UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INDICADORES DE QUALIDADE, PESQUISA DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA E MULTIRRESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM ESTIRPES DE *Staphylococcus* spp EM LEITE DE ORIGEM BOVINA PRODUZIDO NO SISTEMA ORGÂNICO

AMANDA KELLER SIQUEIRA

Botucatu – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INDICADORES DE QUALIDADE, PESQUISA DE MARCADORES DE VIRULÊNCIA E MULTIRRESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM ESTIRPES DE *Staphylococcus* spp. EM LEITE DE ORIGEM BOVINA PRODUZIDO NO SISTEMA ORGÂNICO

AMANDA KELLER SIQUEIRA

Tese apresentada junto ao

Programa de Pós Graduação

em Medicina Veterinária

para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Botucatu – SP

2011

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago – CRB 8/4716*

Siqueira, Amanda Keller.
Indicadores de qualidade, pesquisa de marcadores de virulência e multirresistência aos antimicrobianos em estirpes de *Staphylococcus* spp. em leite de origem bovina produzido no sistema orgânico / Amanda Keller Siqueira. - Botucatu, 2011

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011
Orientador: Márcio Garcia Ribeiro
Co-orientador: Domingos da Silva Leite
Capes: 50502000

1. Bovino de leite. 2. Leite - Qualidade.

Palavras-chave: Bovinos; Coliformes; ECP; ECN; Enterotoxinas; Leite orgânico; Qualidade do leite; Resistência

Nome do autor: Amanda Keller Siqueira

Título: Indicadores de qualidade, pesquisa de marcadores de virulência e multirresistência aos antimicrobianos em estirpes de *Staphylococcus* spp. em leite de origem bovina produzido no sistema orgânico.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Assistente Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
Membro Titular
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Profa. Assistente Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Membro Titular
Departamento de Microbiologia e Imunologia
IB - UNESP - Botucatu/SP

Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles
Membro Titular
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública
FMVZ – USP – São Paulo/SP

Profa. Titular Elizabeth Oliveira da Costa Freitas Guimarães
Membro Titular
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
FMVZ - USP – São Paulo/SP

Data da Defesa: 27 de maio de 2011

Dedicatória

Aos meus pais, ARMANDO E VANILDA, pelo amor, confiança e força.

Ao meu irmão, JUNIOR, pelo incentivo e apoio.

Dedico.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

"Mesmo que já tenhas feito uma longa caminhada, há sempre um caminho a fazer". Santo Agostinho

Ao Prof. Márcio Garcia Ribeiro, obrigada pela orientação, oportunidade, confiança e ensinamentos. Agradecimentos a toda sua família pela compreensão dos anseios dos "filhos" postiços.

Ao Prof. Domingos da Silva Leite, por sua co-orientação e confiança. Que Deus permita uma futura "supervisão".

Ao Prof. Antonio Carlos Paes pela inestimável amizade, pelas oportunidades e por grandes ensinamentos nesses nove anos de convívio.

A Profa. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha meus agradecimentos por permitir o desenvolvimento de toda parte molecular do projeto, me conceder estágio de docência, auxiliar na elaboração das técnicas utilizadas, abrir as portas de seu laboratório.

Ao professor Aristeu Vieira da Silva por toda estatística e assistência.

A toda família pelo apoio e compreensão, principalmente quanto as ausências.

Ao meu namorado Paulo, pela ajuda, grande paciência e por estar ao meu lado em diversos momentos.

A minha grande amiga Tatiana Salerno, companheira de pesquisa, coleta, momentos bons e ruins, o meu muito obrigada por tudo. Andamos meio sei lá, mas acho que ser amigo também é assim.

Gustavo Lara, amigo e companheiro de equipe, Larissa Condas, loira do quarteto, Martinha e aos novos "irmãos", filhos do mesmo "pai", Thiago e Thaís, vocês vão fazer falta no meu dia-a-dia.

Galera do CVB, especialmente Denise, obrigada pela compreensão e apoio.

Para aquele que me deu toda a base da microbiologia, obrigada. Fernando Listoni pode deixar, sempre vou ser grata ao que aprendi em nove anos de bancada ao seu lado.

Aos novos amigos e grandes colaboradores deste projeto Valéria, Carlos e Danilo, meu muito obrigada.

A todos os amigos do Edifício “Jambalaia”, Lívia e Anderson, Mayra, Ana, Elton, Lucas, Fábio, Denis, Renata, Giovana...

Aos grandes amigos feitos durante esses anos, alguns com saudade, Juliana, Liguito, Béia, Kity, Lili, Acácia, André, Nair, Rô, Van, Vitória, Jana, Marília, Shima, Pri, João, Diego, Felipe, Ana, Selene, Simone, Leila, Dulce, Juliana Giantomassi.. e tantos outros que talvez tenha esquecido.

Ao técnico da Microbiologia Luis, brigadão.

Aos professores Hélio Langoni, Rafael Modolo, Paulo Domingues, e Jane Megid, obrigada pelo convívio e pela troca de conhecimento, tanto nas disciplinas ministradas, quanto nos estágios nos laboratórios do Departamento.

Sérgio, Wanderley, Tânia, Adriana Pavan, Nice e Sônia, como foi bom e divertido conviver com vocês.

Rodrigo Carreira, bebedor de leite de todas as vacas do Caipirinha, obrigada.

Obrigada a todos os colegas da pós graduação, residentes, alunos e funcionários do Departamento e aos que passaram pelo Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública.

Aos amigos da “equipe Borges” e seus respectivos, obrigada pelos momentos de diversão.

Aos funcionários da Pós Graduação, da Biblioteca e do ponto de apoio da Fapesp, obrigada por me auxiliarem, principalmente nos momentos de pânico!!!

A toda galera da faxina, obrigada por permitirem o bom funcionamento de tudo.

Aos funcionários e proprietários das propriedades envolvidas no projeto, obrigada por facilitarem e permitirem o desenvolvimento desta pesquisa.

A Fapesp pela concessão da bolsa de doutorado (2008/51040-4).

A todos aqueles, que por um lapso de memória, não citei, muito obrigada.

Epígrafe

EPÍGRAFE

"Sonhe com aquilo que você quiser. Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só tem uma chance de fazer aquilo que se quer. Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz. As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos. A felicidade aparece para aqueles que choram. Para aqueles que se machucam. Para aqueles que buscam e tentam sempre. E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas".

Clarisse Lispector

Resumo

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

RESUMO

O presente estudo investigou a qualidade microbiológica do leite de duas pequenas propriedades orgânicas (I e II) do estado de São Paulo, bem como a presença de marcadores de virulência de *Staphylococcus* spp. e isolados bacterianos multirresistentes aos antimicrobianos. Foram analisados os principais constituintes do leite, contagem bacteriana total, nível de celularidade, além da presença de resíduos de antimicrobianos, com base nas Normativas 051 e 064 do MAPA. O efeito das estações do ano sobre os parâmetros pesquisados também foi considerado. Foram realizadas 12 colheitas em cada uma das duas propriedades, das quais 12 mensais dos latões e quatro trimestrais de todos os animais. No total foram colhidas amostras de leite de 178 animais (259 tetos). Destes, 125/259 (48,27%) tetos acusaram mastite subclínica no CMT, 2/259 (0,77%) tetos mastite clínica e 132/259 (50,96%) foram negativos. A mediana da CCS das duas propriedades variou entre 311,67 x 1000 céls/mL e 447,83 x 1000 céls/mL e a CBT variou entre 25,4 x 1000 UFC/mL e 141,63 x 1000 UFC/mL, sem influência das estações do ano. Os principais constituintes do leite mantiveram-se dentro dos parâmetros estabelecidos. Das 86 amostras de leite da propriedade I, seis (6,97%) foram positivas para a presença de resíduos de antimicrobianos, enquanto das 173 amostras da propriedade II, 16 (9,24%) foram positivas. *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium bovis* foram os micro-organismos mais freqüentes, isolados em 58/259 (22,39%) e 50/259 (19,30%), respectivamente, de amostras de leite dos animais. Das 58 linhagens de *Staphylococcus* spp., 48 (82,76%) foram classificadas como coagulase positivas (ECPs) e 10 (17,24%) como coagulase negativas (ECNs). Para os ECPs, *S. intermedius* foi mais frequente (46,56%), seguido por *S. aureus* (22,42%). Dentre os ECNs, *S. warneri* foi caracterizado em 13,80% das linhagens. A sensibilidade das

linhagens de *Staphylococcus* spp. foi > 88% para ceftiofur, oxacilina e sulfametoxazole/trimetoprim. Penicilina G e ampicilina foram os antimicrobianos menos efetivos com índices de resistência superiores a 57%. O gene *mecA* foi detectado em 13,79% das linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas das duas propriedades. *sea* foi detectado em 19/58 (32,75%) linhagens, enquanto *seb* foi observado em 2/58 (3,44%) isolados. O gene codificador da enterotoxina C (*sec*) foi encontrado em 23/58 (39,65%) linhagens. O gene codificador para enterotoxina D (*sed*) foi observado em 2/58 (3,44%) isolados. Foi observado predomínio de animais com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp. nas propriedades estudadas, e aumento de CCS e CBT. As variações nos principais constituintes do leite podem ser reflexo de diferenças raciais, fase de lactação dos animais, idade, além de manejo, principalmente nutricional. A presença de resíduos está em desacordo com as normas preconizadas pela Normativa 064, que proíbe a presença de qualquer resíduo de antimicrobiano. O isolamento de linhagens de *Staphylococcus* resistentes aos antimicrobianos, contendo genes codificadores de resistência e para a produção de toxinas indicam risco em saúde pública do consumo de leite cru e derivados.

Palavras-chave: Leite orgânico; Bovinos; Qualidade do leite; ECP; ECN; Coliformes; Resistência; Enterotoxinas.

Abstract

SIQUEIRA, A.K. **Quality indicators, research of virulence markers and multidrug resistance in *Staphylococcus* spp. strains of bovine milk produced in the organic system.** Botucatu, 2011. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The present study investigated the microbiological quality of milk from two small organic properties (I and II) from São Paulo State, as well as the presence of virulence markers of *Staphylococcus* spp. and multidrug-resistant isolates to antimicrobials. We analyzed the major milk components, total bacterial count, level of cellularity and the presence of antimicrobial residues, based on Normative 051 and 064 MAPA, Brazil. The effect of seasons on the studied parameters was also considered. Twenty harvests were conducted in each of the two properties, including 12 monthly and four quarterly samples of all animals. In total we collected milk samples from 178 animals (259 mammary glands). Of these, 125/259 (48.27%) mammary glands showed subclinical mastitis on CMT, 2/259 (0.77%) clinical mastitis and 132/259 (50.96%) had been negative. The median of SCC of the two properties varied between 311.67 x 1000 cells/mL and 447.83 x 1000 cells/mL and TBC showed between 25.4 x 1000 CFU/mL and 141.63 x 1000 CFU/mL, without influence of the seasons. The contents of the main milk components remained with the established standards. Of the 86 samples of milk from the property I, six (6.97%) were positive for the presence of antimicrobial residues, while from 173 samples of property II, 16 (9.24%) were positive. *Staphylococcus* spp. and *Corynebacterium bovis* were the most frequent microorganisms isolated in 58/259 (22.39%) and 50/259 (19.30%), respectively, in the milk samples of animals. Of the 58 strains of *Staphylococcus* spp., 48 (82.76%) were classified as coagulase positive (CPS) and 10 (17.24%) as coagulase negative (CNS). For the CPS, *S. intermedius* was more frequent (46.56%), followed by *S. aureus* (22.42%). Among the CNS, *S. warneri* was characterized in 13.80% of the strains. The sensitivity of *Staphylococcus* spp. strains was > 88% for ceftiofur, oxacillin and trimethoprim/sulfamethoxazole. Penicillin G and ampicillin

were the less effective with antimicrobial resistance rates of isolates above 57%. The *mecA* gene was detected in 13.79% of *Staphylococcus* spp. isolated from the two properties. *sea* was detected in 19/58 (32.75%) strains, while *seb* was observed on 2/58 (3.44%) isolates. The gene encoding enterotoxin C (*sec*) was observed in 23/58 (39.65%) strains, and the gene encoding enterotoxin D (*sed*) was detected in 2/58 (3.44%) isolates. It was observed a predominance of animals with subclinical mastitis by *Staphylococcus* spp. in the properties studied, and increased of SCC and TBC. The variation of the main components of milk may reflect racial differences, stage of lactation, age, and management, especially nutrition. The presence of residues is in disagreement with the Brazilian Normative 064, prohibiting the presence of any antimicrobial residues. The isolation of *Staphylococcus* strains resistant to antimicrobial agents, containing genes for resistance and production of toxins indicate public health risk of consuming raw milk and derivatives.

Keywords: Organic Milk; Cattle; Milk quality; CPS; CNS; Coliforms; Resistance; Enterotoxins.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Salas de ordenha das vacas das propriedades I e II com manejo em sistema orgânico de produção. A. Propriedade I. B. Propriedade II. Botucatu, SP, 2011. p.45

Figura 2 Eletroforese em gel de agarose 2% para visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa dos genes da subunidade 16S rRNA em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas do leite de propriedades orgânicas localizadas no interior do estado de São Paulo. 1-8: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 9: amostra negativa; 10: controle positivo. 11: controle negativo; 12: 100 pb DNA ladder. Botucatu, 2011. p.53

Figura 3 Mediana e percentis 25 e 75 dos valores de contagem de células somáticas (x1000/mL) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011. p.62

Figura 4 Mediana e percentis 25 e 75 dos valores de CBT (x1000 UFC/mL) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011. p.62

Figura 5 Média e desvio-padrão dos valores de gordura (%) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011. p.63

Figura 6 Média e desvio-padrão dos valores de proteína (%) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011. p.64

Figura 7 Média e desvio-padrão dos valores de lactose (%) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, p.64

segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011.

