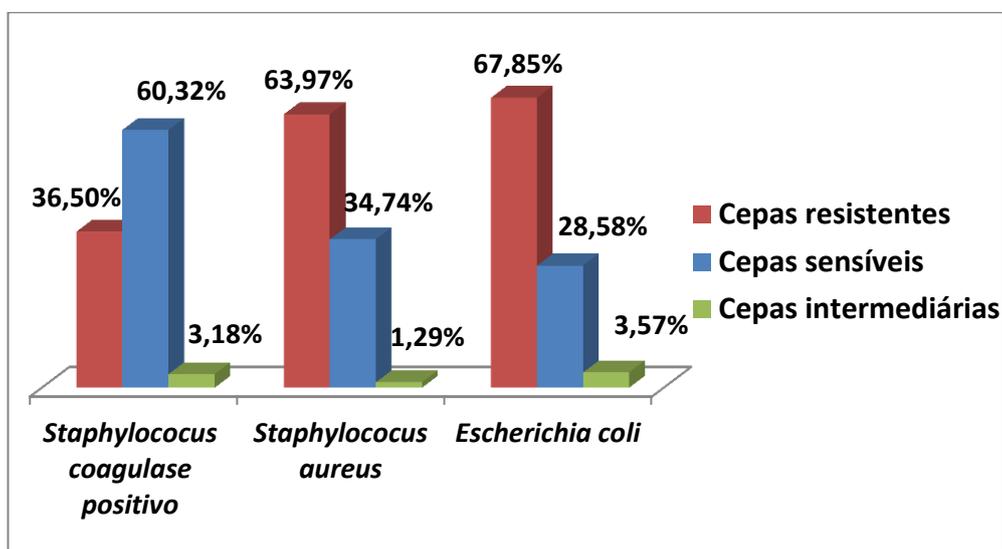


Figura 2. Percentual de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus aureus* e *E. coli* resistentes, intermediárias e sensíveis aos princípios antimicrobianos testados, 2013.

Todas as cepas de *Staphylococcus* spp. apresentaram resistência “in vitro” aos antimicrobianos, sendo que para *Staphylococcus* coagulase positivo cinco cepas foram resistentes a três antibióticos, pelo menos 10 (dez) cepas de *Staphylococcus aureus* demonstraram resistência a 9 (nove) antibióticos. As duas estirpes de *E. coli* identificadas nas análises das amostras de leite foram resistentes a 10 dos 14 antimicrobianos utilizados. A Tabela 5 apresenta os perfis de suscetibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas frente aos diferentes princípios ativos.

Tabela 5. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de amostras de leite cru refrigerado de 05 laticínios da Microrregião de Imperatriz - MA, 2013.

Antimicrobianos	Suscetibilidade	Micro-organismos		
		<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
		N %	N %	N %
VAN ¹	S	14 (77,8)	5 (22,7)	0 (0)
	I	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	R	4 (22,2)	17 (77,3)	2 (100)
ERI ²	S	10 (55,5)	5 (22,7)	0 (0)
	I	3 (16,7)	1 (4,5)	0 (0)
	R	5 (27,8)	16 (72,7)	2 (100)
GEN ³	S	13 (72,2)	12 (54,5)	0 (0)
	I	2 (11,1)	0 (0)	0 (0)
	R	3 (16,7)	10 (45,4)	2 (100)
BAC ⁴	S	13 (72,2)	6 (27,3)	0 (0)
	I	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	R	5 (27,8)	16 (72,7)	2 (100)
AMO ⁵	S	10 (55,6)	6 (27,3)	2 (100)
	I	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	R	8 (44,4)	16 (72,7)	0 (0)
EST ⁶	S	11 (61,1)	10 (45,4)	0 (0)
	I	0 (0)	1 (4,5)	1 (50)
	R	7 (38,9)	11 (50)	1 (50)
OXA ⁷	S	5 (27,8)	2 (9,1)	0 (0)
	I	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	R	13 (72,2)	20 (90,9)	2 (100)
ENR ⁸	S	13 (72,2)	13 (59,1)	2 (100)
	I	2 (11,1)	2 (9,1)	0 (0)
	R	3 (16,7)	7 (31,8)	0 (0)
AMP ⁹	S	8 (44,4)	4 (18,2)	2 (100)
	I	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	R	10 (55,6)	18 (81,8)	0 (0)
LIN ¹⁰	S	6 (33,3)	1 (4,5)	0 (0)
	I	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	R	12 (66,7)	21 (95,5)	2 (100)
TET ¹¹	S	12 (66,7)	11 (50)	0 (0)
	I	1 (5,5)	0 (0)	0 (0)
	R	5 (27,8)	11 (50)	2 (100)
NOR ¹²	S	16 (88,9)	19 (86,4)	0 (0)
	I	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	R	2 (11,1)	3 (13,6)	2 (100)
COT ¹³	S	16 (88,9)	10 (45,5)	2 (100)
	I	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	R	2 (11,1)	12 (54,5)	0 (0)
PEN ¹⁴	S	5 (27,8)	3 (13,6)	0 (0)
	I	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	R	13 (72,2)	19 (86,4)	2 (100)

¹Vancomicina; ²Eritomicina; ³Gentamicina; ⁴Bacitracina; ⁵Amoxicilina; ⁶Estreptomicina; ⁷Oxacilina; ⁸Enrofloxacina; ⁹Ampicilina; ¹⁰Lincomicina; ¹¹Tetraciclina; ¹²Norfloxacina; ¹³Cotrimoxazol; ¹⁴Penicilina.

As cepas de *S. coagulase* positivo foram sensíveis ao cotrimoxazol (sulfametoxazol + trimetropima) e norfloxacina, ou seja, estes antimicrobianos apresentaram poder terapêutico mais eficaz, onde alcançaram 88,9% de sensibilidade (Figura 2). Já para a espécie *S. aureus* encontrou-se índice de sensibilidade maior para norfloxacina (86,4%). Diferentemente de *S. coagulase* positivo, estirpes de *S. aureus* demonstraram resistência ao cotrimoxazol (54,5%) (Figura 4).

Quanto à resistência, oxacilina e penicilina foram os princípios com menor poder de ação sobre 72,2% do isolados de *S. coagulase* positivo (Figura 3). Para *Staphylococcus aureus* os quimioterápicos de menor eficácia foram lincomicina com 95,5% de cepas resistentes e oxacilina com 90,9% (Figura 4).

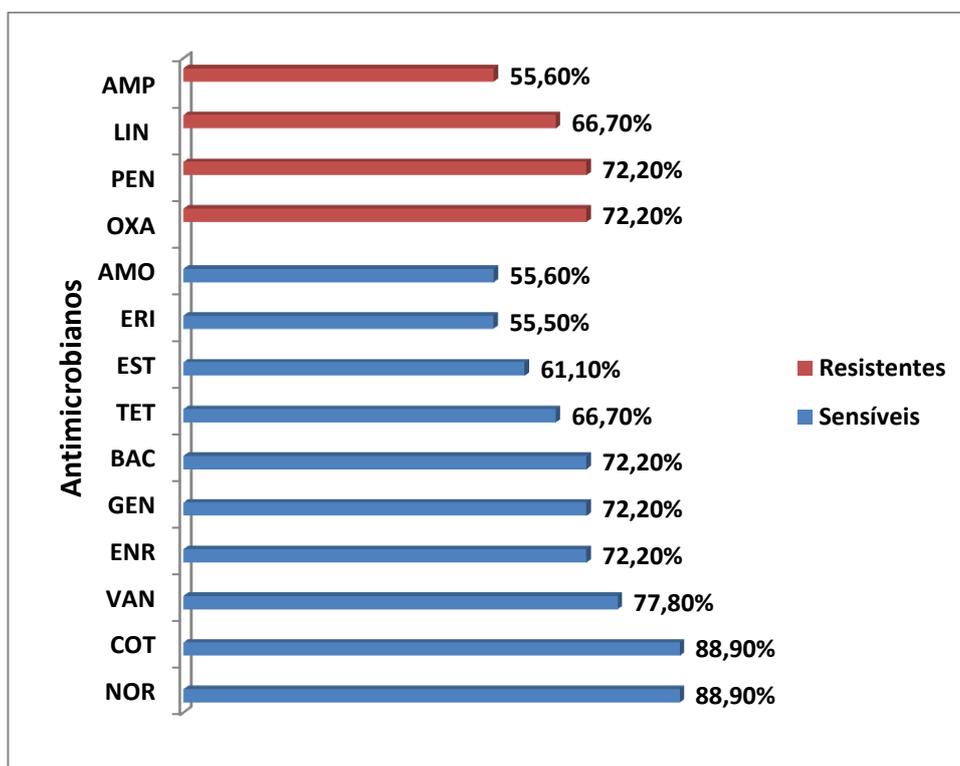


Figura 3. Antimicrobianos os quais as cepas de *Staphylococcus coagulase* positivo apresentaram percentuais acima de 50% de resistência e sensibilidade, 2013.