Figura 8 Média e desvio-padrão dos valores de sólidos totais (%) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011. p.65

Figura 9 Média e desvio-padrão dos valores de extrato seco desengordurado (%) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011. p.65

Figura 10 Média dos valores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST) e extrato seco desengordurado (ESD), em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011. p.66

Figura 11 Perfil de sensibilidade microbiana, na prova de difusão com discos, em estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas criadas em sistema orgânico, provenientes de duas propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011. p.78

Figura 12 Pesquisa fenotípica da presença de resistência à meticilina em linhagem de ECP isolada de vaca em produção orgânica, utilizando o método de difusão com discos em ágar e fitas de oxacilina (0,015 – 256 µg/mL). Botucatu, SP, 2011. p.79

Figura 13 Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *mecA* em linhagens de ECNs isoladas de propriedades orgânicas localizadas no interior do estado de São Paulo. 1-17: linhagens de ECNs; 18: controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591); 19: negativo (*S. aureus* ATCC 25923); 20: 100 pb DNA ladder. Botucatu, 2011. p.83

Figura 14 Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *sea* em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de propriedades orgânicas localizadas no interior do estado de São Paulo. 1-17: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 18: controle positivo (ATCC 13565); 19: controle negativo (Água MilliQ esterilizada); 20: 100 pb DNA ladder. Botucatu, 2011. p.84

Figura 15 Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *sec* em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de propriedades orgânicas localizadas no interior do estado de São Paulo. 1-17: linhagens de *Staphylococcus* spp; 18: controle positivo (ATCC 19095); 19: controle negativo (Água MilliQ esterilizada); 20: 100 pb DNA ladder. Botucatu, 2011. p.84

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Mês das colheitas, número de vacas em lactação, número de tetos amostrados, tetos com mastite clínica ou subclínica, tetos negativos (controle) e número de latões de duas propriedades certificadas como orgânicas do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011. p.58

Quadro 2 Resultado trimestral dos valores de CCS e dos principais constituintes de leite orgânico colhido de vacas em lactação de duas propriedade rurais do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011. p.59

Quadro 3 Resultado mensal dos valores de CCS, CBT e dos principais constituintes de leite orgânico de vacas colhido dos latões de duas propriedades rurais do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011. p.60

Quadro 4 Micro-organismos de origem bacteriana isolados do leite de vacas e de latões obtidas de duas propriedades orgânicas do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011. p.68

Quadro 5 Distribuição das espécies de ECPs e ECNs identificadas no leite de vacas de duas propriedades em sistema orgânico de produção. Botucatu, SP, 2011. p.69

Quadro 6 Distribuição das espécies de ECPs e ECNs isoladas de vacas, com e sem mastite, segundo o quarto mamário avaliado em criatórios com sistema de produção de leite orgânico. Botucatu, SP, 2011. p.70

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Iniciadores utilizados para detecção de genes codificadores de toxinas em linhagens de *Staphylococus* spp. isoladas de leite orgânico, utilizando PCR. Botucatu, SP, 2011. p.55

Tabela 2 Mediana e percentis 25 e 75 dos valores de contagem de células somáticas (x10^3/mL) e de contagem bacteriana total (x1000 UFC/mL) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011. p.61

Tabela 3 Média e desvio-padrão dos valores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST) e extrato seco desengordurado (ESD), em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011. p.63

Tabela 4 Número de amostras, média e desvio-padrão dos constituintes lácteos em duas propriedades de leite orgânico, segundo diagnóstico da mastite subclínica pelo método do CMT. Botucatu, SP, 2011. p.67

Tabela 5 Número de amostras, mediana, valores máximo e mínimo, e percentis 25 e 75 dos valores de contagem de células somáticas (x1000/mL) em duas propriedades de leite orgânico, segundo o resultado do exame microbiológico, em animais com CMT negativo. Botucatu, SP, 2011. p.71

Tabela 6 Número de amostras, mediana, valores máximo e mínimo, e percentis 25 e 75 dos valores de contagem de células somáticas (x1000/mL) em duas propriedades de leite orgânico, segundo o resultado do exame microbiológico, em animais com CMT positivo. Botucatu, SP, 2011. p.72

Tabela 7 Número de amostras, mediana, valores máximo e mínimo, e percentis 25 e 75 dos valores de contagem de células somáticas (x1000/mL) em duas propriedades de leite orgânico, segundo o resultado do California Mastitis Test (CMT), em animais com exame microbiológico negativo. Botucatu, SP, 2011. p.73

Tabela 8 Número de amostras, mediana, valores máximo e mínimo, e percentis 25 e 75 dos valores de contagem de células somáticas (x1000/mL) em duas propriedades de leite orgânico, segundo o resultado do California Mastitis Test (CMT), em animais com exame microbiológico positivo. Botucatu, SP, 2011. p.73

Tabela 9 Número de amostras, média e desvio-padrão dos constituintes lácteos em duas propriedades de leite orgânico, segundo o isolamento de *Staphylococcus* coagulase positivo (ECP). Botucatu, SP, 2011. p.74

Tabela 10 Número de amostras, média e desvio-padrão dos constituintes lácteos em duas propriedades de leite orgânico, segundo o isolamento de *Staphylococcus* coagulase negativo (ECN). Botucatu, SP, 2011. p.75

Tabela 11 Perfil de sensibilidade microbiana, na prova de difusão com discos, em estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas criadas em sistema orgânico, provenientes de duas propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011. p.77

Tabela 12 Gene de resistência e marcadores de virulência investigados em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de vacas criadas em sistema orgânico de produção. Botucatu, SP, 2011. p.82

Associações entre diferentes genes de enterotoxinas e p.83

Tabela 13 resistência à oxacilina (mecA) investigados em 58 linhagens de *Staphylococcus* spp. Isolados do leite de vacas em duas propriedades de leite orgânico. Botucatu, SP, 2011.

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... p.21

2. REVISÃO DE LITERATURA E JUSTIFICATIVAS..... p.24

2.1 Leite orgânico..... p.24

2.2 Mastite..... p.25

2.3 Micro-organismos causadores de mastites..... p.27

2.3.1 Mastite pelo gênero *Staphylococcus,* resistência aos antimicrobianos e produção de toxinas..... p.27

2.3.2 Mastite pelo gênero *Escherichia coli* e fatores de virulência..... p.31

2.4 Indicadores de qualidade do leite..... p.35

2.4.1 Contagem de Células Somáticas..... p.36

2.4.2 Contagem Bacteriana Total..... p.37

2.4.3 Resíduos de antimicrobianos..... p.37

2.4.4 Constituintes do leite..... p.39

3. OBJETIVOS..... p.42

3.1 Geral..... p.42

3.2 Específicos..... p.42

4. MATERIAL E MÉTODOS..... p.44

4.1 Propriedades rurais em sistema orgânico de produção..... p.44

4.1.1 Propriedade rural I..... p.44

4.1.2 Propriedade rural II..... p.44

4.2 Colheita de material..... p.45

4.2.1 Latões..... p.45

4.2.2 Animais..... p.45

4.3 Diagnóstico das mastites..... p.46

4.4 Análise dos constituintes do leite..... p.46

4.5 Contagem de Células Somáticas (CCS)..... p.46

4.6 Contagem Bacteriana Total (CBT)..... p.47

4.7 Efeito das estações do ano..... p.47

4.8 Avaliação da presença de substâncias inibidoras no leite..... p.48

4.9 Isolamento e caracterização dos micro-organismos..... p.48

4.9.1 Identificação de ECP e ECN..... p.49

4.9.2 Identificação de enterobactérias..... p.50

4.10 Perfil de sensibilidade microbiana e detecção de linhagens multirresistentes..... p.50

4.11 Teste de difusão com discos para detecção de linhagens de *Staphylococcus* meticilna-resistentes (MRS)..... p.50

4.12 Concentração Inibitória Mínima (CIM) para detecção de MRS..... p.51

4.13 Pesquisa de fatores de virulência e gene de resistência..... p.51

4.13.1 Detecção de hemolisinas no meio de ágar sangue..... p.51

4.13.2 Detecção genotípica de linhagens MRS e/ou produtoras de toxinas..... p.52

4.13.2.1 Extração do DNA..... p.52

4.13.2.1.1 Validação da extração do DNA..... p.52

4.13.2.2 Amplificação do DNA (PCR) para detecção do gene *mecA* de resistência à meticilina/oxacilina em *Staphylococcus* spp..... p.53

4.13.2.3 Amplificação do DNA (PCR) para detecção dos genes de enterotoxinas (A, B, C e D) e da toxina 1 da síndrome do choque tóxico em *Staphylococcus* spp. p.54

4.13.2.4 Eletroforese em gel de agarose..... p.55

4.14 Análise estatística..... p.55

5. RESULTADOS..... p.57

5.1 CCS, CBT e constituintes do leite..... p.57

5.2 Influência das estações do ano..... p.61

5.3 Pesquisa de substâncias inibidoras/resíduos..... p.67

5.4 Cultivo microbiano..... p.68

5.5 Identificação de ECP e ECN..... p.68

5.6 Perfil de sensibilidade microbiana e detecção de linhagens multirresistentes..... p.75

5.7 Teste de difusão com discos e CIM para detecção fenotípica de linhagens MRS..... p.76

5.8 Detecção de hemolisinas..... p.79

5.9 Detecção de gene de resistência e fatores de virulência..... p.79

6. DISCUSSÃO..... p.85

7. CONCLUSÕES..... p.102

8. REFERÊNCIAS..... p.104

9. TRABALHO CIENTÍFICO..... p.133

9.1 Normas da Revista Arquivos do Instituto Biológico..... p.133

9.2 Comprovante de submissão..... p.138

9.3 Artigo..... p.139

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Para as diferentes espécies de mamíferos, inclusive os humanos, o leite é o primeiro alimento consumido após o nascimento, se constituindo em fonte natural de proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais (Fonseca e Santos, 2000).

Registros históricos, como pinturas rupestres, ilustram que o leite é consumido há mais de 10 mil anos. O primeiro fato concreto de sua utilização como alimento é o desenho encontrado em Tell Ubaid, atual Iraque, datado de 3.100 a.C., onde são retratadas de forma primitiva a ordenha e a filtragem do leite (Pratiqueleite, 2008).

A exploração leiteira é praticada em todo território nacional. O leite e seus derivados possuem alto impacto no setor de agronegócios, representando fonte geradora de renda, tributos e empregos (Gomes, 2001).

No Brasil, a produção e o consumo de leite e derivados vêm crescendo exponencialmente, fato verificado pela mudança ocorrida na balança comercial láctea em 2004, na qual o país assumiu a posição de exportador de leite (Ponchio et al., 2005). Simultaneamente, aumenta a necessidade de maior rendimento industrial e, principalmente, o nível de exigência dos consumidores em relação à segurança e a qualidade do leite e seus derivados. Dados fornecidos pela FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação) revelaram que em 2006 o Brasil ocupava a sexta posição mundial na produção leiteira, superado somente por EUA, Índia, China, Rússia e Alemanha. No ano de 2004, foram produzidos 515,8 bilhões de litros de leite em todo mundo, dos quais 70% na Europa e Américas (Zoccal, 2004).

Em 2005 foram produzidos cerca de 24 bilhões de litros de leite no Brasil. A região Sudeste ocupou o primeiro lugar, que correspondeu a 9,7 bilhões de litros de leite, aproximadamente 38% da produção nacional (IBGE, 2006). Nos últimos 25 anos, a produção nacional de leite aumentou 119%, passando de 10,2 bilhões de litros em 1979 para 22,3 bilhões em 2003 (Brasil, 2005). Em 2006 foram produzidos 25 bilhões de litros, e já em 2009 o país produziu ao redor de 29 bilhões de litros de leite. No entanto, em 2011, o Brasil perdeu a condição de exportador visto que atender a demanda interna de produtos lácteos tornou-se mais vantajoso (MilkPoint, 2011)

Neste cenário, cresce também a procura por produtos e subprodutos de origem animal produzidos no sistema orgânico. Sugere-se que o Brasil pode se tornar o maior exportador de produtos orgânicos do mundo (Campiolo e Silva, 2006; Polidoro, 2006), pois existem cerca de 90 milhões de hectares agriculturáveis, além de propriedades convencionais que migram para orgânicas de maneira acentuada (Fonseca, 2008). Estudos da Federação Internacional dos Movimentos de Agricultura Orgânica (IFOAM) demonstraram que, em 2006, o Brasil possuía 887.637 hectares destinados à produção de orgânicos. Os principais estados são Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo, com cerca de 15.000 produtores orgânicos certificados, 90% dos quais considerados de pequeno porte ou de exploração da propriedade tipo familiar (Brasil, 2007).

Em contraste, o setor brasileiro de produção leiteira apresenta deficiências nas características de produção e na qualidade da matéria-prima, acarretando em perda de competitividade quando comparado com outros países produtores (Magalhães et al., 2004). O leite cru ou leite “in natura” apresenta no Brasil, em geral, altas contagens de micro-organismos mesófilos e coliformes, que indicam os níveis de contaminação no momento da coleta, além da contaminação ambiental sofrida em decorrência de deficiências de higiene na produção (Santos, 2003). A consequente má qualidade dos leites pasteurizados e esterilizados, assim como de derivados lácteos, reflexo da deficiência higiênico-sanitária do manejo e da ordenha, também ocorre por altas taxas de mastite, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos de ordenha, refrigeração ineficiente ou inexistente e mão de obra desqualificada (Santos, 2003; Teixeira et al., 2003).

Diferentes fatores da criação dos animais influenciam a produção e a composição do leite, tais como condições de ordenha, raça, manejo, alimentação, estágio da lactação, idade, temperatura ambiental, estações do ano, persistência da lactação, intervalo entre ordenhas e, principalmente, infecções na glândula mamária. Seguindo a tendência mundial, o Brasil adotou o sistema de pagamento por qualidade do leite, notadamente para teores mais elevados de gordura e proteína. A análise individual do leite é fundamental para o monitoramento de qualidade e identificação de infecções mamárias, assim

como para a adoção de ações de controle e profilaxia das mastites (Reis et al., 2007).

Os prejuízos da indústria leiteira com as mastites são gerados por alterações físico-químicas e microbiológicas do leite com alta CCS, que acarretam baixo rendimento industrial de derivados e diminuição da qualidade do produto final, com redução do prazo de validade nas prateleiras (Langoni, 2000).

Nos EUA, estima-se prejuízo de aproximadamente 1,8 bilhões de dólares ao ano em decorrência da mastite (NMC, 1996). No Brasil, os índices de ocorrência de mastite subclínica chegam a 72% e 17,5% de mastite clínica (Costa et al., 1995a,b), gerando estimativas de perda de produção entre 12% e 15%, correspondendo a 2,8 bilhões de litros anuais em relação aos 20 bilhões de litros de leite produzidos ao ano (Fonseca e Santos, 2000). Arashiro et al. (2008) relataram que em 2005 o Brasil teve um prejuízo estimado em 1,2 bilhões de litros decorrentes da mastite.

A mastite em vacas é causada principalmente por agentes contagiosos, com destaque para o gênero *Staphylococcus*. Este grupo de micro-organismos é responsável por altas taxas de infecção subclínica nos rebanhos, redução nos índices produtivos, elevação da celularidade, depreciação dos constituintes do leite e baixos índices de cura nos tratamentos na lactação (Radostits et al., 2007). Ademais produzem diferentes toxinas relacionadas a quadros de toxi-infecções em humanos (Bueris et al., 2005).

Apesar do crescimento da procura pelo leite orgânico no Brasil, são pontuais os estudos preocupados em investigar os indicadores de qualidade do leite orgânico no país, bem como os principais fatores de virulência dos patógenos relacionados a infecção mamária de vacas mantidas em produção orgânica.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA E JUSTIFICATIVAS

2.1 Leite orgânico

A produção de leite orgânico nacional é baixa. Estima–se que o Brasil produza somente cerca de seis milhões de litros/ano (Pivaro, 2005). Assume–se que para atender à demanda brasileira seria necessário a produção de 600 milhões de litros/ano. A título de comparação, na Dinamarca o leite orgânico representa em torno de 20% do consumo nacional (Arve, 1999). Cerca de uma dezena de produtores de leite e laticínios são certificados na região Sudeste. Somente três propriedades produzem “leite orgânico” atendendo rigorosamente às exigências impostas a esta modalidade de produção no estado de São Paulo (ECOCERT, 2011; IBD, 2011). Segundo Mittiman (2002), o mercado de leite orgânico no Brasil vem crescendo 30% ao ano. No entanto, o leite orgânico pode ser considerado um produto raro, com produção insignificante em relação ao leite convencional.

Para viabilizar a inserção do Brasil no mercado internacional de produtos orgânicos, normalizar e garantir a qualidade dos produtos também no mercado interno, em 17 de maio de 1999 foi criada a Instrução Normativa 007 (IN 007) com o intuito de estabelecer normas de produção, tipificação, processamento, envase, distribuição, identificação e qualidade para os produtos orgânicos de origem animal e vegetal (Brasil, 1999).

Em 18 de dezembro de 2008, o MAPA sancionou a IN 064 e aprovou o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, além das Listas de Substâncias Permitidas para Uso nos Sistemas Orgânicos e o Regulamento Técnico sobre o Extrativismo Sustentável Orgânico, revogando a IN 007. Desta forma, a produção orgânica nacional passa a ter critérios para a exploração da propriedade rural até o ponto de venda, dando grande impulso ao setor, uma vez que a regulamentação e a criação de um sistema de avaliação propiciam mais garantias aos consumidores e aumentam a credibilidade do produto (Brasil 2008).

Diversas razões são apontadas em anos recentes para o aumento da procura de produtos orgânicos, incluindo a preocupação com o meio ambiente, com o uso de pesticidas, os sistemas de criação que atendem às exigências de bem-estar animal, ou a percepção de que os alimentos orgânicos

são seguros e mais nutritivos quando comparados com alimentos produzidos no sistema convencional. Muitos segmentos da população têm despertado maior interesse na saúde, o que aumenta a demanda por alimentos mais “naturais” e com menor intervenção humana na cadeia produtiva (Ormond et al., 2002; Castro et al., 2008). Com efeito, a agropecuária orgânica se apresenta como um novo modelo de produção de leite e derivados, rentável e sustentável, particularmente para pequenos proprietários (Feliconio, 2008).

O termo orgânico é utilizado para descrever alimentos produzidos sem o uso de fertilizantes artificiais ou pesticidas, em sistemas de rotatividade de culturas e pastagens. Também há ênfase para a criação animal com o uso mínimo de medicamentos veterinários convencionais. Desta forma, os sistemas orgânicos de produção geram alimentos mais seguros pelo uso de práticas de manejo isentas da utilização de insumos químicos, minimizando danos ao meio ambiente e a vida animal (Williamson, 2007). Ademais, considera-se sistema orgânico de produção agropecuária e industrial, todo aquele que se adota tecnologias que otimizem o uso de recursos naturais e sócio-econômicos, respeitando a integridade cultural e tendo por objetivos a auto-sustentação no tempo e no espaço, a maximização dos benefícios sociais e a minimização da dependência de energias não renováveis, privilegiando a preservação da saúde ambiental e o bem-estar animal e humano (Brasil, 1999).

2.2 Mastite

O leite de qualidade deve possuir três atributos: qualidade higiênica, valor nutritivo e manutenção das propriedades organolépticas. A saúde e o manejo do rebanho são fundamentais para a qualidade do leite produzido, nos quais os procedimentos higiênicos adotados na produção e no armazenamento do leite nas propriedades rurais são pontos cruciais (Brito, 2008).

Os problemas relacionados à saúde da glândula mamária dos animais favorecem a presença e permanência de micro-organismos e/ou suas toxinas, resíduos químicos (antimicrobianos, inseticidas), além de causarem inflamação, aumentando as contagens de células somáticas, enzimas, proteínas séricas, provocando alterações físico-químicas, organolépticas e nutricionais do leite. A falta de higiene no manejo e problemas na temperatura

e tempo de estocagem predispõem a contaminação e multiplicação de micro-organismos (Brito, 2008).

A mastite, resposta inflamatória da glândula mamária causada principalmente por bactérias, é provavelmente a doença infecciosa mais onerosa para a produção leiteira (Costa et al., 1995a; Quinn et al., 2005; Ribeiro, 2008), tanto convencional como orgânica. Esta afecção gera impacto negativo na produção animal, no bem-estar animal e na qualidade do leite produzido (Hillerton e Berry, 2005; Holanda Júnior et al., 2005), pois ocorrem lesões nas células secretoras, diminuindo a produção.

Aproximadamente 140 micro-organismos, entre espécies, subespécies e sorovares são reportados na gênese das mastites. Estas infecções são classificadas como contagiosas ou ambientais de acordo com o micro-organismo envolvido, epidemiologia e patofisiologia (Fonseca e Santos, 2000; Radostits et al., 2007).

A própria glândula mamária é o reservatório para os agentes causadores das mastites contagiosas, principalmente dos gêneros *Staphylococcus, Streptococcus* e *Corynebacterium bovis*. Em contraste, os ambientais são representados pelas enterobactérias, fungos, algas e certos actinomicetos, veiculados para a glândula mamária do solo, fezes, água e cama dos animais (Costa et al., 1995a; Radostits et al., 2007; Ribeiro, 2008).

Fatores de manejo, nutricionais, de produção e genética dos animais podem influenciar na ocorrência da mastite (Fonseca e Santos, 2000). A relação entre a ocorrência das mastites e as estações do ano é variável, dentre outros fatores, como clima e geografia. Em regiões tropicais e subtropicais a freqüência pode ser maior durante partos na primavera ou inverno em virtude do aumento da umidade. Já nos climas temperados, a ocorrência aumenta no outono e primavera quando os partos ocorrem nos estábulos, favorecendo o contato com os micro-organismos no ambiente dos animais (Radostits et al., 2007).

2.3 Micro-organismos causadores de mastites

2.3.1 Mastite pelo gênero *Staphylococcus*, resistência aos antimicrobianos e produção de toxinas

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) destaca-se como o micro-organismo mais freqüentemente isolado de casos de mastites contagiosas em rebanhos leiteiros de todas as partes do mundo. As infecções por esta espécie são consideradas de difícil tratamento devido à elevada resistência da bactéria aos antimicrobianos (Zecconi e Hahn, 2000; Aarestrup et al., 2001; Sears e McCarthy, 2003; Fagundes e Oliveira, 2004; Sá et al., 2004; Freitas et al., 2005; Coelho et al., 2007; Nader Filho et al., 2007b). Em humanos, possui como habitat pele e mucosas, e pode ser isolado em cerca de 50% das narinas de indivíduos sadios (Duquette e Nuttall, 2004).

Estafilococos coagulase-negativos (ECNs) são considerados contagiosos ou oportunistas (Radostits et al., 2007). Estudos em diferentes países demonstram o envolvimento destes agentes em aproximadamente 50% dos casos da mastite bovina. Este grupo de micro-organismos possui alta capacidade de invadir os tecidos mamários, de formar microabcessos, resistem à fagocitose e mantêm-se viáveis no interior de fagócitos (Brabes et al., 1999). Neste contexto, o controle da mastite é fundamental dentro do sistema de produção leiteira.

Os produtores buscam tecnologias que tornem as propriedades leiteiras mais eficientes, gerando produtos de alta qualidade, com baixo custo e maior rendimento industrial. Paradoxalmente, incluem no dia-a-dia o uso de produtos que garantam saúde e maior produção animal, como os antimicrobianos. No entanto, o uso indiscriminado de antimicrobianos em humanos e animais desde a II Guerra Mundial, tem aumentado a pressão seletiva para linhagens de micro-organismos resistentes, além dos riscos da presença de resíduos no leite e seus derivados (Arashiro et al., 2008).

A terapia da vaca seca é realizada ao final da lactação como medida profilática à mastite em vacas produtoras de leite. Este tratamento aumenta a seleção de bactérias com resistência múltipla (Hammerum e Heuer, 2009), aumentando os riscos aos humanos de infecção com bactérias multirresistentes pela ingestão de alimentos de origem animal ou contato estreito com animais (Guardabassi e Schwarts, 2004).

Os animais de produção e de companhia podem tornar-se reservatórios de micro-organismos resistentes. A disseminação pode ocorrer por contato direto (pele, saliva, fezes) ou indireto (alimentos, água) [Hammerum e Heuer, 2009]. Os genes de resistência podem ser encontrados em humanos e animais, caracterizando a disseminação horizontal (Linton et al., 1977).

Schultz et al. (2004) relataram a presença de 78,0% de ECN entre 202 bactérias isoladas de leite de vacas com mastite, 44,0% dos quais resistentes para mais de um antimicrobiano testado. Turutoglu et al. (2006) isolaram 239 linhagens de *Staphylococcus* de mastite bovina. Destas, 103 foram caracterizados como *S. aureus* e 136 como ECN. Ao redor de 62% das linhagens de ambos os grupos foram resistentes para a penicilina, 56% para ampicilina e 46% para amoxicilina. Moon et al. (2007b) encontraram acima de 65,0% de resistência para penicilina e ampicilina nas linhagens de *S. aureus* isoladas de mastite bovina. Resultados semelhantes foram observados na Hungria, pois 88,90% dos isolados de *S. aureus* de leite bovino foram resistentes para penicilina (Peles et al., 2007). Em grande levantamento realizado por Hendriksen et al. (2008), com cerca de 25.000 isolados bacterianos obtidos de 13 países europeus, entre 621 e 1321 *S. aureus* recuperados revelaram taxas de resistência para a penicilina variando entre 3,0% e 49,0%.

No Brasil, em propriedades leiteiras de sistema convencional de criação, Dantas et al. (2006) encontraram 68,8% de isolados do gênero *Staphylococcus* resistentes para penicilina G e 94,8% sensíveis para oxacilina. Coelho et al. (2007) encontraram 67,7% e 64,4%, respectivamente, de estafilococos resistentes para penicilina G e ampicilina. Nader Filho et al. (2007b) observaram 97,2% de resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. para penicilina G e 95,8% para ampicilina, enquanto 84,7% das linhagens foram sensíveis para oxacilina. Em estudo similar, Neves et al. (2010) encontraram 96% dos *S. aureus* isolados de tetos de vacas resistentes para a penicilina.

Em propriedades convencionais da região Nordeste, Medeiros et al. (2009) encontraram 62,19% de multirresistência para dois ou mais antimicrobianos testados em 291 isolados de *Staphylococcus*. Ampicilina foi o

antimicrobiano menos efetivo frente aos isolados, com resistência variando entre 56,5% e 72,8%, de acordo com a região amostrada.

Mesmo com variações no número de isolados resistentes, a baixa efetividade de penicilina e ampicilina frente aos *Staphylococcus* sp. isolados é notória em diversos países, inclusive no Brasil. Destaca-se também a importância da resistência aos antimicrobianos de ECN envolvidos na gênese de processos infecciosos da glândula mamária de vacas.

A resistência aos antimicrobianos, principalmente a meticilina, é problema emergente de proporções globais. Este fármaco foi introduzido na rotina médica em 1959, representando um passo importante no tratamento das infecções estafilocócicas (Martins e Cunha, 2007).

O primeiro relato de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) data de 1961(Fitzgerald et al., 2001). A resistência a meticilina é codificada pelo gene *mecA*, localizado em uma ilha de patogenicidade denominada “Staphylococcal Cassette Chromosome” (SCC*mec*), elemento genético móvel que pode ser transmitido entre diferentes espécies de estafilococos (Mandell et al., 2005; Rozgonyi et al., 2007). O gene *mecA* codifica uma proteína ligadora de penicilina alternativa - PBP (PBP’2 ou PBP2a) com baixa afinidade à oxacilina e a outros antimicrobianos do grupo dos β-lactâmicos, reconhecido como um dos principais mecanismos de resistência destas bactérias (Mandell et al., 2005; Santos et al., 2005). A dificuldade de tratamento dos pacientes infectados com *Staphylococcus* meticilina-resistentes (MRS) leva à longos períodos de hospitalizações, gastos com internações e altos índices de mortalidade (Rozgoni et al., 2007).

Em diferentes países tem-se destacado a emergência de MRS nos animais e humanos. Juhász-Kaszanyitzky et al. (2007) colheram, entre 2002 e 2004, 595 amostras de leite de vacas com mastite subclínica de uma fazenda leiteira na Hungria. Foram isoladas 375 linhagens de *S. aureus*, das quais 27 classificadas como meticilina-resistentes. No Brasil, Coelho et al. (2007) avaliaram 80 linhagens de *Staphylococcus* isolados de 29 casos de mastite bovina, 30 de otite canina e 21 de infecções humanas. Detectaram o gene *mecA* em 12 linhagens e resistência à oxacilina em 38,9% e 33,8%, respectivamente, dos isolados de humanos e animais.

A transmissão de MRS pelo consumo de alimentos não tem sido devidamente estudada. Porém, *S. aureus* é freqüentemente isolado de alimentos e envolvido em surtos alimentares. Dantas et al. (2006) isolaram 66 linhagens de *S. aureus* de 140 amostras de leite e derivados provenientes de Goiás. O perfil de sensibilidade microbiana revelou 23,4% das linhagens multirresistentes e a resistência à meticilina foi observada em quatro (5,2%) isolados. A alta taxa de prevalência de *S. aureus* e a presença de MRS sinaliza para os riscos do consumo de leite contaminado por linhagens de estafilococos multirresistentes. Corrente et al. (2007) encontraram seis linhagens de MRS entre 200 isolados de origem animal na Itália, das quais quatro isoladas de leite cru bovino e uma de queijo. Estes achados denotam o impacto de estirpes multirresistentes isoladas de vacas com mastite, e a necessidade de estudos do perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* obtidos de animais, com vistas à vigilância epidemiológica de isolados com resistência múltipla aos antimicrobianos, em especial à meticilina.

Na família *Staphylococcaceae* (Garrity e Holt, 2001), a espécie *S. aureus* é freqüentemente relacionada à infecções e intoxicações alimentares (Sá et al., 2004; Stamford et al., 2006). São reconhecidas 23 enterotoxinas estafilocócicas – EES, que apresentam elevada termorresistência (Jorgensen et al., 2005a; Vasconcelos e Cunha, 2010). Indivíduos acometidos apresentam período de incubação variando de uma a seis horas após a ingestão (Balaban e Rasooly, 2000; Carmo, 2001), frequentemente apresentando os sinais típicos entre duas a quatro horas após ingestão de toxina (Balaban e Rasooly, 2000). *S. aureus* é considerado um dos principais agentes de toxi-infecção alimentar de origem bacteriana nos humanos (Lamaita et al., 2005). As principais manifestações clínicas são representadas por episódios de êmese e diarréia, geralmente mais graves em recém nascidos, idosos e pessoas imunocomprometidas (Balaban e Rasooly, 2000; Nader Filho et al., 2007a). Estima–se que 30 a 50% das linhagens de *S. aureus* isoladas de mastite em animais sejam toxigênicas, das quais as toxinas A, B, C e D são, provavelmente, as mais patogênicas para os humanos (Dinges et al., 2000).

Das linhagens de *S. aureus* isoladas a partir de amostras de queijo minas envolvidos em surto de intoxicação alimentar em Ouro Preto, MG, 80% produziram SEA, 20% SEB, 30% SED e 10% SEE. SEC e TSST-1 não foram

detectadas (Sabioni et al., 1988). Carmo et al. (2002) encontraram enterotoxinas A, B e C em queijo Minas e enterotoxinas C e D em leite cru de dois surtos de intoxicação alimentar em cidades do interior do estado de Minas Gerais. Kérovanton et al. (2007) encontraram pelo menos uma enterotoxina pesquisada em 29/33 (87,90%) linhagens de *S. aureus* de casos de intoxicação alimentar na França, SEA foi relatada em 23/33 (69,70%) e SED em 12/33 (36,36%).

Outro fator de virulência do gênero *Staphylococcus* é a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), reconhecida como a principal causa da síndrome do choque tóxico (TSS) em humanos, cujos principais sinais clínicos são febre, hipotensão, congestão em vários órgãos e choque letal (Fagundes e Oliveira, 2004; Nader Filho et al., 2007a). Cardoso et al. (1999), em Minas Gerais, encontraram 65,04% de 127 linhagens de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina produtoras de TSST-1.

Nos últimos anos, ECN têm merecido destaque na literatura especializada em virtude da capacidade de produção de toxinas (Cunha et al., 2006).