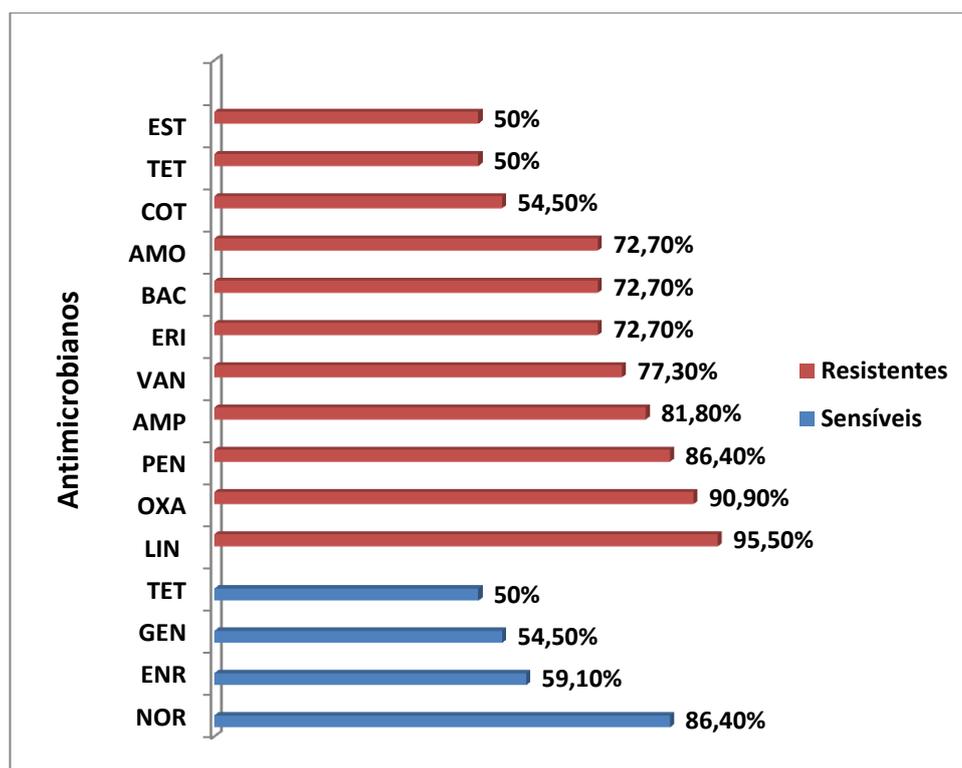


Figura 4. Antimicrobianos os quais as cepas de *Staphylococcus aureus* apresentaram percentuais acima de 50% de resistência e sensibilidade, 2013.

Semelhante aos índices de sensibilidade encontrados para *Staphylococcus coagulase positivo* deste estudo, Langoni et al. (1991) verificaram 64,8% de sensibilidade à gentamicina e 87,3% sensíveis à vancomicina de micro-organismos isolados, dentre eles *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, e *Corynebacterium spp.*

Santos (2006) em Uberlândia – MG, apontou resistência de 73,7% de cepas de *Staphylococcus sp.* à eritromicina. Também Ribeiro et al. (2009) evidenciaram resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite provenientes de propriedades no interior de São Paulo, onde os antibióticos que apresentaram maior resistência foi penicilina (53,5%), ampicilina (41,6%) e neomicina (38,6%).

Gentili et al. (2000) na Argentina nos anos de 1996 a 1998, isolaram *Staphylococcus aureus* de animais com mastites subclínicas, os quais foram resistentes à antimicrobianos penicilina (40,3%), eritromicina (11,6%) e gentamicina (3,4%). Já Fontana et al. (2010) identificaram *Staphylococcus spp.* e *Corynebacterium bovis*, em amostras de leite no estado de Goiás, onde estes foram resistentes à penicilina (100%) e maior sensibilidade à gentamicina (78,4%). Estes dados corroboram com os perfis de

suscetibilidade encontrados neste trabalho, que também apresentou percentuais elevados de cepas resistentes à penicilina e sensíveis à gentamicina.

O presente estudo identificou resistência de *S. aureus* a diversos outros princípios (Figura 3), além da resistência aos antimicrobianos penicilina e eritromicina também verificada nos estudos de Gentili et al. (2000), Santos (2006), Ribeiro et al. (2009), e Fontana et al. (2010).

A espécie *E. coli* expressou 100% de sensibilidade aos antibióticos cotrimoxazol, ampicilina, enrofloxacina e amoxicilina. Ao contrário de Santos (2006), onde 76,9% das enterobactérias identificadas, incluindo *Escherichia coli*, apresentaram resistência à substância amoxicilina.

Campos et al. (2006) encontraram em Goiás, de 69 isolados de *E. coli* em amostras de leite cru de laticínio, 42 cepas (60,9%) foram sensíveis aos antibióticos ampicilina, cefalotina, ciprofloxacina, clotrimoxazol (sulfa + trimetropim), e a tetraciclina foi o antibiótico menos eficaz. Estes resultados são similares aos encontrados no presente estudo, diferindo em relação ao princípio gentamicina, onde as cepas mostraram-se resistentes. Segundo Silva (2009) diferenças geográficas interferem na prevalência de resistência aos antibióticos apontando para a existência de fatores locais, como ambientais, culturais e sociais, com interação complexa influenciando na formação e evolução da suscetibilidade microbiana

Grande parte dos princípios ativos que as bactérias isoladas demonstraram resistência, tais como amoxicilina, ampicilina, penicilina e oxacilina, estão inclusos nos grupos de inibidores (Anexo 1 e 2) que os dois *Kits* detectam, e que possivelmente estiveram nas 38 amostras que apresentaram presença de resíduos. Desta forma, a detecção de quimioterápicos do grupo β -lactâmicos, sulfonamidas e tetraciclinas, entre outros mais administrados em rebanhos leiteiros em 76% das amostras e o percentual de resistência a esses antimicrobianos pelas cepas bacterianas isoladas implica na utilização inadequada destes promovendo a multirresistência bacteriana. De acordo com Brito et al. (2001), relatos sobre a suscetibilidade de cepas de agentes infecciosos como *Staphylococcus* sp. e *E. coli*, especialmente no Brasil, sugerem resistência crescente destes patógenos frente aos antimicrobianos, sendo confirmada nesta pesquisa.

6 CONCLUSÕES

Diante das análises realizadas e dos resultados encontrados pode-se concluir que:

- O leite cru refrigerado produzido nas propriedades leiteiras da microrregião de Imperatriz possui Contagem Bacteriana Total acima dos valores preconizados, os valores de Coliformes a 35°C e a 45°C e de colônias de *Staphylococcus* sp. estão elevados, configurando falhas nos procedimentos de higiene e refrigeração.

- A Contagem de Células Somáticas (CCS) média está dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente para a região, contudo 8% das amostras de leite estavam em desacordo.

- Micro-organismos do grupo *Staphylococcus* coagulase positivo e as espécies *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* estão presentes no leite analisado, indicando falta de cuidados em relação às boas práticas de manipulação do produto;

- O leite apresenta contaminação por resíduos de antimicrobianos, podendo representar um risco potencial para a saúde pública;

- As cepas isoladas de *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são multirresistentes aos antimicrobianos testados.

- A qualidade higiênico-sanitária do leite analisado é insatisfatória, não atendendo às exigências da IN nº 62 de 2011, do Ministério da Agricultura;

- Os laticínios respeitavam os critérios de estrutura física determinados pela legislação, exceto o laticínio A, no entanto apresentaram deficiências na fiscalização durante a recepção do leite.

- Há a necessidade de adoção de testes de triagem para o monitoramento de resíduos de antimicrobianos neste produto;

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qualidade do leite produzido na Microrregião de Imperatriz, a qual pertence à bacia leiteira do estado do Maranhão, pode ser considerada preocupante. Elevados índices de contaminação bacteriana evidenciam deficiências nos cuidados importantes de procedimentos de higiene e no controle do tempo e da temperatura em que o leite é mantido. A presença do micro-organismo patogênico *Staphylococcus aureus*, em níveis elevados, torna-se um perigo aos consumidores, uma vez que essa bactéria pode produzir exotoxinas que em altas quantidades causam intoxicação alimentar, até mesmo ao ingerir produtos pasteurizados e esterilizados.

A existência de inibidores bacterianos nas amostras de leite analisadas denota a necessidade de criação de políticas públicas que regularizem a comercialização dessas substâncias, para que se tenha um melhor controle da aplicação das mesmas.

A utilização errônea e abusiva de antimicrobianos está favorecendo o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes, e em virtude da complexidade da resistência bacteriana, medidas de manejo adequado, a aplicação racional dos antibióticos nos animais e melhoria das condições sanitárias para a promoção de saúde animal, as quais também refletem na saúde humana, devem ser priorizadas e adotadas.

Muitos consumidores e produtores não têm acesso à informação, e a população encontra-se refém de um modelo atual de sociedade preocupada com a produção e consumo em grande escala. Os órgãos de fiscalização muitas vezes são ineficientes e não conseguem atender a todos.