Apenas os grandes surtos de intoxicação associados aos alimentos industrializados são difundidos e recebem atenção do público e da mídia. Em contraste, os casos individuais são menos divulgados, principalmente pela ausência de notificação, dificultando precisar a real incidência (Sá et al., 2004; Stamford et al., 2006). Estudos de vigilância epidemiológica voltados a ocorrência de linhagens de *Staphylococcus* spp. e a produção de fatores de virulência, além da avaliação da adoção de boas práticas sanitárias desde a produção até a prateleira para os produtos de origem animal, são imprescindíveis para os profissionais de saúde, como subsídio para a adoção de ações de controle e profilaxia, visando assegurar a qualidade dos produtos e derivados de origem animal.

2.3.2 Mastite pelo gênero *Escherichia coli* e fatores de virulência

Embora com menor prevalência, as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, principalmente *Escherichia coli (E. coli)*, podem estar envolvidas na etiologia das mastites, principalmente nas primeiras semanas de lactação, sob a forma de graves manifestações clínicas (Langoni et al., 1998;

Radostits et al, 2007). As enterobactérias são responsáveis por mastites classificadas como ambientais, pois estão presentes no ambiente de criação dos animais (Ribeiro, 2008). Em estudo conduzido por Hendriksen et al. (2008) foram isoladas ao redor de 4500 (18,0%) linhagens de *E. coli* a partir do leite de vacas e de fezes de animais com diarréia, provenientes de 13 países da Europa, dentre mais de 25.000 (100,0%) isolados bacterianos.

No que diz respeito às interações entre animais, humanos e *E. coli*, podemos dividir esta espécie bacteriana em dois grupos. O primeiro grupo é formado por comensais que habitam o intestino grosso de homeotérmicos de seu nascimento até a morte. O segundo, formado por *E. coli* patogênicas, pode causar diversos tipos de infecções e é constituído por muitos patotipos. Os micro-organismos comensais podem causar infecções em indivíduos imunocomprometidos ou de maneira iatrogênica (Veronesi, 2005; Martinez e Trabulsi, 2008). A patogenicidade e as manifestações clínicas das colibaciloses variam de acordo com a presença de diferentes fatores de virulência, representados por adesinas, endo e exotoxinas, sistemas de captação de ferro e multi-resistência aos antimicrobianos.

Classicamente *E. coli* é considerado um dos principais agentes causais da enterite em humanos e nos animais. As linhagens de *E. coli* relacionadas às manifestações clínicas entéricas ou diarreiogênicas são divididas na atualidade em seis classes ou grupos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) [Acha e Szyfres, 2001; Kaper et al., 2004; Veronesi, 2005; Martinez e Trabulsi, 2008].

Diversos estudos assinalam a emergência de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) sorotipo O157:H7, responsável por graves surtos de colite hemorrágica, trombocitopenia e distúrbios renais, freqüentemente fatais em crianças (Besser e Griffin, 1999; Ribeiro et al., 1999; Ribeiro et al., 2006). Desde o primeiro surto descrito em 1982 nos EUA pelo consumo de hamburgueres em “fast food”, muitos alimentos foram descritos como veículos do sorotipo O157:H7. Entretanto, os produtos de origem animal, principalmente de bovinos, merecem destaque especial (Leclerc et al., 2002; Ribeiro et al., 2006). Os bovinos são considerados os principais reservatórios do sorotipo

O157:H7 para os humanos (Acha e Szyfres, 2001; Mandell et al., 2005; Martinez e Trabulsi, 2008).

A participação do sorotipo O157:H7 na gênese das mastites bovinas não está totalmente esclarecida, embora existam evidências epidemiológicas associando o consumo de leite e derivados com casos de doença em humanos (Martin et al., 1986; Chapman et al., 1993; Morgan et al., 1993; Ansay e Kaspar, 1997; Tauxe, 1997; Besser e Griffin, 1999). No Brasil, Ribeiro et al. (2006) avaliaram a produção de diferentes fatores de virulência em 120 linhagens de *E. coli* isoladas de mastite clínica e subclínica em bovinos e detectaram a produção de hemolisinas em oito (6,7%) linhagens, verotoxinas em cinco (4,2%), fator necrosante citotóxico em uma (0,8%), sideróforos em 11 (9,2%) e multirresistência a dois ou mais antimicrobianos em 24 (20%), porém não detectaram o sorotipo O157:H7. Salvadori et al. (2003) investigaram a virulência de 205 linhagens de *E. coli* isoladas de bovinos com diarréia, e encontraram seis (2,9%) estirpes contendo, simultaneamente, genes codificadores para toxinas de Shiga (*stx*) e de intimina (*eae*), característicos do sorotipo O157:H7. Sandrini et al. (2007) isolaram *E. coli* verotoxigênicas em 57 (95%) de 60 propriedades de Pelotas, RS e em 119 (49%) de 243 animais com aptidão leiteira, comprovando a presença do mesmo nos bovinos criados no país.

O sorotipo O157:H7 se adere as células formando grupamentos de microcolônias na superfície do enterócito de maneira íntima e localizada, destruindo as microvilosidades, provocando alterações na constituição e no metabolismo celular. Este tipo de lesão é reconhecida como *Attachment/Effacement* (A/E), pois após a adesão há também formação de “pedestais ou saliências” nas células. O desenvolvimento da lesão A/E envolve a participação de genes plasmidiais e cromossômicos, bem como resposta celular. Porém, os principais genes envolvidos com A/E se encontram inseridos no cromossomo bacteriano formando uma ilha de patogenicidade (PAI) denominada LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”). Dentre os genes presentes nessa PAI, encontra-se o gene *eae* (*E. coli* attachment and effacing), que codifica a síntese de uma proteína denominada intimina, responsável pela adesão íntima da bactéria às células intestinais (Kaper et al., 2004).

Kuhnert et al. (2005) detectaram o sorotipo O157:H7 em 25% das amostras fecais de bovinos leiteiros produzidos no sistema orgânico e em 17% dos animais criados de maneira convencional. A diferença foi estatisticamente significante, alertando para a maior prevalência do micro-organismo em animais criados de forma orgânica, o que indica a necessidade de mais estudos e de vigilância continuada para este sistema de produção.

Diferentes toxinas com efeito lítico em células epiteliais, eritrócitos e leucócitos são produzidas por *E. coli*. Dentre as principais toxinas e citolisinas, assumem destaque α-hemolisina (hlyA), fator necrosante citotóxico (cnf) e verotoxinas (vt) [Martinez e Trabulsi, 2008].

A α-hemolisina é uma citotoxina capaz de induzir a formação de poros na membrana de diversas células do hospedeiro, resultando em morte celular (Martinez e Trabulsi, 2008). Esta toxina faz parte da família RTX ("Repeat Toxin"). Promove a lise em eritrócitos, leucócitos, células endoteliais e do epitélio renal (Johnson, 1991), recebendo a denominação de citolisina (Reingold et al., 1999). A hemolisina é codificada por um operon cromossomal composto por quatro genes designado *hlyABCD*. O gene *hlyA* é estrutural, *hlyC* é responsável pela ativação pós transcricional da proteína estrutural e as proteínas hlyB e hlyC de membrana, compõem a maquinaria secretória de hlyA (Garcia e Le Bouguénec, 1996). Em animais, o operon *hly* se localiza nos plasmídios (Johnson, 1991; Reingold et al., 1999).

A exposição de polimorfonucleares à α-hemolisina estimula a degranulação e a liberação de ATP e leucotrienos, causando severas alterações morfológicas, diminuindo quimiotaxia e fagocitose. A lise celular ocorre em altas concentrações da toxina. Monócitos e granulócitos são altamente sensíveis a citotoxicidade da hemolisina, enquanto linfócitos são relativamente resistentes. A formação de poros, decorrente da ligação de hly com o receptor na célula do hospedeiro, permite o fluxo livre de cátions, íons e água, levando a perda do conteúdo intracelular, alterações no citoesqueleto e no metabolismo da célula (Johnson, 1991).

Caprioli et al. (1983) descreveram uma toxina produzida por estirpes de *E. coli* isoladas de enterite de crianças capaz de induzir lesões necróticas em pele de coelho. O efeito citopático desta toxina em linhagens celulares

HeLa e Vero leva ao desarranjo do tapete celular, formação de células gigantes e multinucleadas. Em 1983 a toxina foi denominada Fator Necrosante Citotóxico (cnf) (Gyles, 1992; Pohl et al., 1993; Garcia e Le Bouguénec, 1996; Boquet, 2001). A produção de cnf-1 foi reportada em *E. coli* isoladas de casos de enterite, septicemia e nefrite em humanos, diarréia em vacas e suínos, septicemia em touros, e em casos de septicemia e infecção do trato urinário em cães e gatos (Gyles, 1992; Pohl et al., 1993). Kaipanem et al. (2002) observaram os genes *cnf-1* e *cnf-2*, respectivamente, em 11% e 8% das linhagens de *E. coli* isoladas de casos de mastites da Finlândia e em 1%, para ambos os genes, das linhagens provenientes de Israel.

A verotoxina tipo 1 (vt1) é funcionalmente e estruturalmente similar à toxina de Shiga (sintetizada por *Shigella dysenteriae*), porém vt2 é antigenicamente distinta de vt1, e ambas são também denominadas toxinas Shiga-like (Stx 1 e 2) [Nataro e Kaper, 1998; Ribeiro, 2001]. As toxinas vt1 e vt2 são constituídas por duas subunidades (A – B). A subunidade B é um pentâmero que se liga a um receptor glicolipídico específico, presente na superfície das células eucarióticas. Após a ligação de B com os enterócitos, a subunidade A é carreada para o interior celular, sofrendo ação de enzimas proteolíticas, reduzida a subfrações. A subfração A_1 remove resíduo de adenina da porção 28S ribossomal, inibindo a síntese protéica e causando morte celular (Ribeiro, 2001). Os genes estruturais para as verotoxinas são encontrados em bacteriófagos lisogênicos que os inserem no cromossomo bacteriano (Nataro e Kaper, 1998).

Devido ao grande número de surtos de diarréia no Brasil e a gravidade das manifestações clínicas provocadas pela infecção por O157:H7, faz-se necessária a pesquisa de fatores de virulência que caracterizem linhagens diarreiogênicas, como também estudos de vigilância epidemiológica com alimentos e derivados de origem animal, visando a prevenção de EHEC no país.

2.4 Indicadores de qualidade do leite

As alterações no metabolismo celular da glândula mamária prejudicam a síntese dos componentes do leite. A mastite altera a permeabilidade dos vasos sangüíneos e da rota paracelular de secreção de

constituintes do leite, acarretando alterações em sua composição, a saber: aumento da contagem de células leucocitárias e epiteliais ou células somáticas (CCS) e da contagem bacteriana total (CBT), diminuição dos teores de gordura, proteína e lactose, aumento das imunoglobulinas e frações do soro sangüíneo no leite, desequilíbrio salino e aumento de pH (Arashiro et al., 2008).

2.4.1 Contagem de Células Somáticas

A contagem de células somáticas é um método indireto de diagnóstico utilizado no monitoramento da saúde da glândula mamária de fêmeas em lactação por quantificar a presença de células epiteliais e de defesa no leite (Barbosa et al., 2002), que migram do sangue para o interior da glândula mamária, com o objetivo de combater patógenos (Sá et al., 2004). Inúmeras são as perdas relacionadas com a alta CCS em animais de exploração leiteira (Brito, 2008).

As infecções mamárias por *S. aureus* estão relacionadas a altas contagens de células somáticas, bem como outros estafilococos coagulase positivos (Fonseca e Santos, 2000).

ECN foram considerados não patogênicos até 1973, quando Holmberg demonstrou a patogenicidade de *Staphylococcus epidermidis* no úbere de vacas com mastite subclínica, após verificar contagens acima de 500.000 céls/mL de leite. No Brasil, Zafalon et al. (1999) encontraram valores de CCS com médias acima de 860.000 céls/mL no leite de animais com mastite causadas por ECN. Em contraste, Costa et al. (2005) encontram valores inferiores, em vacas na lactação, em torno de 400.000 céls/mL. Atualmente estes patógenos residentes da pele do úbere são altamente relacionados com surtos de mastites, principalmente em rebanhos com controle de patógenos maiores como *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Radostits et al., 2007).

Na Europa, com a consolidação da produção de leite orgânico, diversos estudos têm monitorado a celularidade do produto como parâmetro da qualidade deste tipo de leite. Roesch et al. (2006), na Suíça, encontraram entre 71 e 115 x 10^3 céls/mL para as amostras de leite produzidas no sistema orgânico, comparativamente a 57 e 93 x 10^3 céls/mL em leite convencional, com ausência de diferença estatística entre os valores. Hamilton et al. (2006) em tanques de expansão de propriedades localizadas na Suécia, observaram

intervalos entre 83 a 280 x 10^3 céls/mL no leite orgânico e 45 a 540 x 10^3 céls/mL no leite convencional, com médias de CCS próximas a 180 x 10^3 céls/mL.

No Brasil, apenas 0,02% da produção leiteira anual é produzida no sistema orgânico. Os estudos nacionais preocupados com o nível de celularidade do leite orgânico como parâmetro de qualidade são escassos. No intuito de mensurar a CCS do leite orgânico e convencional produzidos no interior de São Paulo, Campos (2004) encontrou, respectivamente, 1.754.530 céls/mL e 347.800 céls/mL. De acordo com os parâmetros estabelecidos, a IN 051 (Brasil, 2002) aceita atualmente, na plataforma, o leite com até 750.000 céls/mL. Desta forma, o leite orgânico estaria fora dos padrões de celularidade exigidos.

2.4.2 Contagem Bacteriana Total

A contagem bacteriana total é um parâmetro aferido para mensurar a contagem de unidades formadoras de colônias de micro-organismos aeróbios mesófilos no leite (Brasil, 2002). Estudos conduzidos no território nacional têm mostrado que as principais fontes de contaminação para o leite por mesófilos aeróbios são a superfície e a água residual dos latões e tanques de expansão, além de tetos mal higienizados (Langoni, 2000).

De acordo com a IN 051 aceita-se atualmente até 750.000 UFC/mL (Brasil, 2002). Campos (2004) encontrou valores acima do permitido pela IN 051 para as amostras de leite produzidas tanto no sistema orgânico quanto no sistema convencional, reforçando a necessidade da avaliação periódica da CBT como parâmetro de qualidade do leite. No Brasil, as IN 051 e 064 têm sido utilizadas como referência para garantir segurança aos consumidores destes produtos.

2.4.3 Resíduos de antimicrobianos

O leite de animais mastíticos pode veicular micro-organismos patogênicos, gerando grande preocupação em saúde pública. Neste contexto, o controle da mastite é fundamental dentro do sistema de produção leiteira. Os produtores buscam tecnologias que tornem as propriedades mais eficientes, gerando produtos de alta qualidade, com baixo custo e maior rendimento

industrial. Paradoxalmente, incluem no dia-a-dia o uso de produtos que garantam saúde e maior produção animal, como os antimicrobianos. No entanto, o uso em grande escala de fármacos pela população em geral desde a década de 50 tem aumentado a pressão seletiva para linhagens de micro-organismos resistentes, além de favorecer a presença de resíduos no leite e derivados de origem animal (Arashiro et al., 2008). Os resíduos causam também danos irreversíveis para a indústria, pela diminuição ou inibição da quantidade de bactérias responsáveis pela fermentação (queijos e iogurtes) [Tetzner et al., 2005], bem como o risco de reações orgânicas indesejáveis nos humanos.

O consumo de leite e derivados contendo resíduos de antimicrobianos pode desencadear fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis, efeitos tóxicos e carcinogênicos, alterações no equilíbrio da microbiota intestinal e favorecer a pressão seletiva para linhagens de bactérias resistentes no trato gastrintestinal (Almeida et al., 2003). A maioria da população humana é exposta a baixas doses de contaminantes, de forma freqüente e com efeitos a longo prazo (Kukurova e Hozova, 2003).

Atualmente existem vários métodos de detecção de resíduos de antimicrobianos e outras substâncias inibidoras no leite, incluindo testes inibidores de multiplicação bacteriana, métodos imunológicos e enzimáticos (Almeida et al., 2003).

Para a pesquisa de substâncias inibidoras/resíduos tem sido amplamente utilizado o método de inibição “in vitro” da multiplicação de *Bacillus stearothermophilus* em meio de cultivo específico, em virtude de sua praticidade e capacidade de evidenciar grande quantidade de princípios ativos (Kukurova e Hozova, 2003). Este tipo de teste consiste na observação da capacidade de multiplicação de determinado micro-organismo na presença do antimicrobiano (Fonseca e Santos, 2000).

No Brasil, diversos autores têm-se preocupado em monitorar a presença de resíduos químicos, principalmente antimicrobianos, no leite bovino produzido no sistema convencional. Nascimento et al. (2001) ao avaliarem a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em 96 amostras de leite comercializado em Piracicaba, SP, encontraram 50% de positividade, 34,8% das quais positivas para β-lactâmicos. Em Salvador, Barros et al. (2001)

encontraram 38,5% das amostras de leite pasteurizado tipo C contendo resíduos de antimicrobianos. No entanto, Almeida et al. (2003) ao investigarem o leite de 158 propriedades rurais de Uberlândia, MG, detectaram resíduos de β-lactâmicos em somente 1,89% das amostras.

Os estudos direcionados à detecção de resíduos no leite produzido no sistema orgânico são escassos, particularmente no Brasil, apesar da exigência da IN 064 de ausência de resíduos no leite orgânico. A Instrução Normativa 051 (MAPA) exige o monitoramento mensal da presença de resíduos de antimicrobianos no leite, cuja responsabilidade é das indústrias e, afirma ainda, que as análises devem ser realizadas somente por laboratórios oficiais ou credenciados pelo MAPA (Brasil, 2002). O conhecimento da exposição da população a esses compostos é de fundamental importância para nortear as ações de controle visando a proteção do consumidor.

Em estudo investigando a presença de resíduos de antimicrobianos em leite bovino produzido no sistema orgânico, Campos (2004) encontrou 6,67% das amostras analisadas positivas para β-lactâmicos. Em 2009, Ribeiro et al. encontraram quatro (2,7%) amostras de leite positivas para resíduos de antimicrobianos, dentre 178 colhidas de quatro propriedades certificadas como orgânicas do estado de São Paulo.

2.4.4 Constituintes do leite

Os teores dos constituintes do leite são determinantes para o estabelecimento da sua qualidade nutricional e aptidão para o processamento industrial e consumo humano (Bansal et al., 2005). A síntese do leite ocorre na glândula mamária sob influência hormonal (Radostits et al., 2007). Muitos componentes são sintetizados nas células secretoras, enquanto outros compõem o leite pelo acesso através do sangue e epitélio glandular (Fonseca e Santos, 2000). A água é o constituinte mais abundante no leite, na qual estão dispersos os demais componentes. A maior parte da água apresenta-se na forma livre. No entanto, a água também está ligada às proteínas, lactose e aos minerais (Bordolla , 2007).

Exceto a água, consagrou-se agrupar os constituintes do leite em extrato seco total, ou sólidos totais (Fonseca e Santos, 2000; Polegato e Rudge, 2003). Quando a gordura é desconsiderada obtém-se o extrato seco

desengordurado ou sólidos não gordurosos do leite (Brito, 2008). Estes parâmetros têm sido empregados para o pagamento por qualidade do leite “in natura” pelas indústrias de laticínios (Gomes, 2001).

A gordura do leite é encontrada sob a forma de glóbulos, compostos principalmente por triglicerídeos, envolvidos por membrana lipoprotéica (Langoni, 2000; Gomes, 2001; Zoccal, 2004). A gordura é o componente lácteo que mais sofre variações sob influência da alimentação dos animais, raça, estação do ano e período da lactação (Bansal et al., 2005).

As proteínas podem ser consideradas a fração mais expressiva dos compostos nitrogenados do leite, visto que 95% da fração nitrogenada do leite bovino é constituída por proteínas e 5% por compostos nitrogenados não protéicos (Fonseca e Santos, 2000). Os fatores que influenciam a composição e a distribuição das frações nitrogenadas do leite bovino são, principalmente, infecções mamárias, temperatura ambiental, estágio da lactação, número de parições, raça e alimentação (Fonseca e Santos, 2000; Brito, 2008).

A lactose, glicídeo característico do leite, é formada por glicose e galactose, e considerada o composto sólido predominante e pouco variável (Fonseca e Santos, 2000). Este glicídeo pode ser metabolizado por micro-organismos para formação de ácido láctico (Brito, 2008). Os níveis de ácido láctico podem ser utilizados como controle de processamento ou de qualidade da matéria-prima (Brasil, 2005).

O leite contém altos teores de cloro, fósforo, potássio, cálcio e magnésio. Ao contrário, apresenta baixos teores de ferro, alumínio, bromo, zinco e manganês, sais orgânicos e inorgânicos (Sordillo et al., 1997). Também são encontradas todas as vitaminas conhecidas, tanto em leite bovino quanto em humano (Brito, 2008). As vitaminas A, D, E e K encontram-se associadas com glóbulos de gordura e as demais estão dispersas em água (Fonseca e Santos, 2000). A concentração de vitaminas é dependente da alimentação das vacas (Gomes, 2001; Brito, 2008), exceto da vitamina K e outras hidrossolúveis, que são sintetizadas no trato digestório de ruminantes (Radostits et al., 2007).

O controle higiênico-sanitário dos rebanhos e da ordenha é fundamental para garantir as características nutricionais, organolépticas e de celularidade, bem como ausência de resíduos químicos, reduzindo o risco de

transmissão de agentes de doenças e reações orgânicas indesejáveis nos humanos. As questões que envolvem a melhoria da qualidade do leite e do nível da produção são extremamente complexas e requerem o esforço conjunto de todos os setores da cadeia produtiva, incluindo produtores, médicos veterinários, MAPA (IN 051, IN 064), comerciantes, consumidores e pesquisadores.

Considerando o aumento da procura por alimentos orgânicos, o incremento na produção de leite orgânico no país e a escassez de estudos voltados à inocuidade e segurança deste tipo de produto de origem animal, o presente estudo investigou a composição nutricional, celularidade, presença de resíduos de antimicrobianos, qualidade microbiológica, bem como a sensibilidade aos antimicrobianos e os principais marcadores de virulência em linhagens de Estafilococos coagulase-positiva (ECP) e Estafilococos coagulase-negativa (ECN) em leite bovino, produzido em propriedades certificadas como orgânicas, localizadas no interior do estado de São Paulo.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a qualidade do leite quanto aos constituintes, celularidade, contagem bacteriana total, presença de resíduos de antimicrobianos e micro-organismos patogênicos, sensibilidade aos antimicrobianos e fatores de virulência das linhagens de ECP, ECN e *E. coli* isoladas do leite de origem bovina produzido no sistema orgânico, em propriedades do interior do estado de São Paulo.

3.2 Específicos

- Analisar os constituintes do leite (gordura, proteína, lactose, extrato seco total e extrato seco desengordurado) colhido dos animais, do tanque de expansão e latões das propriedades;
- Quantificar o perfil de celularidade (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite colhido dos animais, do tanque de expansão e latões das propriedades;
- Verificar o efeito das estações do ano nos indicadores de qualidade do leite amostrado;
- Detectar a presença de substâncias inibidoras no leite colhido dos animais, do tanque de expansão e/ou latões das propriedades;
- Avaliar a ocorrência de linhagens de ECP, ECN e de *E. coli* isoladas a partir de leite produzido no sistema orgânico;
- Determinar o perfil de sensibilidade “in vitro” das linhagens de ECP, ECN e *E. coli* isoladas de leite produzido no sistema orgânico frente aos antimicrobianos utilizados rotineiramente na terapia das mastites bovinas;
- Investigar a presença de resistência múltipla aos antimicrobianos e a ocorrência de resistência à meticilina nas linhagens de ECP e ECN isoladas a partir de leite orgânico;
- Investigar a presença de genes codificadores de resistência a meticilina nas linhagens de ECP e ECN e genes codificadores de fatores de virulência em *E. coli* (intimina) isoladas a partir de leite;
- Determinar a ocorrência de linhagens toxigênicas de ECP e ECN (enterotoxinas A, B, C e D, e toxina 1 da síndrome do choque tóxico) e *E. coli*

(fator necrosante citotóxico, hemolisinas e verotoxinas) isoladas a partir de leite amostrado;

- Verificar o cumprimento das exigências quanto aos indicadores de qualidade de produção estabelecidos pela IN 051 para a produção de leite produzido no sistema orgânico em propriedades do interior do estado de São Paulo, e sua interface com a IN 064.

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Propriedades rurais em sistema orgânico de produção

Foram utilizadas para o estudo duas pequenas propriedades rurais certificadas (ECOCERT, 2011; IBD, 2011) e mantidas sob condições de exploração de leite orgânico, localizadas no interior do estado de São Paulo. Estas propriedades são consideradas de pequeno porte, mantendo aproximadamente 10 e 25 animais em lactação. Ao longo de um ano foram amostrados 127 tetos com mastite clínica ou subclínica provenientes das duas propriedades e 132 tetos sem mastite, além da avaliação do leite de 63 latões.

4.1.1 Propriedade rural I

A propriedade rural I (figura 1A) está localizada próxima ao município de Botucatu. Esta pequena propriedade é considerada do “tipo familiar” e mantém aproximadamente 10 animais em lactação. Os animais são criados a pasto e a ordenha é realizada com bezerro ao pé, após limpeza dos tetos com papel toalha. O pré-dipping não é utilizado. A ordenha é mecânica do tipo “balde ao pé”. Não há pesagem individual do leite, tampouco presença de balança na sala de ordenha. É realizado pós-dipping com imersão dos tetos em iodo glicerinado.

De acordo com a IN 064, dentre as substâncias sanitizantes permitidas para sanitização das instalações e equipamentos utilizados na produção animal orgânica estão hipoclorito de sódio, álcool etílico e iodo (Brasil, 2008).

O leite ordenhado é despejado em latões, pré higienizados com água fria, após filtragem em peneiras plásticas e encaminhado para laticínio próprio. Todos os utensílios utilizados são lavados em água fria ou ficam de molho em tanques contendo água fria.

4.1.2 Propriedade rural II

A propriedade rural II (figura 1B) está localizada na região leste do estado de São Paulo, a aproximadamente 300Km de Botucatu. Esta propriedade de exploração leiteira orgânica mantém aproximadamente 25 animais em lactação. Os animais são criados a pasto e a ordenha é realizada com bezerro ao pé, após limpeza dos tetos com papel toalha. O pré-dipping

não é utilizado. A ordenha é mecânica do tipo “balde ao pé”. Não há pesagem individual do leite, tampouco presença de balança na sala de ordenha. É realizado pós-dipping com imersão dos tetos em iodo glicerinado.

O leite ordenhado é despejado em latões, pré higienizados com água fria, após filtragem em peneiras plásticas e encaminhado para laticínio próprio. Todos os utensílios utilizados são lavados em água fria ou ficam de molho em tanques contendo água fria.

4.2 Colheita de material

4.2.1 Latões

As amostras de leite orgânico de 63 latões das propriedades foram colhidas mensalmente, em tubos tipo Falcon esterilizados, visando o diagnóstico microbiológico (15mL) e em recipientes plásticos (50mL) para CCS, CBT, avaliação de constituintes e detecção de resíduos de antimicrobianos, de acordo com recomendações da Clínica do Leite. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável (4°C) e encaminhadas aos laboratórios para os procedimentos específicos.

A. **B.**

Figura 1. Salas de ordenha das vacas das propriedades I e II com manejo em sistema orgânico de produção. **A.** Propriedade I. **B.** Propriedade II. Botucatu, SP, 2011.

4.2.2 Animais

As amostras de leite das vacas foram colhidas, de cada teto, no período médio da lactação, em tubos cônicos tipo Falcon esterilizados, com capacidade para 15mL de leite, após anti-sepsia com solução de álcool 70%.

Além da colheita em tetos com mastite clínica e subclínica, foi realizada colheita aleatória de leite em tetos sem mastite. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável (4°C), e encaminhadas aos laboratórios para o processamento.

4.3 Diagnóstico das mastites

O diagnóstico da mastite clínica foi firmado com base nas alterações macroscópicas do leite na prova da caneca telada de fundo escuro (Tamis), na presença de sinais clínicos da inflamação na glândula mamária (presença de grumos, pus, sangue ou dessora) e/ou sistêmicos nos animais (Radostits et al., 2007). Respeitando as características de manejo das propriedades amostradas, o teste do Tamis foi realizado após os bezerros mamarem, na própria sala de ordenha, visto que muitas vacas não permitiam a ordenha e a "descida" do leite só acontecia após a presença dos bezerros.

A mastite subclínica foi diagnosticada utilizando o teste clássico do "Califórnia Mastitis Test" – CMT (Schalm et al., 1971). Foram utilizados tetos com escore 2+ ou 3+ para o isolamento microbiano.

4.4 Análise de constituintes do leite

As amostras de leite colhidas mensalmente dos latões das propriedades e as amostras colhidas trimestralmente dos animais foram acondicionadas em frascos plásticos com capacidade para 50mL de leite, contendo uma pastilha do conservante Bronopol, refrigeradas a 4°C e encaminhadas para o diagnóstico na Clínica do Leite – ESALQ – USP/Piracicaba, SP, e processadas em, no máximo, cinco dias, visando à avaliação dos principais constituintes do leite, a saber: gordura, proteína, lactose, extrato seco total e extrato seco desengordurado. Os frascos plásticos contento conservante e as caixas utilizadas para transporte foram enviadas pela Clínica do Leite .

4.5 Contagem eletrônica de Células Somáticas (CCS)

As amostras de leite obtidas mensalmente dos latões das propriedades e as amostras de leite de animais com mastite foram colhidas em frascos plásticos com capacidade para 50mL de leite e homogeneizadas com

uma pastilha de conservante Bronopol. O material foi disposto em caixas apropriadas e enviado para a Clínica do Leite – ESALQ – USP/Piracicaba, SP, e processadas em, no máximo cinco dias, com a finalidade de quantificar células somáticas, de acordo com as recomendações técnicas do equipamento. Os frascos plásticos contento conservante e as caixas utilizadas para transporte foram enviadas pela Clínica do Leite. Foram consideradas indicativas de infecção amostras de leite que apresentaram contagem celular igual ou superior a 750.000 células somáticas/mL (Brasil, 2002).

4.6 Contagem Bacteriana Total (CBT)

As amostras de leite obtidas mensalmente dos latões das propriedades com vistas à contagem bacteriana total foram colhidas em recipientes plásticos com capacidade para 50mL de leite e adicionadas de quatro gotas do conservante Azidiol, no momento da colheita. Em seguida, foram encaminhadas para o diagnóstico na Clínica do Leite – ESALQ – USP/Piracicaba, SP, e processadas em, no máximo, cinco dias. Os frascos plásticos, o conservante e as caixas utilizadas para transporte foram enviadas pela Clínica do Leite.

As amostras que apresentaram valores > 750.000 de UFC/mL foram consideradas em desacordo com os padrões exigidos pela Instrução Normativa 51 do MAPA (Brasil, 2002).