A implantação de programas de monitoramento bem como campanhas educacionais aos produtores e capacitação profissional dos funcionários envolvidos integrando setores de saúde, agricultura, educação, indústria, entidades fiscalizadoras e meios de comunicação são fundamentais para garantir que o leite continue sendo um produto salutar aos consumidores.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M; MOTARJEMI, Y. **Organização Mundial da Saúde: Segurança básica dos alimentos para profissionais de saúde**. São Paulo: Roca, 2002, 51p.

ADESYUN, A.A.; WEBB, L.A.; ROMAIN, H.T. Prevalence and characteristic of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. **Journal of Food Protection**, v.61, n.5, p.629-632, 1998.

ADORNES, R., ESTIMA, B. LADEIRAS, S., MARTINS, L., SANTIAGO, V. Mastite e brucelose na bacia leiteira do Rio Grande do Sul. 8º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1995, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 1995. p.129.

ALMEIDA, J. A. G; NOVAC, F. R.; SILVA, I. S. Estudo da ocorrência de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite humano ordenhado. In: I Congresso Brasileiro de Bancos de leite humano ordenhado, 8-12, jun. 1998, Brasília. **Anais...** Brasília, 1998.

ANDRADE, U. V. C., HARTMANN, W.; MASSON, M. L. Isolamento microbiológico, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. *Ars Veterinaria*, Jaboticabal, SP, v.25, n.3, p.129-135, 2009.

ANDRETTA, M.; BONATTO, C.; DOMINGUES, L.; RIBEIRO, L.; CERESER, N. D.; LIMA, H. G. DE. Contagem de Mesófilos, Coliformes Termotolerantes e *Staphylococcus* Coagulase Positiva em pontos de contaminação de diferentes sistemas de ordenha na região sul do Rio Grande do Sul. XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, 2003, Pelotas. **Anais...** Pelotas, 2013.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo - PAMVet**. Brasília, 2003. Disponível em:

<<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf> > Acesso em: 16/10/ 2013.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA. 2001. 676 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Coletânea de Normas e Planos de Amostragem**, v.2, p.1-50, 1985

ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.440-446, 2006.

BAIRD-PARKER, A.C. The staphylococci “an introduction”. **Journal of Applied Bacteriology**, p.15-85, 1990.

BALABAN, N; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **Int y Food Microbiol**, v. 61, p.1-10, 2000.

BARBERIO, A.; GIETL, H.; DALVIT, P. “In vitro” sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. **Napgama**, v.5, n.1, p.10, 2002.

BEAUDEAU, F.; FOURICHON, C.; SEEGER, H.; BAREILLE, N. Risk of clinical mastitis in dairy herds with a high proportion of low individual milk somatic-cell counts. **Preventive Veterinary Medicine**. v.53, p.43-54, 2002.

BELOTI, V, RIBEIRO JÚNIOR, J. C., TAMANINI, R.; YAMADA, A. K.; CAVALETTI, L.; SHECAIRA, C. DE L.; NOVAES, D. G.; SILVA, F. F. DA.. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema – PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v.9, n.16, 2011.

BIACCHI, N. C.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Detecção de resíduos de antibióticos em leite bovino na região do Vale do Paraíba, São Paulo. **Revista Biociência**, Taubaté, v. 10, n. 1-2, p. 47-49, jan./jun. 2004.

BORGES M.F.; NASSU, R.T.; PEREIRA, J.L. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo coalho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, p. 1431- 1438, 2008.

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, p.589-594, 2013.

BRAMLEY, A.J.; McKINNON, C.H. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. **Dairy Microbiology: The microbiology of milk**. 2.ed. Barking: Elsevier Science Publishers, 1990. p.163-208.

BRASIL. RIISPOA – Regulamento Técnico da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. DECRETO Nº 30.691, DE 29 DE MARÇO DE 1952, que dispõe o Art. 14 da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29/03/1952.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos... **Diário Oficial da União**, Brasília, 11/03/1996, p.3977, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Regulamento Técnico de Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24/09/1998, nº 165- E, p. 28 e 29. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42 de 20 de dezembro de 1999. Cria o programa Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal e os Programas de Controle de Resíduos em Carne, Mel, Leite e Pescado. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p.213-227, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 78, de 19 de dezembro de 2002. Controle de Resíduos em Carne, Mel, Leite e Pescado.

Diário Oficial da União, Brasília, DF, 06 de janeiro de 2003, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anexo III: Manual de Procedimentos do PNCRC para laboratórios – Área Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22/07/2009, nº 138, Seção 1, p.13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Cru refrigerado e Pasteurizado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 29/11/2011.

BREWER, M.S. **Food storage, food spoilage, and foodborne illness**. Urbana, Illinois: Phyllis Yates Picklesimer, 1991. 19p.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M.; VARGAS, O. L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.1, p.39-44, 1998.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.10-17, 2001.

BRITO, M. A. V. P. Normas internacionais e exigências do *Codex Alimentarius* e comparação entre blocos comerciais sobre a adoção de testes para detecção de resíduos de antibióticos no leite. In: BRITO, J. R. F. (Ed.). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p. 65-76.

BRITO, M. A. V. P. **Resíduos de antimicrobianos no leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. 28 p.

BRITO, J. R. F.; SOUZA, G. N., FARIA, C. G DE., MORAES, L. C. D.

Procedimentos para coleta e envio de amostras de leite para determinação da composição e das contagens de células somáticas e de bactérias. Juiz de Fora:

Embrapa Gado de Leite, 2007. 8p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 92).

Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/65285/1/CT-92-Procedimentos-para-coleta-e-envio.pdf>> Acesso em: 23/03/2013.

CAMPOS, M. R. H.; KIPNIS, A; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; VIEIRA, C. A. S., JAYME, L. B.; SANTOS, P. P.; SERAFINI, A. B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio em Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, jul.-ago., 2006.

CARLOS, L. A. et al. Avaliação físico-química, microbiológica e de resíduos de penicilina, em leite tipo C comercializado no município de Campos de Goytacazes, RJ. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 123, p. 57-61, ago. 2004.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* present in Minas cheese and raw Milk in Brazil. **Food Microbiology**, v.19, p.9-14, 2002.

CARVALHO, A. L.; TANEZINI, C. A.; COSTA, F. M. A.; PONTES, I. DE S.; ROCHA, J. DOS M.; CERQUEIRA, M. B. S.; D.; ALESSANDRO, W. T. **Qualidade do Leite do Centro-Oeste**. Goiânia: Editora da UFG, 1995. 189p.

CARVALHO, S.A.; CARVALHO, M.A.R.; CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; ABREU, E.F.; BRAGA, R.G. Pesquisa de enterotoxinas e de substâncias antagonistas produzidas por *Staphylococcus aureus* recuperados de leite bovino *in natura* e de outros alimentos. In: SEMANA DE PÓS GRADUAÇÃO DA UFMG, 3., Belo Horizonte, 2002. **Anais...** Belo Horizonte, 2002.

CARVALHO, A. C. DE, CASTRO, F. M. DE, KAWABATA C. Y., T. G. DA S. TENÓRIO; VIEIRA, E. DE L. Pesquisa de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru no município de Araiões – MA . **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n.2, p. 22, 2012

CASSIANO, J. S.; BENEDETTI, E.; TETZNER, T. A. D. Contagem de células somáticas em amostras de leite cru na região de Catalão, GO. **Revista Higiene Alimentar**, v.21, n.149, p.73-81, 2007.

CASSOL, D. M. S.; SANDOVAL, G. A. F.; PERICOLE, J. J.; GIL,P.C.N.; MARSON, F. A. Introdução Agentes da Mastite Diagnóstico e Tratamento. **A Hora Veterinária – Ano 29, n°175, maio/junho/2010**. Disponível em: <http://www.ourofinovet.com.br/portal/files/espaco_veterinario/HV175-MastitebovinaDaniela.pdf> Acesso em: 20/03/2012.

CASURA, C.; SCHUKKEN, Y. H.; RÜSCH, P. Quality assessment of California mastitis test as diagnostic tool in quarter somatic cell count estimation. **Proc. IDF Int. Mastitis Seminar**, Tel Aviv, p.357-358, 1995.

CERQUEIRA, M. M. O. P. Detecção de resíduos de antibióticos em leite: testes disponíveis e considerações. In: BRITO, J. R. F. (Ed.). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p. 77-87.

CHYE, F.Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M.K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, v.21, n.5, p.535-541, 2004.

CLSI/NCCLS. **Padronização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão**. 8ª Ed, 2003. Disponível em: <http://sbmicrobiologia.org.br/clsi_OPASM2-A8.pdf> Acesso em 23 out. 2011.

COSTA, E. O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Revista Higiene Alimentar**, v.10, n.44, p.15-17, 1996.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 501-515.

COSTA, A. DA S.; LOBATO, V. Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em leite e bebida láctea UHT por teste de inibição microbiana comercial. **Revista Instituto Laticínios Cândido Torres**, v.64, n.367/368, p.72-76, 2009.

COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R. **Infections diseases of livestock**. Oxford: University Press, v. 2, cap. 190, p. 1564-1595, 1994.

COUSIN, M. A.; BRAMLEY, A. J. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology**. New York: Applied Science, v. 1, p. 119-163, 1981.

CUNHA, A. DE S.; CUNHA, M. R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.2, n.1, p.105-114, jan-jun, 2007.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica, São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hídrica/saphylo.htm>> Acesso em 27/11/2013.

DANTAS, D. S. **Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, PB**. 2012. 79f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2012.

DRESCHER G.; MATTIELLO S.P.; PEIXOTO R.M.; VARGAS A.C.; MACIEL M.N.; COSTA M.M. Caracterização bioquímica e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de agentes bacterianos isolados de mastite subclínica ovina na região oeste de Santa Catarina. **Ciênc. Anim. Bras.**, v.11, n.1, p.188-193, 2010.

EUZÉBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p.590-592. 1997.

FAVA, L. W.; PINTO, A. T. Ocorrência de leite ácidos e resíduos de antimicrobianos no leite cru entregue em laticínio do Vale do Taquari, RS, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, n.4, p.419-423, 2010

FOLLY, M. M.; MACHADO, S. DA C.A. Determinação de resíduos de antibióticos, utilizando métodos de inibição microbiana, enzimático e imuno-ensaios no leite pasteurizado comercializado na região norte do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v.31, n.1, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v31n1/a15v31n1.pdf>> Acesso em: 25/05/2012.

FONSECA, L.F.L; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 175p.

FREITAS, W. C. DE, TRAVASSOS, A. E. R., MACIEL, J. F. Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho produzidos no estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n.1, p.35-42, 2013.

FONTANA, V. L. D. DA. S., GIANNINI, M. J. S. M., LEITE, C. Q. F.; MIRANDA, E. T.; ALMEIDA, A. M. F.; FONTANA, C. A. P.; STELLA, A. E. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene b-lactamase em *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n.4, p.552-559, 2010.

GASPAROTTO, P.H.G.; ROCHA, C.S.; GRECELLÉ, C.B.Z. Quantificação de coliformes totais e fecais pela técnica do NMP em amostras de água do município de Ji, Paraná. 2008. Disponível em:
<www.revista.ulbrajp.edu.br/seer/inicia/ojs/include/getdoc.php?id=1279&article=440&mode=pdf> Acesso em: 15/01/2014.

GENTILI, E.; DEMANIEL, G., LLORENTE, P. GODALY, S. REBUELTO, M., DEGREGORIO, O. Antimicrobial susceptibility of *S. aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. **Journal Dairy Science**, v.83, p.1224-1227, 2000.

HOLT, J.G., KRIEG, N.R., SNEATHM, P.H.A., STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 787p.

IDF - INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. The IDF group of experts on mastitis. Laboratory methods for use in mastitis word. Inter. **Dairy Fed.** v.132, p.3-27, 1981.

IKEDA, T.; TAMATE, N.; YAMAGUCHI, K.; MAKINO, S. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.2793-2795, 2005.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos: Su significado y metodos de emuneración**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 367p.

JONES, G. M. **On farm tests for drug residues in Milk**. Petersburg: Virginia State University, 1999. 6 p.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology. 7th. Edition. 1999. Cap.16, p.264-282.

LANCETTE, G.A.; TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDRZANT, C. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 1912p.

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

LACERDA, L. M. **Qualidade do leite e da água de propriedades leiteiras nos municípios de Miranda do Norte, Itapecuru-Mirim e Santa Rita – MA**. 2008. 91 f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

LIMA, V. M. B.; BORNSTEIN, C. T.; CUKIERMAN, H. L. O programa de rastreabilidade da produção de bovinos – revisão e análise crítica. **Estudos Sociedade e Agricultura**. v.14, n. 1, p.49-87, 2006.

LUZ, D. F.; BICALHO, F. A.; OLIVEIRA, M. V. M.; SIMÕES, A. R. P. Avaliação microbiológica em leite pasteurizado e cru refrigerado de produtores da região do Alto Pantanal Sul-Mato-Grossense. **Revista Agrarian**, Dourados, v.4, n.14, p.367-374, 2011

MAC FADDIN, J. F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. 527p.

MARTINS, P. R. G.; SILVA, C. A.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; JÚNIOR, W. S.; ZANELA, M. B. Produção e qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas – RS em diferentes meses do ano. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.209-214, 2006.

MATSUBARA, M.T.; BELOTI, V.; TAMANINI, R. FAGNANI, R.; SILVA, L. C. C. DA.; A. A. M.; BATTAGLINI, A.P.P.; ORTOLANI, M. B. T. O.; BARROS, M. A. F. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. **Semina Ciências Agrárias**, v.32, p.277-286, 2011.

MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D. F.; NERO, L. A.; FERREIRA, M. DE A.; PIRES, E. M. F.; PAQUEREAU, P. D. Qualidade do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.1, p.173-182, jan./mar. 2010.

MEDEIROS, N. G. A.; CARVALHO, M. G. X.; LEITE, E. O.; PEREIRA, J. M.; PONTES, M. P. S. Detecção de antibióticos no leite “in natura” consumido no município de Patos-PB. In: Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária, 4, Recife. **Anais...** Recife: SPEMVE, 1999. p. 225-226.

MELO, A. F.; SILVA, M. A. P. DA; CARVALHO, B. S.; SILVA, F. R.; CARMO, R. M. DO; LAGE, M. E. Qualidade do leite cru tipo C e refrigerado em sistemas leiteiros tradicionais do sudoeste goiano. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.68, n.395, p.26-32, nov/dez., 2013.

MORAIS, C. M. Q. J. Viabilidade do uso de métodos rápidos para detecção de antibiótico em leite em um Programa Nacional de Monitoramento. In: BRITO, J. R. F. (Ed.). **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. p. 89-95.

MORAES, C. R.; FUENTEFRÍA, A. M.; ZAFFARI, C. B.; CONTE, M.; ROCHA, J. P. A. V.; DORNELES, A. S.; SILVA, P. V. DA.; CORÇÃO, G.; COSTA, M. DA. Qualidade Microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.3, p.259-264, 2005.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência

bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MOTA, D.M.; DA SILVA, M.G.C. Uso racional de medicamentos: uma abordagem econômica para tomada de decisões. **Ciências & Saúde**, v.13, p.589-601, 2008.

NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, n.2, p.119-124, 2001.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. **Diarrhegenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiological Reviews**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BERLOTI, V.; BARROS, M. A. F.; FRANCO, B. D. G. M. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 391-393, abr./jun. 2007.

NETO, A.C. R., BARBOSA, S. B. P., JATOBÁ, R. B.; SILVA, A. M.; SILVA, C. X.; SILVA, M. J. A.; SANTORO, K. R. Qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p.1343-1351, 2012.

OKURA, M. H., RIGOBELLO, E. C., ÁVILA, F. A. Isolamento e identificação de patógenos em leite cru produzido nas microrregiões do Triângulo Mineiro, MG. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v.21, n.3, p.324-331, 2005.

PANETO, B.R., VIEIRA, S.D., ITURRINO, R.P.S., SNATO, E., MARIN, J.M. Ocorrência de *Escherichia coli* toxigênica em queijo tipo minas frescal comercializado na cidade de Araguaína- TO. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23, 2005, Santos. **Anais...** Santos: SBM, 2005.

PARK, C. E.; AKTAR, M.; RAYMAN, K. Nonespecific reactions of a commercial enzyme-linked immunoabsorbent assay kit (Tecra) for detection of staphylococcal

enterotoxinas in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 8, p. 2509-2512, 1992.

PASSOS, A. D., FERREIRA, K. G. L., JULIANI, G. L.; SANTANA, E. H. W. DE.; ARAGON-ALEGRO, L. C. Avaliação microbiológica de queijos minas frescal comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina – PR. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v.64, n.369, p.48-54, 2009.

PAULA, M.C.; RIBAS, N.P.; MONARDES, H.G; ARCE, J. E.; ANDRADE, U. V. C. DE. Contagem de Células Somáticas em Amostras de Leite. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.33, p.1303-1308, 2004.

PEDERSEN, L. H.; AALBAEK, B.; RONTVED, C.M.; INGVARTSEN, K. L.; SORENSEN, N. S.; HEEGAARD, P.M.; JENSEN, H.E. Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. **Journal of Comparative Pathology**. v.128, p.156-164, 2003.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning from cream-filled cake in a metropolitan area of South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.28, n.6, p.406-409, 1994.

PEREIRA, K. S.; PEREIRA, J. L. Estafilococos coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v.19, n.129, p.32-34, 2005.

PEREIRA, M. S. V, SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**. 20: 391-395, 1995.

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

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C. **Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. 1737p.

REIBNITZ, M. G. R., TAVARES, L. B. .B., GARCÍA, J. A. Presencia de coliformes fecales, Escherichia coli y Staphylococcus aureus coagulasa y DNAsa positivos em queso. **Revista Argentina de Microbiologia**. Buenos Aires, v.30, n.1, p.8-12, 1998.

RÉVILLION, J. P. Controle da Sanidade dos Animais (Principalmente Mastite). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2012 Disponível em: <http://www.ufrgs.br/alimentus/laticinios/micro/micro_controle_sanidade.htm> Acesso em: 28/03/2012.

RIBEIRO-FURTINI, L. L.; ABREU, L. R. Utilização de APPCC na indústria de alimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.2, p.358-363, mar./abr., 2006.

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

RUPP, R.; BEAUDEAU, F.; BOICHARD, D. Relationship between milk somatic-cell counts in the first lactation and clinical mastitis occurrence in the second lactation of French Holstein cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 46, p.99-111, 2000.

SAAB, M.S.B.L.M. **Valor percebido pelo consumidor: um estudo de atributos da carne bovina**. 1999. 154f. Dissertação (Mestrado em Administração) - Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, São Paulo, 1999.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 185p

SANTANA, E. H. W. DE.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C., MENDONÇA, M. B. O. C. DE. Estafilococos em alimentos. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, jul./set., 2010

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Importância e efeito de bactérias psicrotóxicas sobre a qualidade do leite. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SANTOS, M. V. Antibióticos como não deixar resíduos no leite. **Balde Branco**, n.460, p.54-57, 2003.

SANTOS, M. V. Efeitos da mastite sobre a qualidade do leite e dos derivados lácteos. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa, 2002. p.179-188.

SANTOS, A. **Estudo comparativo entre a PCR e técnicas imunológicas (ELISA, RPLA e OSP) na enterotoxigenicidade de isolados de estafilococos coagulase negativa**. 2003. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.

SANTOS, M.V. Aspectos não microbiológicos afetando a qualidade do leite. In: DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo: UPF editora, 2004. p.269-283.

SANTOS, M. V. CCS E CBT siglas fundamentais para avaliar qualidade do leite. **Balde Branco**. v.490, p.48-51, 2005.

SANTOS, C. D. M. **Staphylococcus sp e enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia, MG**: perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. 2006. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

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

SEBRAE. Diagnóstico da cadeia produtiva do leite e derivados – Desenvolvimento da bacia leiteira da Região Tocantina e Médio Mearim, 2003. Disponível em: <[http://201.2.114.147/bds/bds.nsf/FFB2130623B9DD0403256F23006DC59D/\\$File/NT0009EF92.pdf](http://201.2.114.147/bds/bds.nsf/FFB2130623B9DD0403256F23006DC59D/$File/NT0009EF92.pdf)> Acesso em: 21/01/2014.

SEBRAE. **Perfil tecnológico das queijeiras no cariri e agreste Paraibano**. Serviço de Apoio às micro e pequenas empresa do Estado da Paraíba, João Pessoa, 2008.

SEBRAE LEGAL. Disponível em: < <http://www.sebrae-legal.com.br>> Acesso em: 16/09/2009.

SHAIK, G. V.; GRENN, L. E.; GUZMÁN, D. ESPARZA, H.; TADICH, N. Risk factors for bulk milk somatic cell counts and total bacterial counts in smallholder dairy farms in the 10th region of Chile. **Preventive Veterinary Medicine**, v.67, p.1-17, 2005.

SHOPSIN, B.; MATHEMA, B; MARTINEZ, J.; HA, E.; CAMPO, M. L., FIERMAN, A.; KRASINSKI, K.; KORNBLUM, J.; ALCABES, P.; WADDINGTON, M.; RIEHMAN, M.; KREISWIRTH, B. N. Prevalence of methicillin resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* in the community. **Journal Infect Disease**, v.182, p.352-362, 2000.

SILVA, J.A, As novas perspectivas para o controle sanitário dos alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v.13, n.65, p.19-25, 1999.

SILVA, M. A. P., SANTOS, P. A. DOS, ISEPON, J. DOS S.; REZENDE, C. S. M. E; LAGE, M. E.; NICOLAU, E. S. Influência do transporte a granel na qualidade do leite cru refrigerado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.68, n.3, p.381-387, 2009

SILVA, M. F. DA. **Escherichia coli e a resistência antibiótica: Uma análise do padrão de evolução da resistência da Escherichia coli aos antibióticos no distrito de Castelo Branco, de 2006 a 2008.** 2009, 22f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2009. Disponível em: <http://www.fcsaude.ubi.pt/thesis/upload/118/804/midana_silvapdf.pdf> Acesso em: 15/02/2014.

SILVA, R. M. DA, SILVA, R. C. DA, RIBEIRO, A. B. Resíduos de antibióticos em leite. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.1, p.30-44, jan./abr., 2012.

SOMMERHAUSER, J.; KLOPPERT, B., WOLTER, W.; ZSCHOCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. The epidemiology of Staphylococcus aureus infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary Microbiololy.** v.96, p.91-102, 2003.

TAVERNA, M. Tecnologia de ordenha e qualidade do leite. In: DÜRR, J. W. CARVALHO, M. P., SANTOS, M. V. **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil.** Passo Fundo: Ed. Universitária, 2004, p.146-177.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia.**, v.60, p.243-250, 2008.

TETZNER, T.A.D.; BENEDETTI, E. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro. 2005. Disponível em: <<http://www.girleiteiro.org.br/artigos.asp>>. Acesso em: 06/01/2014.

VALIN, V.M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H. L. DA.; SILVA, L. C. C. DA. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas na ordenha de 19 municípios da região central do Paraná. **Semina Ciências Agrárias**, v.30, p.181-188, 2009.

VELHO, J. P.; BARCELLOS, J. O. J.; LENGLER, L.; ELIAS, S. A.; OLIVEIRA, T. E. Disposição do consumidores porto-alegrenses à compra de carne bovina com certificação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.2, p.399-404, 2009.

WONG, A. C. L.; BERGDOLL, M. S. **Staphylococcal food poisoning**. 2 ed. London: Elsevier, 2002, 248p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Emerging and other communicable diseases, surveillance and control: Report of a WHO consultation of public health implications of consumption of raw milk and meat and their products**, Germany, 17-20, December, 1995. (WHO/EMC/ZOO/96.7). Disponível em: <www.who.int/hq/1996/WHO_emc_zoo96.7.pdf> Acesso em: 06/12/2013.

YI, C. S.; LEWONG, A. C. Current perspectives on detection of Staphylococcal enterotoxins. **Journal Food Protec**, v.60, p.195-202, 1997.

ANEXOS

ANEXO 1

Grupos de antimicrobianos e respectivos princípios cujos resíduos são detectados pelo *kit* Delvotest® SP – NT, segundo manual do fabricante.

Grupos						
	β-lactâmicos	Sulfonamidas	Tetraciclina	Macrolidas	Aminoglicosídeos	Outros
Medicamentos	Penicilina G	Sulfadiazina	Tetraciclina	Tilosina	Gentamicina	Trimetoprima
	Ampicilina	Sulfametazina	Oxitetraciclina	Spiramicin	Neomicina	Dapsna
	Amoxicilina	-	-	Eritromicina	-	-
	Ceftiofur	-	-	-	-	-
	Cefapirina	-	-	-	-	-
	Cloxacilina	-	-	-	-	-
	Dicloxacilina	-	-	-	-	-
Oxacilina	-	-	-	-	-	-

ANEXO 2

Classes de antimicrobianos e seus respectivos princípios ativos cujos resíduos são detectados pelo *kit* Eclipse 50 (Cap-Lab®).

Grupos					
	β-lactâmicos	Sulfonamidas	Tetraciclinas	Macrolidas	Aminoglicosídeos
Medicamentos	Penicilina G	Sulfatiazol	Tetraciclina	Eritromicina	Gentamicina
	Ampicilina	Sulfametazina	Oxitetraciclina	Tilosina	Neomicina
	Amoxicilina	-	-		-
	Cloxacilina	-	-	-	-
	Oxacilina	-	-	-	-
	Cefalexina	-	-	-	-
	Cefapirina	-	-	-	-

APÊNDICES

APÊNDICE A – Inquérito aplicado aos laticínios da microrregião de Imperatriz, MA.

QUESTIONÁRIO

1. Capacidade de recebimento:
2. Procedência da matéria-prima (quais e quantidade de propriedades e municípios fornecedores):
3. Onde recolhe o leite? () direto da propriedade (tanques) () direto da propriedade (latões) () postos de refrigeração
4. Meio de transporte da matéria-prima:
() Rodoviário () Ferroviário () Tração Animal () Outros ()
5. Caminhão:
() Comum () De tanque isométrico () Com unidade frigorífica () Outros
6. Plataforma de recepção de matéria-prima: () sim () não
Independente da expedição? () sim () não
7. Laboratório de recepção:
Características físicas satisfatórias? () sim () não
Análises de rotina realizadas?
Equipamentos para análise de rotina
() Completo () Incompleto () Ausente
Número de analistas pré-recepção do leite:
8. Natureza do piso:
9. Instalações de água para limpeza? () sim () não
10. Instalações de vapor para a limpeza? () sim () não
11. Escoamento das águas de limpeza?
() Suficiente () Insuficiente () Precário
12. Caminhão-tanque:
Temperatura:
Lavagem (quantas vezes, qual procedimento e produtos utilizados):
13. Local para a lavagem de veículos? () sim () não
Satisfaz? () sim () não

14. Lavagem de latões? () sim () não

() Manual () Mecânico

Lavagem (qual procedimento e produtos utilizados):

15. Tanque de estocagem ou armazenamento:

Temperatura:

Lavagem (quantas vezes, qual procedimento e produtos utilizados):

16. Água de abastecimento (procedência):

() Rede pública (encanada) () Poço raso () Poço profundo artesiano () Superfície

17. Gerador próprio? () sim () não

18. Estado geral, manutenção, higiene e estado de conservação do local e

equipamentos:

19. Funcionários:

Quantos na recepção?