4.7 Efeito das estações do ano

Ao longo de um ano de estudo o leite foi colhido a cada três meses, no mês intermediário de cada estação climática do ano (fevereiro = verão, maio = outono, agosto = inverno e novembro = primavera), visando avaliação do efeito das estações do ano na CCS, CBT e para os constituintes do leite. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável (4°C) e frascos contendo conservantes específicos, e encaminhadas aos laboratórios para o processamento, conforme supracitado (itens 4.4, 4.5, e 4.6).

4.8 Avaliação da presença de substâncias inibidoras no leite

A detecção da presença de substâncias inibidoras no leite foi realizada utilizando o *kit* comercial Delvotest™[1], conforme as recomendações do fabricante, no Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais, FMVZ-UNESP/Botucatu – SP. Foi utilizado o leite das vacas com e sem mastite e de todas as amostras de leite colhidas mensalmente dos latões em tubos cônicos tipo Falcon com capacidade para 15mL. As amostras foram congeladas (-20°C) até o processamento.

O Delvotest™ tem como princípio de ação a inibição da multiplicação do micro-organismo *Bacillus stearothermophilus* variedade *calidolactis* C953, sensível aos principais grupamentos de antimicrobianos de uso veterinário e humano, além de outras substâncias inibidoras. O micro-organismo está disposto em ágar, no qual 0,1mL da amostra de leite é inoculada. Em seguida, o *kit* é incubado à 64°C ± 5°C por três horas. Após esse período, a presença de resíduos de substâncias inibidoras impedirá ou reduzirá a multiplicação do micro-organismo e o meio com indicador de pH permanecerá com coloração inalterada (azul), caracterizado como positivo. Na ausência de inibidores detectáveis pelo teste, o micro-organismo se multiplicará acidificando o meio, alterando sua cor para amarelo, resultado considerado negativo.

4.9 Isolamento e caracterização dos micro-organismos

A totalidade das amostras de leite (63 de latões e 259 de tetos) foi processada no Serviço de Diagnóstico Microbiológico da FMVZ-UNESP/Botucatu – SP, visando o isolamento microbiano. O leite foi semeado com alça bacteriológica de platina, volume fixo (0,1mL), por esgotamento, nos meios de ágar sangue bovino desfibrinado (5%) e ágar MacConkey, mantidos a 37°C, em condições de aerobiose, com leituras a cada 24 horas, mantidas por 72 horas. Os micro-organismos foram identificados segundo as características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo (Quinn et al., 1994, 2005; Murray et al., 2007; Martinez e Trabulsi, 2008; Teixeira et al., 2008).

---

[1] Delvotest™: *DSM Food Specialties Dairy Ingredients – The Netherlands.*

4.9.1 Identificação de ECP e ECN

As colônias bacterianas sugestivas do gênero *Staphylococcus* foram coradas pelo método de Gram com o objetivo de visualizar morfologia e características tintoriais. Cocos agrupados em forma de “cacho-de-uva”, Gram-positivos, foram submetidos às provas de catalase e coagulase (Teixeira et al., 2008). O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus* com base nas provas de oxidação e fermentação da glicose, pela resistência à bacitracina (0,04 U) - indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm -, e pela sensibilidade à furazolidona (100 mg), caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro (Baker, 1984). Para diferenciação de ECP e ECN foi realizada a prova da coagulase em tubos (Winn Jr. et al., 2008). As provas de fermentação dos açúcares maltose, trealose e manitol, resistência à polimixina B e β-galactosidase foram realizadas com a finalidade de diferenciar *S. aureus* de outros estafilococos coagulase-positivos, como *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. hyicus* (Bueris et al., 2005). Posteriormente à confirmação da espécie, as linhagens foram conservadas em caldo nutriente com glicerol 5%, a - 70°C.

Para a diferenciação das espécies de ECN foi utilizado o método simples modificado proposto por Cunha et al. (2004), que consistiu na fermentação dos açúcares xilose, sacarose, trealose, maltose e manitol, produção de hemolisina e multiplicação em condições de anaerobiose em caldo tioglicolato. As linhagens foram mantidas a 37°C por 72 horas. A classificação das diferentes espécies e subespécies de ECN foi complementada pelas provas bioquímicas de redução de nitrato, produção de urease e/ou ornitina descarboxilase, fermentação de β-D-frutose e resistência a novobiocina. Posteriormente à confirmação da espécie, as linhagens foram conservadas em caldo nutriente com glicerol 5%, a - 70°C.

A identificação de espécies de *Staphylococcus* isoladas foi realizada no Laboratório de Bacteriologia, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu, SP.

4.9.2 Identificação de enterobactérias

As linhagens bacterianas isoladas em ágar MacConkey, fermentadoras de lactose (coloração rósea das colônias), foram submetidas à provas bioquímicas para enterobactérias utilizando meios de cultura sólidos e semi-sólidos, distribuídos em tubos de ensaio, visando determinar os seguintes parâmetros: produção de gás (fermentação da glicose), H_2S, urease, L-TD (L-triptofano-desaminase), motilidade, indol, lisina e citrato de Simmons. A identificação das linhagens de enterobactérias isoladas foi realizada no Serviço de Diagnóstico Microbiológico – FMVZ/UNESP – Botucatu – SP. Posteriormente à confirmação da espécie, as linhagens foram conservadas em caldo nutriente com glicerol 5%, a - 70°C.

4.10 Perfil de sensibilidade microbiana e detecção de linhagens multirresistentes

Todos os isolados foram submetidos à prova de sensibilidade microbiana pelo método de difusão com discos (CLSI, 2005, 2006). Foram utilizados princípios ativos de antimicrobianos disponíveis comercialmente e amplamente utilizados na terapia da mastite bovina, a saber: ampicilina (10 µg), cefoperazona sódica (75 µg), ceftiofur (30 µg), enrofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), oxacilina (1 µg), penicilina (10 UI) e sulfametoxazole/trimetoprim (25 µg). A ocorrência de linhagens multirresistentes foi considerada quando houve resistência múltipla (simultânea) para três ou mais fármacos utilizados. O perfil de sensibilidade microbiana foi realizado no Serviço de Diagnóstico Microbiológico – FMVZ/UNESP – Botucatu, SP.

4.11 Teste de difusão com discos para detecção de linhagens de *Staphylococcus* meticilina-resistentes (MRS)

O teste de sensibilidade à oxacilina foi realizado pela técnica da difusão em ágar (CLSI, 2005). Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI (“Brain Heart Infusion”), previamente incubadas por 24 horas e posteriormente diluídas na escala 0,5 de MacFarland. Foram empregados discos de oxacilina (1 µg) e cefoxitina (30 µg). A semeadura do inóculo foi realizada utilizando swab na superfície das placas de ágar Müeller-

Hinton. Em seguida foram dispostos os discos dos antimicrobianos. As placas foram incubadas à temperatura de 35°C por 24 horas, e a atividade do antimicrobiano avaliada pelo diâmetro do halo de inibição e interpretação com base nas normas vigentes (CLSI, 2005, 2006).

Foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, as cepas-padrão *S. aureus* ATCC 33591 e *S. aureus* ATCC 25923, cedidas pela Profa. Dra. Maria de Lourdes R. S. Cunha, do Departamento de Imunologia e Microbiologia, UNESP–Botucatu, SP.

4.12 Concentração inibitória mínima (CIM) para detecção de MRS

A concentração inibitória mínima da oxacilina foi avaliada pela técnica da difusão em ágar (CLSI, 2005, 2006). Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI, previamente incubadas por 24 horas e, posteriormente, diluídas na escala 0,5 de MacFarland. Foram empregadas fitas de oxacilina M.I.C Evaluator Strips[2] (0,016 – 0,256 µg/mL). A semeadura do inóculo foi realizada utilizando swab na superfície de placas de ágar Müeller Hinton, sobre o qual foram aplicadas as fitas impregnadas em diferentes concentrações do antimicrobiano. As placas foram incubadas à temperatura de 35°C, por 24 horas, e a atividade do fármaco avaliada pelo diâmetro do halo de inibição, interpretado com base nas recomendações vigentes (CLSI, 2005, 2006). Foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, as cepas-padrão *S. aureus* ATCC 33591 e *S. aureus* ATCC 25923, cedidas pela Profa. Dra. Maria de Lourdes R. S. Cunha, do Departamento de Imunologia e Microbiologia, UNESP – Botucatu, SP.

4.13. Pesquisa de fatores de virulência e gene de resistência

4.13.1 Detecção de hemolisinas no meio de ágar sangue

A detecção da produção de hemolisina foi realizada semeando todas as amostras de leite no meio de ágar sangue bovino desfibrinado (5%), conforme descrito no item 4.9, mantidas em condições de aerobiose, a 37°C,

[2] M.I.C.E ™. Oxoid.

por três dias. As linhagens que apresentaram halo de hemólise total ao redor das colônias no meio de ágar sangue foram consideradas hemolíticas.

4.13.2 Detecção genotípica de linhagens MRS e/ou produtoras de toxinas

4.13.2.1 Extração do DNA

O ácido nucléico total foi extraído a partir de linhagens de ECP e ECN cultivadas em ágar sangue bovino (5%), inoculadas individualmente em BHI e incubadas a 37°C por 24 h. A extração foi realizada com o Kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin® (GE Healthcare), que consiste na digestão inicial das células de estafilococos com 10 µL de lisozima (10 mg/mL) e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL). A seguir, 500 µL da solução de extração foram adicionados à mistura, e centrifugada a 5.000 g por 1 min. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para a coluna e centrifugado a 5.000 g por 1 min. A parte líquida foi descartada e 500 µL de solução de extração foram novamente adicionados à coluna. Após a centrifugação e descarte da parte líquida, 500 µL da solução de lavagem foram adicionados à coluna, submetida a nova centrifugação a 14.000 g por 3 min. A coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e 200 µL de água Milli Q aquecida a 70ºC foram utilizados para a eluição. O produto obtido foi centrifugado a 5000 g por 1 minuto para recuperar o DNA, e a coluna desprezada. O DNA extraído foi acondicionado sob refrigeração a 4°C.

4.13.2.1.1 Validação da extração do DNA

Como controle da qualidade da extração e para a confirmação de que o DNA extraído foi de *Staphylococcus* spp. foi realizada a pesquisa dos genes da subunidade 16S do rRNA (figura 2). As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volumes totais de 25 µL contendo 20 pmol de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM dNTPs, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 1,5 mM de $MgCl_2$, e 3 µL de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador (MJ Research PTC-100), utilizando os *primers 16S1* (CCT ATA AGA CTG GGA TAA CTT CGG G) e *16S2* (CTT TGA GTT TCA ACC TTG CGG TCG) – 791 (pb), empregando os parâmetros descritos por Mason et al. (2001): 36 ciclos de desnaturação a 94ºC por trinta

segundos, anelamento dos *primers* a 55°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto. Após completar os 36 ciclos, ocorreu extensão final a 72°C por dez minutos, antes de resfriar à 4°C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas água Millli Q esterilizada como controle negativo e, como controle positivo, a linhagem de referência internacional *S. aureus* ATCC 33591, cedida pela Profa. Dra. Maria de Lourdes R. S. Cunha, do Departamento de Imunologia e Microbiologia, UNESP – Botucatu, SP.

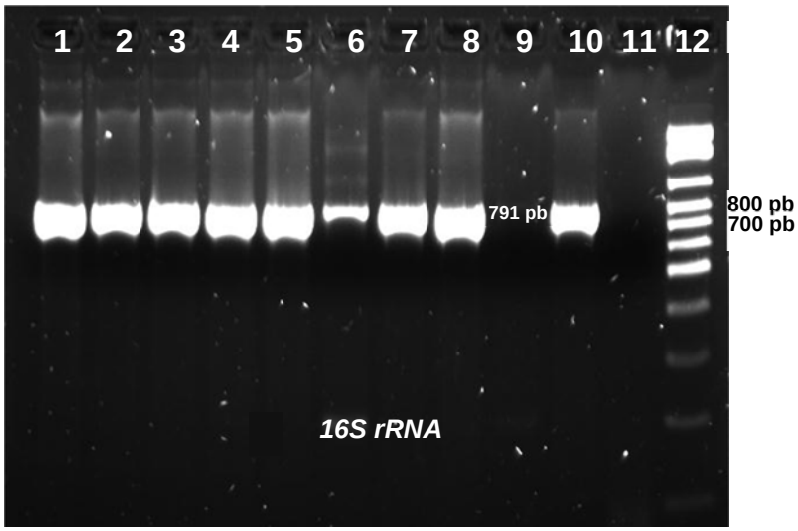


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 2% para visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa dos genes da subunidade 16S do rRNA em linhagens de *Staphylococcus* sp. isoladas do leite de propriedades orgânicas localizadas no interior do estado de São Paulo. 1-8: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 9: amostra negativa; 10: controle positivo; 11: controle negativo; 12: 100 pb DNA ladder. Botucatu, 2011.

4.13.2.2 Amplificação do DNA (PCR) para detecção do gene *mecA* de resistência à meticilina/oxacilina em *Staphylococcus* spp.

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volumes totais de 25 µL contendo 20 pmol de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM dNTPs, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 1,5 mM de $MgCl_2$, e 3 µL de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador (MJ Research PTC-100), utilizando os *primers mecA1* (AAA ATC GAT GGT AAA

GGT TGG) e *mecA2* (AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG) – 533 (pb), empregando os parâmetros descritos por Murakami et al. (1991): 40 ciclos de desnaturação a 94ºC por trinta segundos, anelamento dos *primers* a 55,5°C por trinta segundos e extensão a 72°C por um minuto. Após completar os 40 ciclos, houve extensão final a 72°C por cinco minutos antes de resfriar à 4°C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional: controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923), cedidas pela Profa. Dra. Maria de Lourdes R. S. Cunha, do Departamento de Imunologia e Microbiologia, UNESP – Botucatu, SP.

4.13.2.3 Amplificação do DNA (PCR) para detecção dos genes de enterotoxinas (A, B, C e D) e da toxina 1 da síndrome do choque tóxico em *Staphylococcus* spp.

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrifuga de 0,5 mL, em volumes totais de 25 µL, contendo 20 pmol de cada *primer* (Tabela 1), 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM dNTPs, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 1,5 mM de $MgCl_2$, e 3 µL de DNA. Em todas as reações foi utilizado controle negativo, substituindo-se DNA por água. A amplificação foi realizada em termociclador (MJ Research PTC-100) conforme descrito por Johnson et al. (1991), com modificações propostas por Cunha et al. (2006), que consistem em: primeiro ciclo a 94°C por quatro minutos, desnaturação a 94°C por dois minutos, anelamento dos *primers* a 55°C e extensão a 72°C por um minuto e trinta segundos, seguidos por segundo ciclo de desnaturação a 94°C por dois minutos, anelamento a 53°C e extensão a 72°C for um minuto e trinta segundos. No terceiro ciclo, a temperatura de anelamento foi reduzida para 51°C, seguido por mais 37 ciclos com os mesmos parâmetros. Após os 40 ciclos, extensão final a 72°C por sete minutos e posteriormente resfriamento a 4°C.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para detecção de genes codificadores de toxinas em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite orgânico, utilizando PCR. Botucatu, SP, 2011.

Gene	Seqüência de oligonucleotídeos (5'- 3')	Produto amplificado (pb)
sea	TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA	120
	GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA	
seb	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	478
	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	
sec	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	257
	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	
sed	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	317
	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	
tsst	ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA	350
	TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT	

Fonte: Johnson et al., 1991.