Quais vestimentas e de que era composta?

20. Tipo de ordenha das propriedades distribuidoras?

() manual () mecânica circuito aberto (balde ao pé) () mecânica circuito fechado

APÊNDICE B



Tanque de estocagem com capacidade para 10.000 litros de um dos laticínios da microrregião de Imperatriz, MA.



Coletor de inox utilizado para coletar as amostras nos tanques de estocagem.

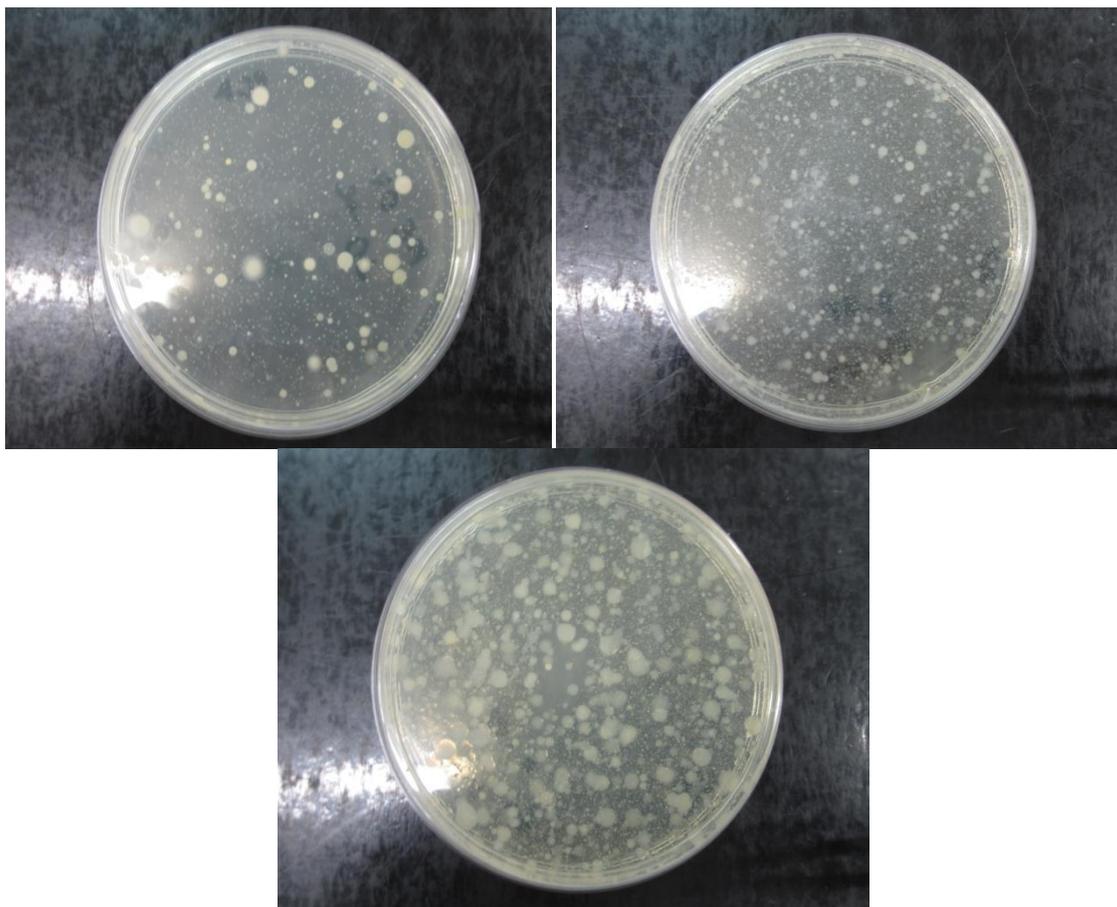


Equipamento contador eletrônico de células somáticas DeLaval® e seu acessório cassete (à direita); frasco contendo amostra de 250 mL de leite (à esquerda).

APÊNDICE C – Análises microbiológicas das amostras de leite cru refrigerado procedentes dos laticínios.

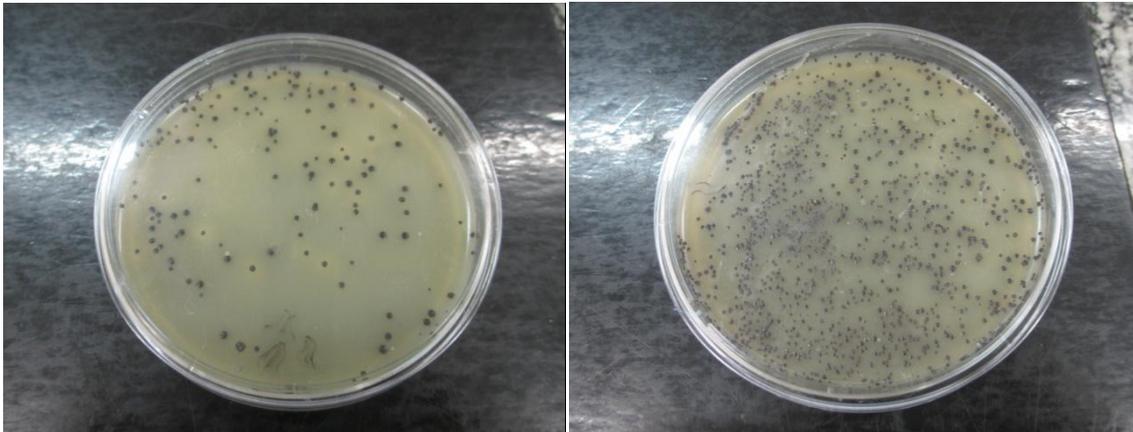


Tubos com caldo VB positivos para Coliformes a 35°, apresentando turbidez e glóbulos de gás.

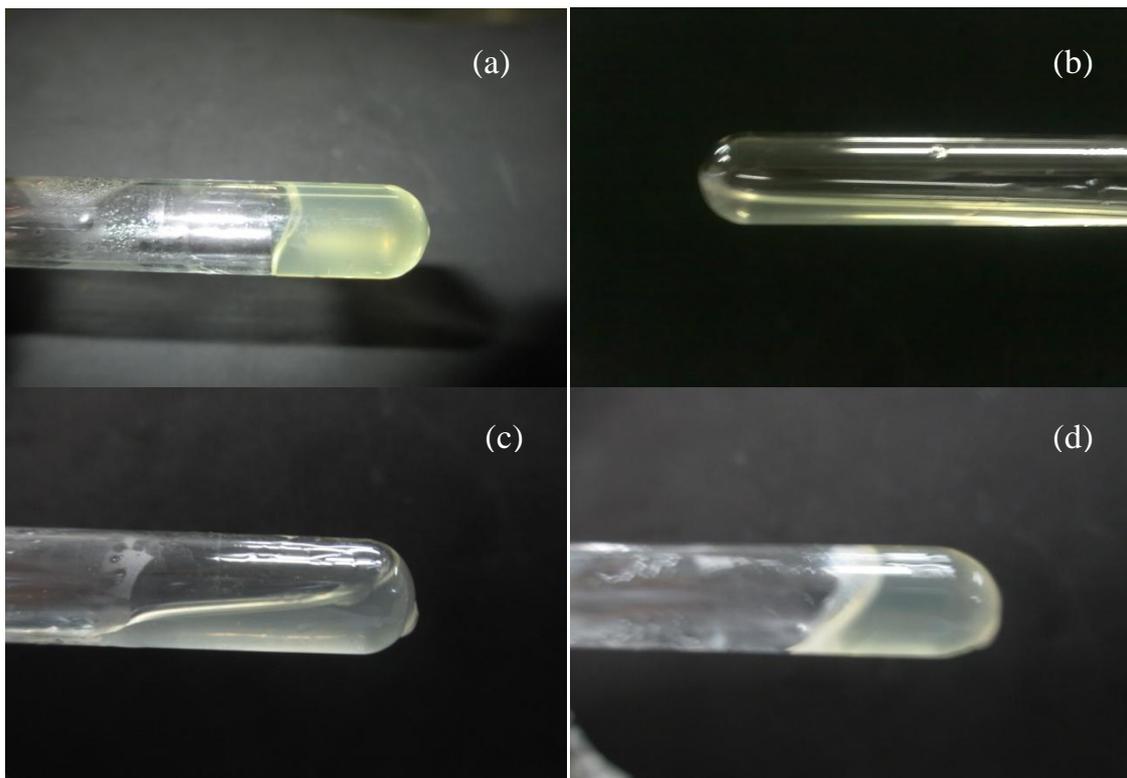


Placas contendo crescimento de colônias bacterianas (aeróbios mesófilos) em meio PCA para determinação de Contagem bacteriana total (CBT).

APÊNDICE D – Análises para isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus* das amostras de leite cru refrigerado oriundas dos laticínios.



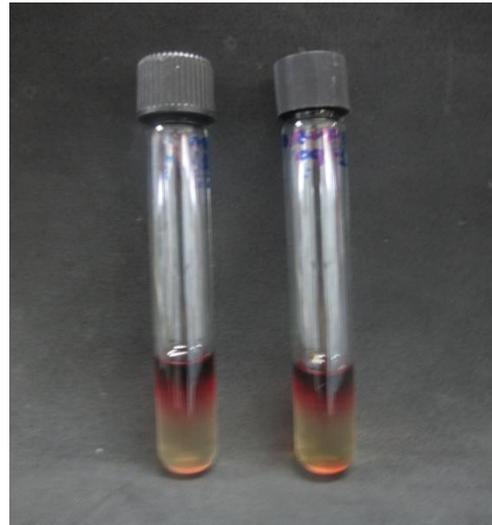
Crescimento de colônias bacterianas sugestivas de *Staphylococcus aureus* apresentando aspecto negro e com anel opaco, em meio Baird-Parker.



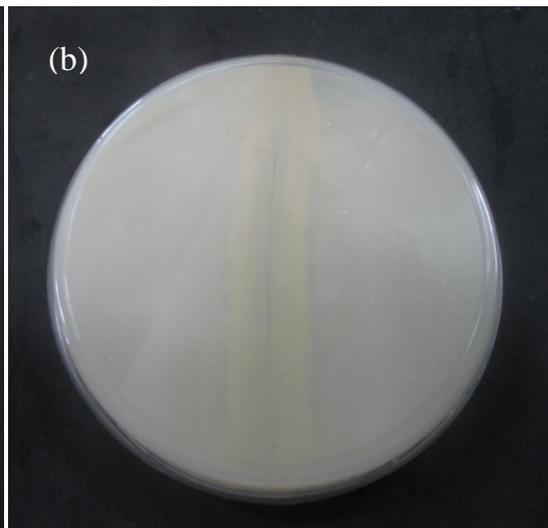
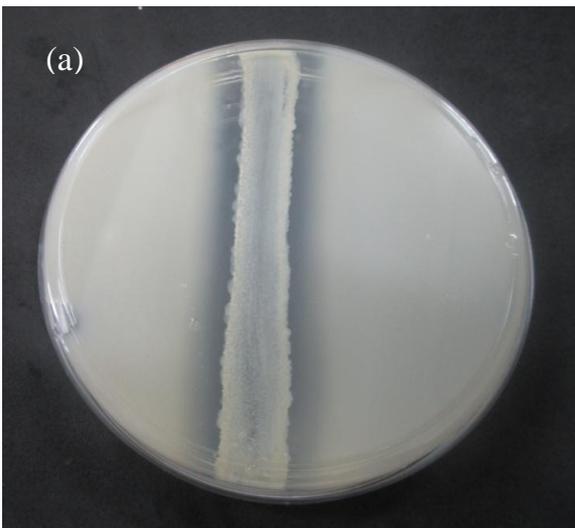
Teste de coagulase livre em tubo: teste positivo grau “4+” com coagulação completa (a); teste negativo pela ausência de formação de coágulos (b); positivo grau “2+” com coagulação pequena e desorganizada (c) e positivo grau “3+” apresentando formação de coágulos grandes e organizados (d).



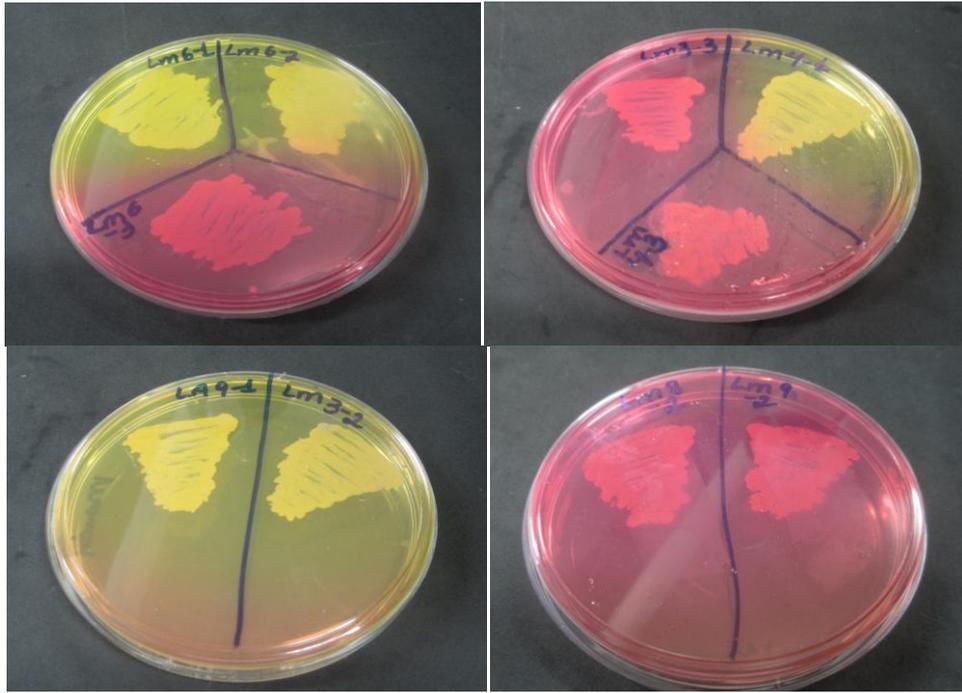
Tubos com resultados positivos ao teste bioquímico TSI.



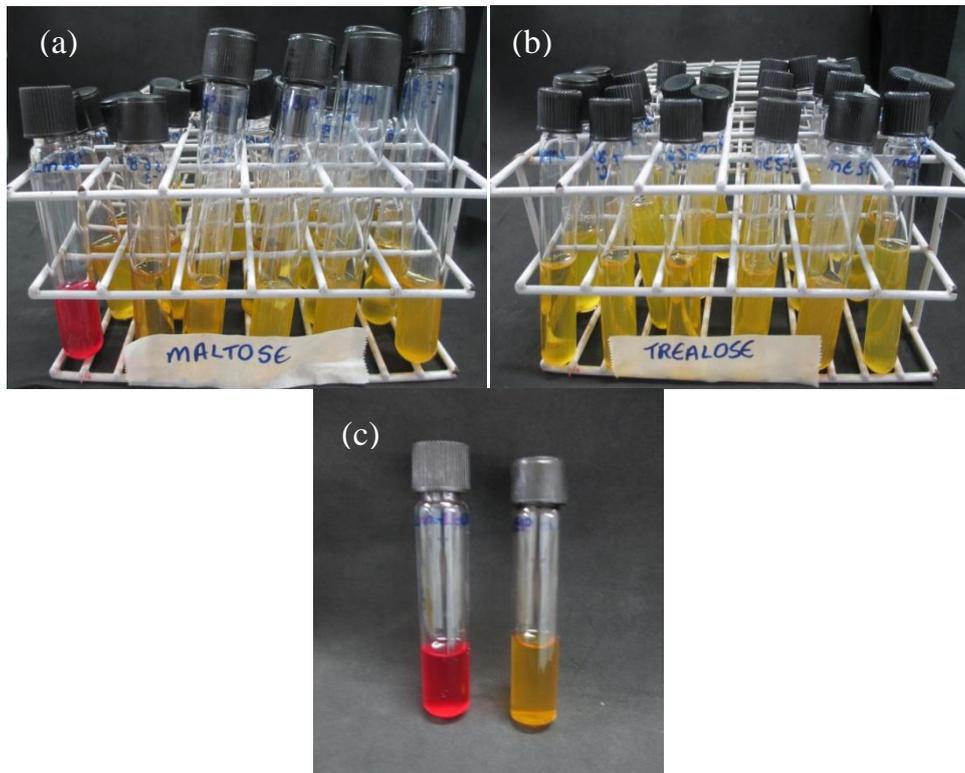
Tubos apresentando coloração avermelhada indicando positividade ao teste bioquímico Voges-Proskauer.



Resultado positivo ao teste bioquímico DNase demonstrado pelo surgimento de halo transparente em torno da faixa de crescimento microbiano (a) e resultado negativo ao teste DNase sem o halo (b).