Foram utilizadas como controle positivo as cepas-padrão ATCC 13565 para o gene *sea*, ATCC 14458 para o gene *seb*, ATCC 19095 para o gene *sec*, ATCC 23235 para o gene *sed* e ATCC 51650 para o gene *tsst*, cedidas pela Profa. Dra. Maria de Lourdes R. S. Cunha, do Departamento de Imunologia e Microbiologia, UNESP – Botucatu, SP. Água MilliQ esterilizada foi utilizada como controle negativo em todas as reações.

4.13.2.4 Eletroforese em gel de agarose

Os géis de agarose foram preparados em concentração 2,0% em TBE 1X, corados com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®) na concentração de 1µL/10mL de gel. Foram utilizados 8 µL do DNA amplificado e 2 µL do tampão de corrida por poço. Como padrão de peso molecular foi utilizado 10 µL do Ladder de 100pb (GE®). As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba horizontal contendo TBE 0,5X a 110V. Os géis foram fotografados e visualizados em transiluminador de luz UV.

4.14 Análise estatística (Mead e Curnow, 1993)

A influência das estações do ano sobre a CCS e sobre a CBT foi verificada pelo teste de Friedman e para os constituintes do leite por Análise de Variância. A comparação dos valores de constituintes do leite e o CMT foi

avaliada pelo teste t de Student. A comparação das CCS segundo o resultado do exame microbiológico e do CMT foi realizada pelo teste de Kruskall-Wallis. A associação entre os valores de CCS e do CMT segundo o resultado do exame microbiológico foi analisada pelo teste de Mann-Whitney. A influência do isolamento de ECP ou ECN sobre os constituintes do leite foi verificada pelo teste de Tukey. Em todas as análises foram consideradas diferenças significativas para valores de $p < 0,05$.

A análise estatística foi realizada pelo Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva, Departamento de Ciências Biológicas (DCBIO), Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, BA, Brasil.

Resultados

5. RESULTADOS

O início das colheitas ocorreu em setembro de 2008. Em seguida foram realizadas 12 colheitas em cada uma das duas propriedades, das quais 12 mensais dos latões e quatro trimestrais de todos os animais, com término em agosto de 2009.

O quadro 1 apresenta o número de tetos/animais, o número de latões amostrados e os resultado do diagnóstico de mastite. Foi diagnosticada mastite clínica em um teto de animal da propriedade I (presença de sangue) e em um teto de animal da propriedade II (leite de coloração amarela e viscoso), utilizando a prova da caneca telada de fundo escuro. A mastite clínica foi diagnosticada em dois tetos (0,77%), um caso em cada propriedade. A presença de mastite subclínica foi diagnosticada em 48,26% dos tetos avaliados.

5.1 CCS, CBT e constituintes do leite

Os resultados de CCS, CBT e dos principais constituintes do leite colhido dos animais estão apresentadas no quadro 2, enquanto os dados de CCS, CBT e consituintes do leite dos latões estão apresentadas no quadro 3.

Quadro 1. Meses das colheitas, número de vacas em lactação, número de tetos amostrados, tetos com mastite clínica ou subclínica, tetos negativos e número de latões de duas propriedades rurais certificadas como orgânicas do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

	Mês	Número de animais/tetos	Mastite clínica (animais/tetos)	Mastite subclínica (animais/tetos)	Tetos negativos (animais/tetos)	Número de latões
Propriedade rural I	Set/2008	0/0	0/0	0/0	0/0	3
	Out/2008	0/0	0/0	0/0	0/0	2
	Nov/2008	12/21	0	4/8	8/13	1
	Dez/2008	0/0	0/0	0/0	0/0	1
	Jan/2009	0/0	0/0	0/0	0/0	1
	Fev/2009	19/22	0/0	6/8	13/14	2
	Mar/2009	0/0	0/0	0/0	0/0	1
	Abr/2009	0/0	0/0	0/0	0/0	2
	Mai/2009	12/15	1/1	2/5	9/9	1
	Jun/2009	0/0	0/0	0/0	0/0	3
	Jul/2009	0/0	0/0	0/0	0/0	3
	Ago/2009	20/28	0/0	5/8	15/20	3
Subtotal	-	63/86	1/1	17/29	45/56	23
Propriedade rural II	Set/2008	0/0	0/0	0/0	0/0	4
	Out/2008	0/0	0/0	0/0	0/0	3
	Nov/2008	30/42	0/0	14/26	16/16	3
	Dez/2008	0/0	0/0	0/0	0/0	4
	Jan/2009	0/0	0/0	0/0	0/0	3
	Fev/2009	28/44	0/0	10/24	18/20	3
	Mar/2009	0/0	0/0	0/0	0/0	4
	Abr/2009	0/0	0/0	0/0	0/0	3
	Mai/2009	23/34	1/1	7/16	15/17	2
	Jun/2009	0/0	0/0	0/0	0/0	3
	Jul/2009	0/0	0/0	0/0	0/0	4
	Ago/2009	34/53	0/0	14/30	20/23	4
Subtotal	-	115/173	1/1	45/96	69/76	40
TOTAL	-	178/259	2/2	62/125	114/132	63

Quadro 2. Resultado trimestral dos valores de CCS e dos principais constituintes de leite orgânico colhido de vacas em lactação, de duas propriedades rurais do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Propriedade I							
COLHEITA	MÊS	CCS (x 1000/mL)	GORDURA (% m/m)	PROTEÍNA (% m/m)	LACTOSE (% m/m)	ST (% m/m)	ESD (% m/m)
1	Nov/08	730,14	0,66	2,90	4,28	8,97	8,30
2	Fev/09	864,76	0,94	3,37	4,68	9,69	8,73
3	Mai/09	1561,67	3,08	3,41	4,45	11,90	8,82
4	Ago/09	628,35	3,55	3,30	4,46	12,34	8,79
Propriedade II							
COLHEITA	MÊS	CCS (x 1000/mL)	GORDURA (% m/m)	PROTEÍNA (% m/m)	LACTOSE (% m/m)	ST (% m/m)	ESD (% m/m)
1	Nov/08	808,13	1,90	3,48	4,30	10,74	8,84
2	Fev/09	642,67	2,88	3,35	4,47	11,66	8,80
3	Mai/09	1064,56	3,89	3,47	4,22	12,54	8,65
4	Ago/09	743,24	4,71	3,58	4,34	13,68	8,97

* CCS: Contagem de Células Somáticas; ST: Teor de Sólidos Totais; ESD: Teor de Extrato Seco Desengordurado.

Quadro 3. Resultado mensal dos valores de CCS, CBT e dos principais constituintes de leite orgânico de vacas colhido dos latões de duas propriedades rurais do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

	COLHEITA	MÊS	CCS (x 1000/mL)	CBT (x 1000UFC/mL)	GORDURA (% m/m)	PROTEÍNA (% m/m)	LACTOSE (% m/m)	ST (% m/m)	ESD (% m/m)
Propriedade I	1	Set/08	399,66	1033,00	3,36	3,08	4,65	12,03	8,66
	2	Out/08	670,00	2727,50	3,13	3,18	4,47	11,74	8,60
	3	Nov/08	352,00	1665,00	3,48	2,90	4,56	11,97	8,49
	4	Dez/08	693,00	47,00	3,85	2,98	4,52	12,29	8,44
	5	Jan/09	227,00	348,00	2,85	3,08	4,53	11,46	8,61
	6	Fev/09	1203,00	182,50	2,39	3,35	4,58	11,31	8,92
	7	Mar/09	938,00	333,00	3,30	3,47	4,52	12,26	8,96
	8	Abr/09	2472,00	2579,00	3,41	3,93	4,37	12,70	9,29
	9	Mai/09	538,00	373,00	2,09	3,40	4,56	11,00	8,91
	10	Jun/09	209,00	25,70	3,18	3,27	4,56	11,90	8,73
	11	Jul/09	441,00	24,30	3,52	3,22	4,61	12,34	8,82
	12	Ago/09	420,70	25,30	2,70	3,32	4,61	11,65	8,95
Média	-	-	713,61	780,27	3,10	3,26	4,54	11,88	8,78
Mediana	-	-	538,00	348,00	3,30	3,22	4,56	11,97	8,73
	COLHEITA	**MÊS**	**CCS (x 1000/mL)**	**CBT (x 1000UFC/mL)**	**GORDURA (% m/m)**	**PROTEÍNA (% m/m)**	**LACTOSE (% m/m)**	**ST (% m/m)**	**ESD (% m/m)**
Propriedade II	1	Set/08	284,75	47,25	3,38	3,36	4,52	12,26	8,88
	2	Out/08	250,33	199,66	3,38	3,45	4,52	12,32	8,94
	3	Nov/08	271,33	31,33	3,26	3,41	4,57	12,22	8,96
	4	Dez/08	232,75	51,75	3,56	3,46	4,55	12,52	8,96
	5	Jan/09	273,00	53,00	3,51	3,46	4,48	12,39	8,88
	6	Fev/09	613,66	93,66	2,98	3,33	4,45	11,70	8,71
	7	Mar/09	282,00	100,75	3,85	3,43	4,43	12,67	8,82
	8	Abr/09	291,00	26,70	3,66	3,48	4,47	12,55	8,89
	9	Mai/09	562,50	14,50	3,28	3,27	4,44	11,92	8,64
	10	Jun/09	205,67	69,70	3,90	3,23	4,53	12,64	8,74
	11	Jul/09	397,00	25,50	3,48	3,56	4,49	12,51	9,03
	12	Ago/09	271,00	25,25	3,08	3,35	4,56	12,00	8,90
Média	-	-	327,91	61,58	3,44	3,39	4,50	12,30	8,86
Mediana	-	-	282,00	51,75	3,48	3,43	4,49	12,39	8,88

* CCS: Contagem de Células Somáticas; CBT: Contagem Bacteriana Total; ST: Teor de Sólidos Totais; ESD: Teor de Extrato Seco Desengordurado.

5.2 Influência das estações do ano

Não foi observada influência estatisticamente significativa (p>0,05) do período das estações do ano sobre as medianas das CCS e das CBT nas propriedades. No entanto, nos meses de primavera e verão, a mediana da CBT apresentou tendência de elevação quando comparada com os meses de outono e inverno (tabela 2, figura 3, figura 4).

Também não foi observado diferença estatisticamente significante (p>0,05) sobre as médias e desvios-padrão dos valores de gordura, proteína, lactose, ST e ESD em relação as estações do ano (tabela 3, figuras 5 - 10).

Tabela 2. Mediana e percentis 25 e 75 dos valores de contagem de células somáticas (x1000/mL) e de contagem bacteriana total (x1000 UFC/mL) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011.

	Contagem de Células Somáticas (x1000/mL)				
Estação	**Mediana**	**P25**	**P75**	**Fr**	**Valor de P**
Primavera	311,67[a]	255,58	590,50	2,15	0,5419
Verão	447,83[a]	275,25	856,92		
Outono	414,50[a]	229,50	556,38		
Inverno	398,33[a]	312,81	415,44		
	Contagem Bacteriana Total (x1000 UFC/mL)				
Estação	**Mediana**	**P25**	**P75**	**Fr**	**Valor de P**
Primavera	125,71[a]	48,19	1298,67	5,40	0,1447
Verão	141,63[a]	95,43	295,38		
Outono	48,20[a]	25,95	297,18		
Inverno	25,40[a]	25,26	41,81		

Estatística: medianas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre as estações do ano pelo teste de Friedman (Fr). UFC: unidades formadoras de colônias.

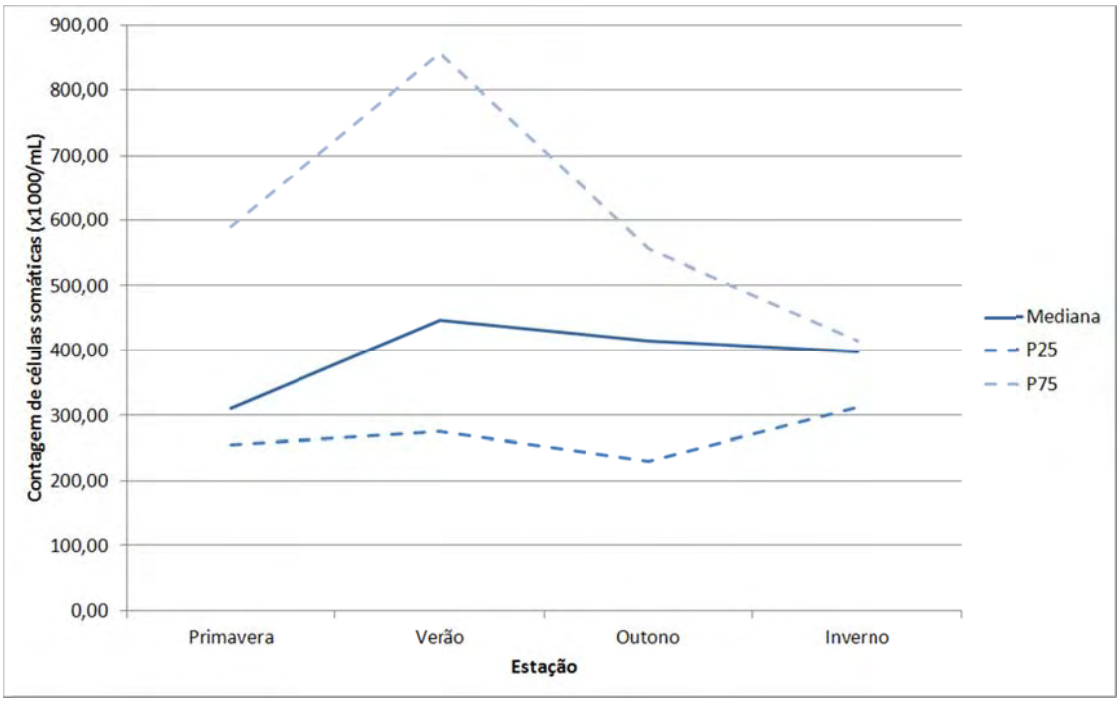


Figura 3. Mediana e percentis 25 e 75 dos valores de contagem de células somáticas (x1000/mL) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011.

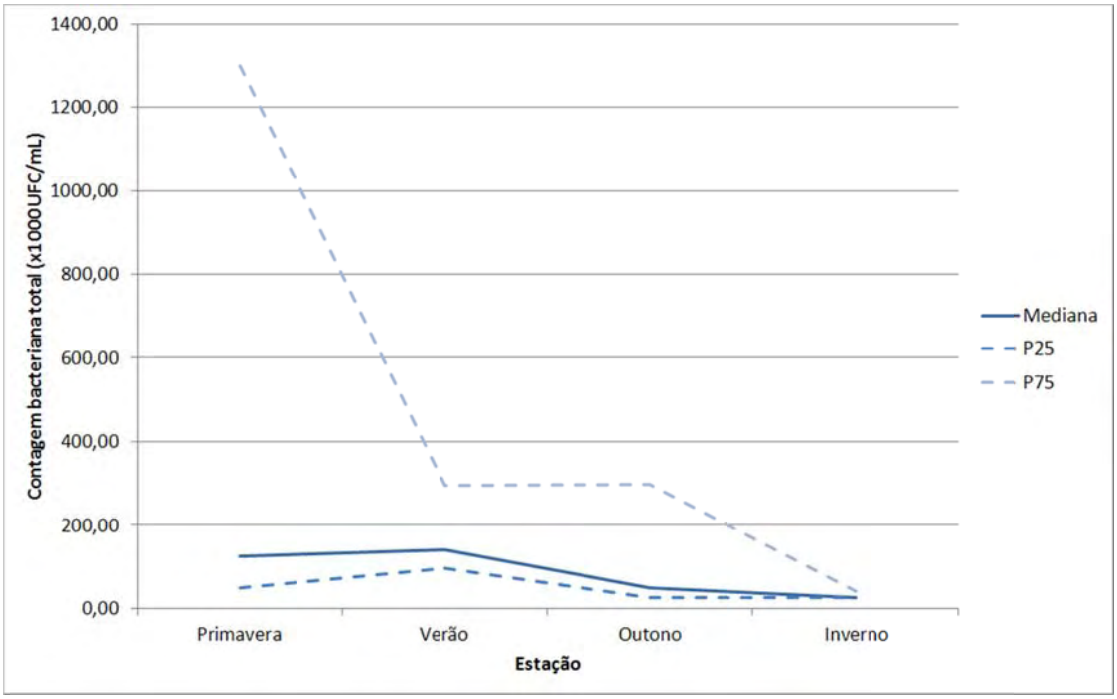


Figura 4. Mediana e percentis 25 e 75 dos valores de contagem bacteriana total (x1000 UFC/mL) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011.