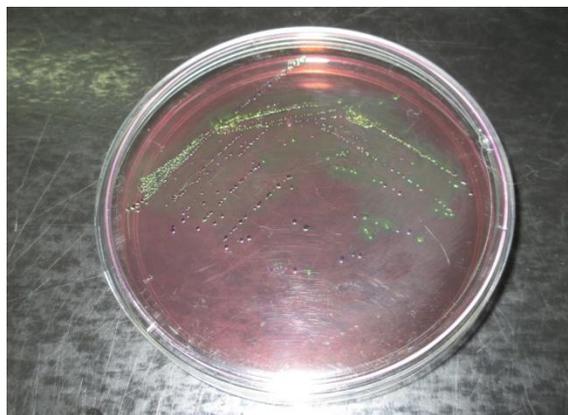


Cepas positivas (coloração amarela) e negativas (coloração vermelha) ao teste bioquímico Manitol em anaerobiose.



Provas bioquímicas de utilização dos carboidratos: Maltose (a), trealose (b) e manitol (c) em aerobiose: tubos apresentando alterações da coloração do vermelho para o amarelo em amostras positivas e sem alteração da cor em amostras negativas.

APÊNDICE E – Análises para isolamento e identificação de *Escherichia coli* das amostras de leite cru refrigerado oriundas dos laticínios.



Placa contendo colônias de coloração verde-metálico características de *Escherichia coli*, em Ágar EMB.



Resultado positivo ao TSI.



Teste de Voges-Proskauer positivo apresentando coloração vermelha.



Teste INDOL (meio SIM): resultado negativo à esquerda e resultado positivo à direita.

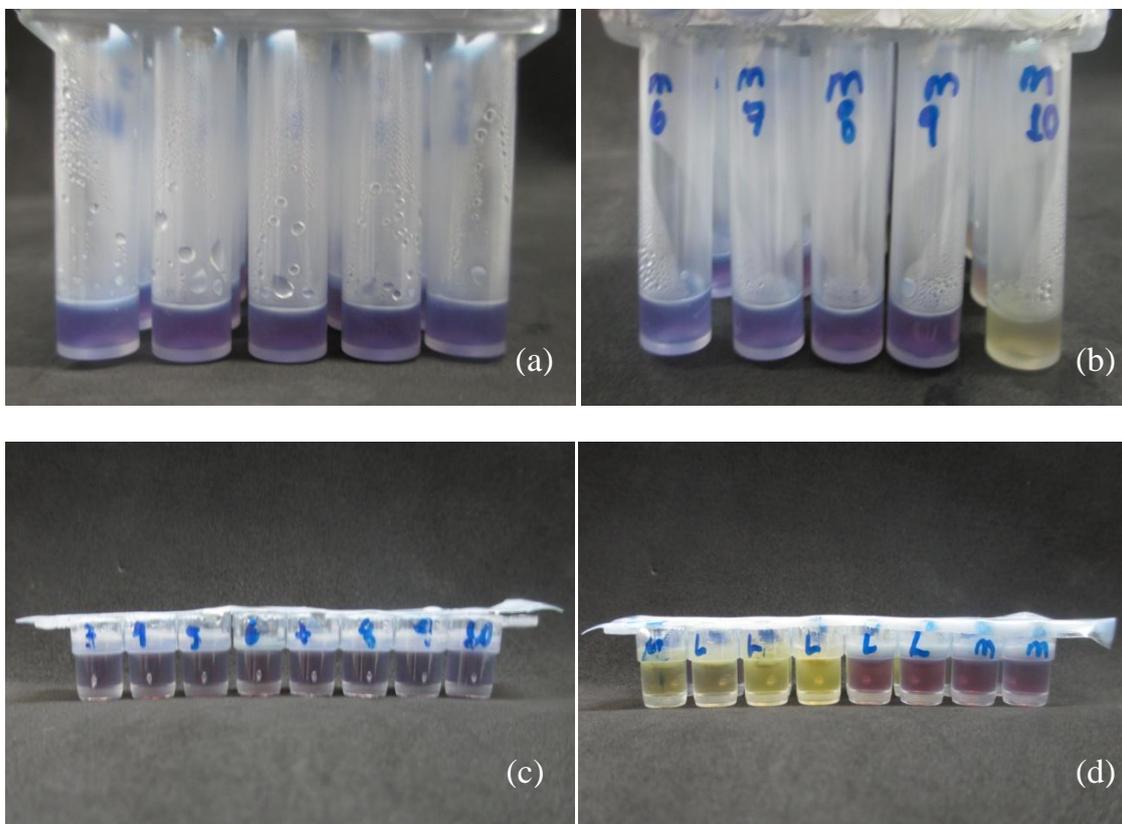


Teste Vermelho de metila (VM): resultado negativo à esquerda e resultado positivo à direita.



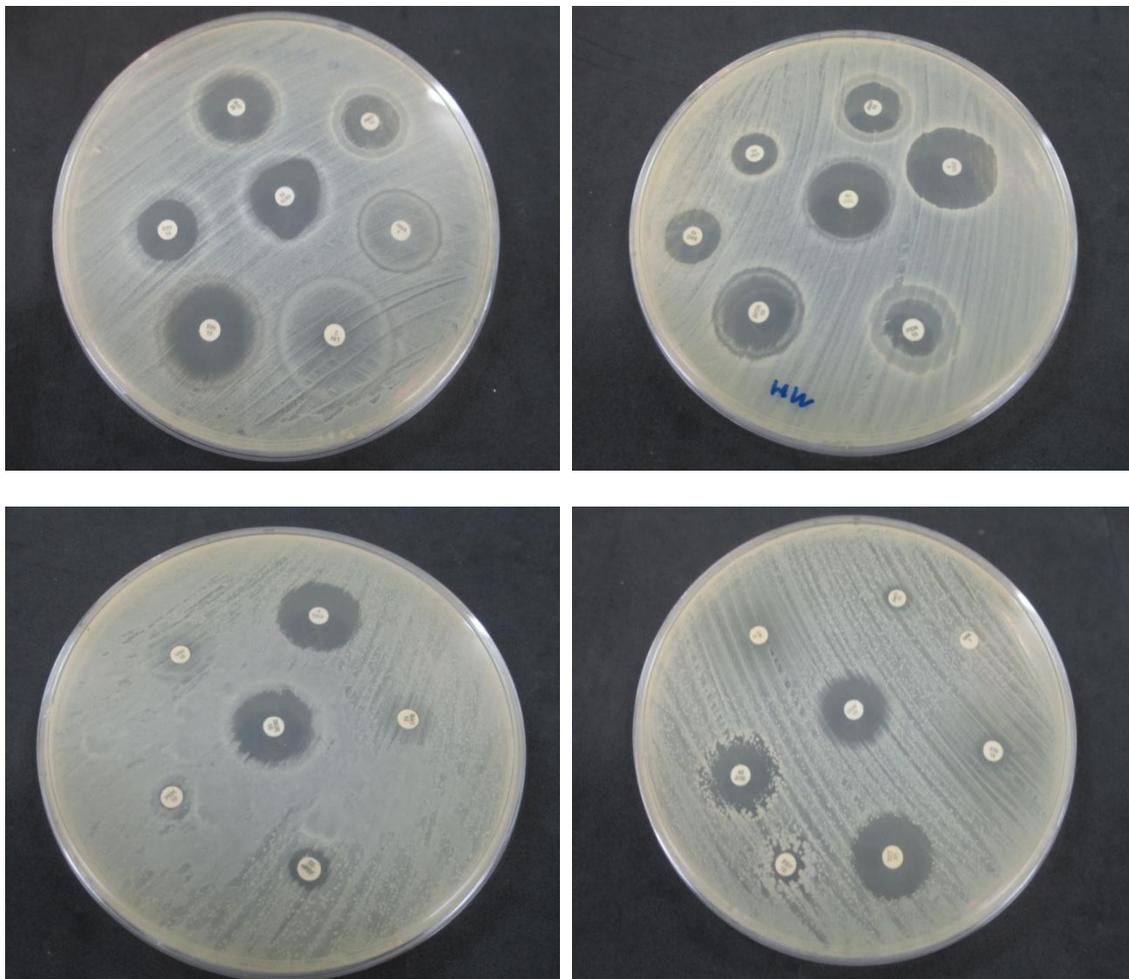
Teste Citrato de Simmons: resultado positivo para *E. coli* (à esquerda) sem mudança de coloração do meio; resultado negativo para *E. coli* (à direita) representada pela mudança de cor.

APÊNDICE F – Testes para detecção de antimicrobianos em amostras de leite de laticínios da microrregião de Imperatriz, MA.



Resultados positivos (recipientes em azul-púrpura sem alteração da cor) indicando inibição do crescimento microbiano e amostras negativas (alteração da cor azul-púrpura para amarelo-esverdeado) obtidas por meio dos *Kits Delvotest® SP-NT* (a e b) e *Eclipse 50 Cap-Lab®* (c e d).

APÊNDICE G – Testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de cepas bacterianas isoladas de amostras de leite cru refrigerado dos laticínios estudados.



Antibiograma das cepas bacterianas pelo Método de difusão em discos em Ágar Muller-Hinton demonstrando halos de inibição.