Tabela 3. Média e desvio-padrão dos valores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST) e extrato seco desengordurado (ESD), em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011.

	Estações do ano				Estatística	
	Primavera	**Verão**	**Outono**	**Inverno**	**V**	**Valor de P**
Gordura (%)	3,44[a] ± 0,25	3,15[a] ±0,52	3,25[a] ±0,63	3,25[a] ±0,31	1,67	0,2053
Proteína (%)	3,23[a] ±0,25	3,35[a] ±0,15	3,43[a] ±0,26	3,32[a] ±0,16	2,50	0,0880
Lactose (%)	4,53[a] ±0,04	4,50[a] ±0,06	4,49[a] ±0,08	4,57[a] ±0,06	2,55	0,0840
ST (%)	12,18[a] ±0,28	11,97[a] ±0,55	12,12[a] ±0,65	12,13[a] ±0,30	0,23	0,8775
ESD (%)	8,73[a] ±0,25	8,82[a] ±0,13	8,87[a] ±0,23	8,87[a] ±0,13	0,69	0,5727

Estatística: para uma mesma variável, valores de média seguidos de letras diferentes indicam diferenças significativas pela Análise de Variância (V).

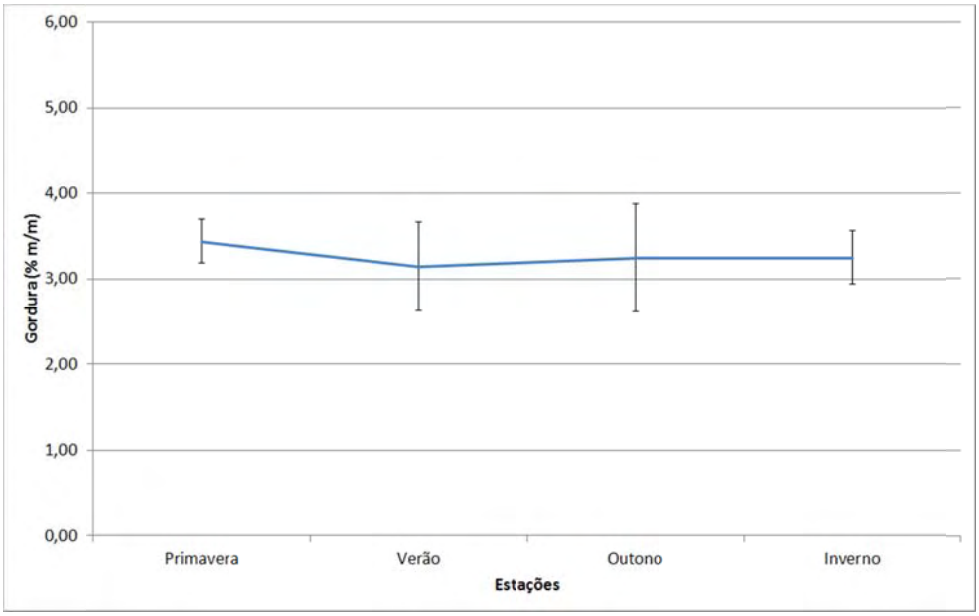


Figura 5. Média e desvio-padrão dos valores de gordura (%) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011.

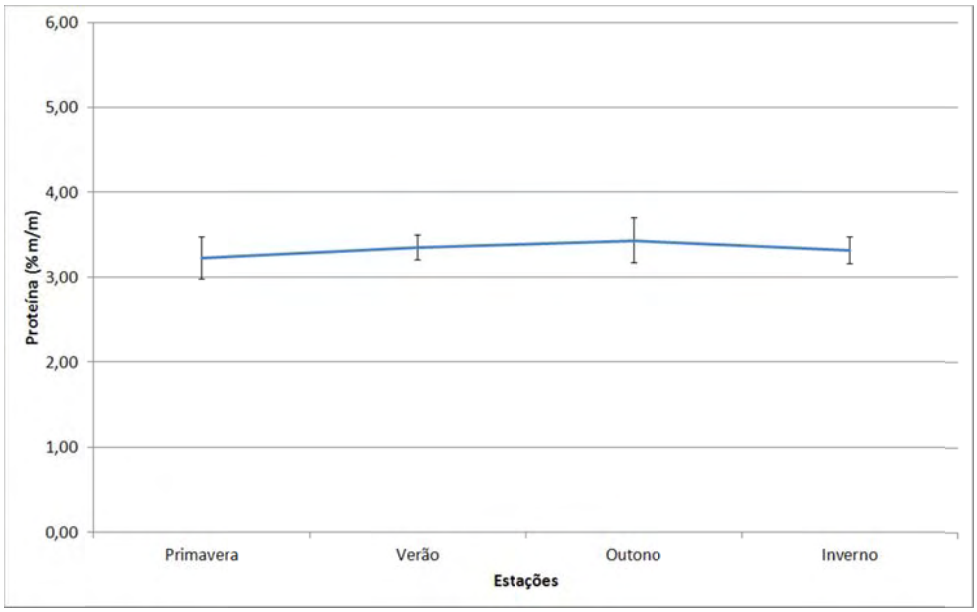


Figura 6. Média e desvio-padrão dos valores de proteína (%) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as **e**stações do ano. Botucatu, SP, 2011.

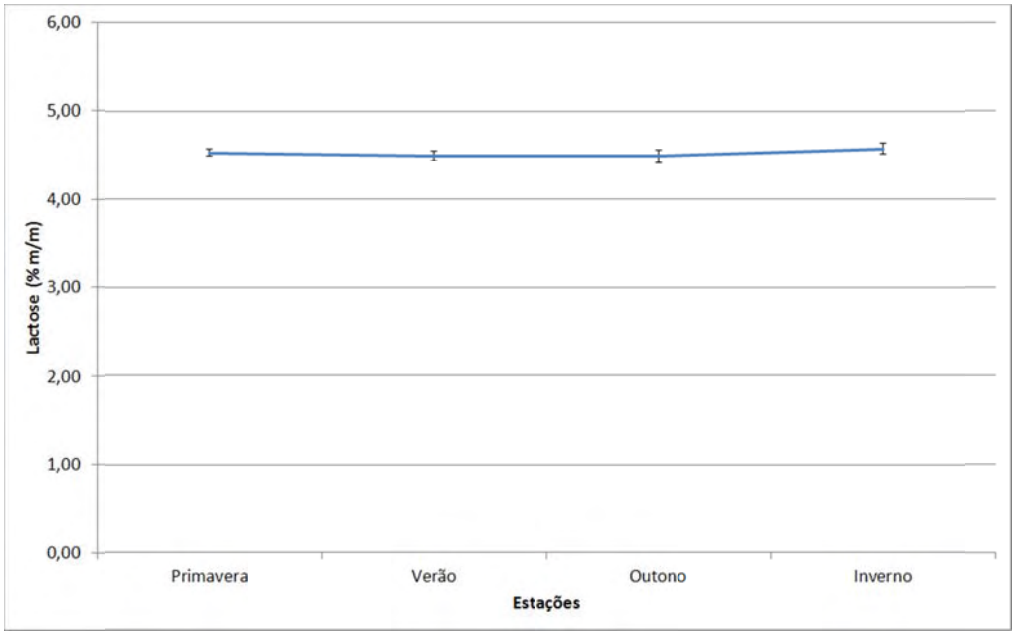


Figura 7. Média e desvio-padrão dos valores de lactose (%) **e**m leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as **e**stações do ano. Botucatu, SP, 2011.

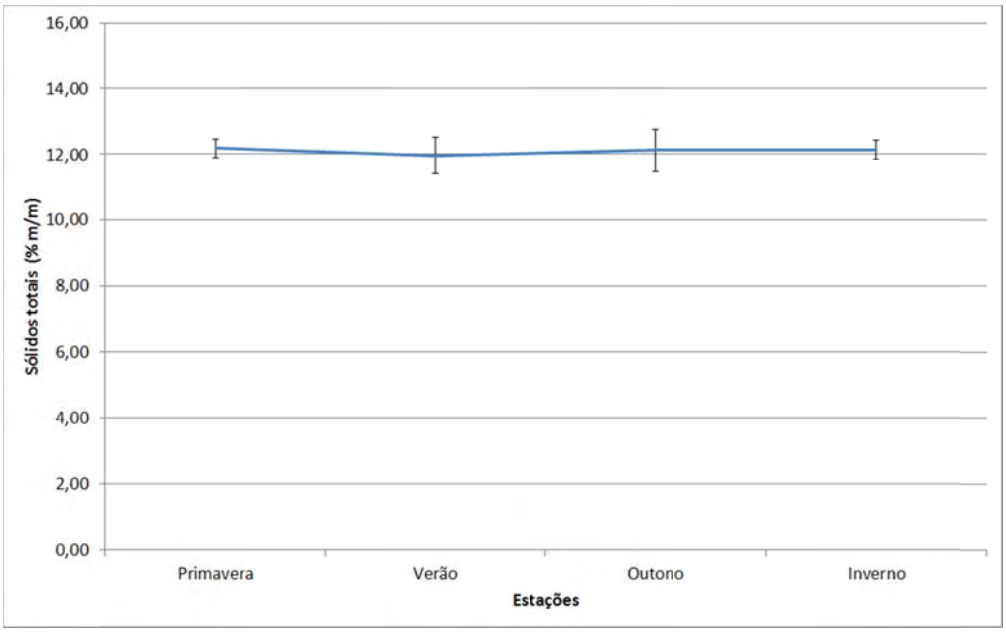


Figura 8. Média e desvio-padrão dos valores de sólidos totais (%) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011.

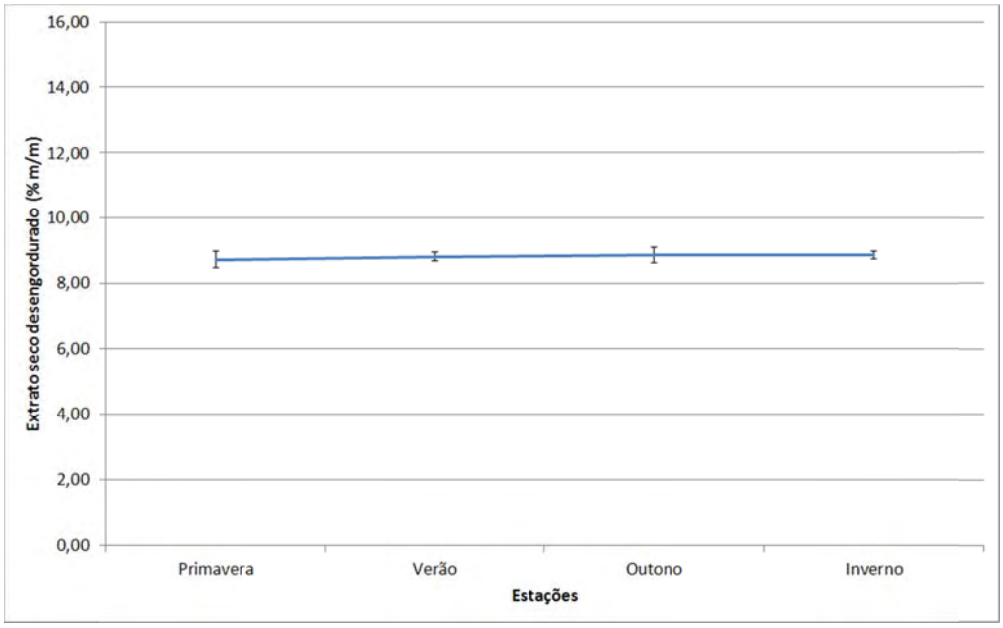


Figura 9. Média e desvio-padrão dos valores de extrato seco desengordurado (%) em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011.

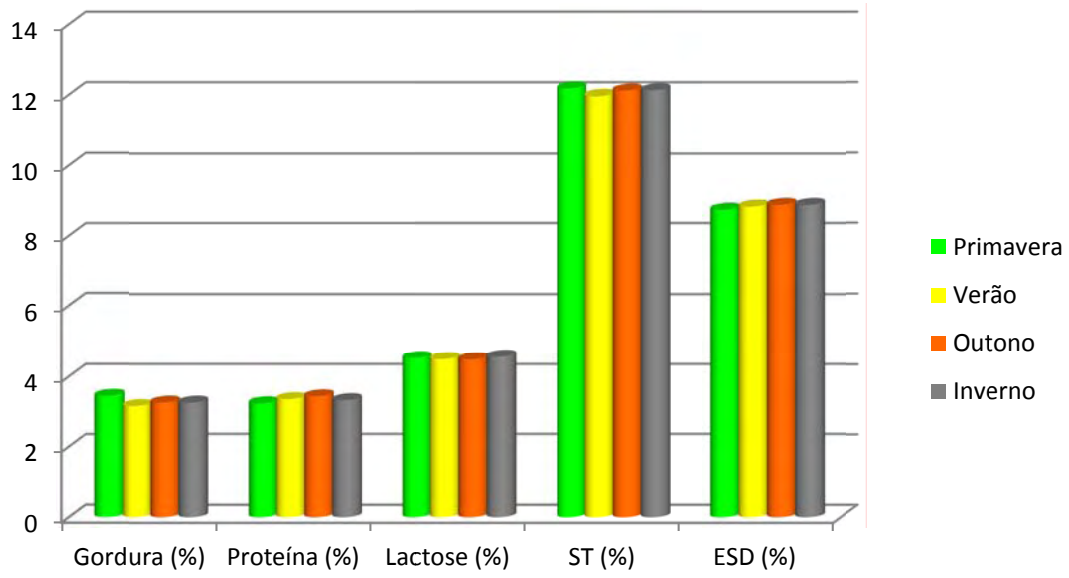


Figura 10. Média dos valores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST) e extrato seco desengordurado (ESD), em leite de vacas provenientes de duas propriedades orgânicas, segundo as estações do ano. Botucatu, SP, 2011.

A relação entre o resultado do CMT e os principais constituintes do leite está representada na tabela 4. Houve diferença estatística para os valores de gordura, lactose, extrato seco e extrato seco desengordurado quando comparados o leite de animais com e sem mastite subclínica.

Tabela 4. Número de amostras avaliadas, média e desvio-padrão dos constituintes lácteos em duas propriedades de leite orgânico, segundo diagnóstico da mastite subclínica pelo método do CMT. Botucatu, SP, 2011.

Constituintes	CMT negativo		CMT positivo		Valor de P
	N	Média ± desvio-padrão	N	Média ± desvio-padrão	
Gordura (%)	130	2,65[a] ± 1,53	75	3,31[b] ± 1,98	0,0111
Proteína (%)	130	3,37[a] ± 0,41	75	3,50[a] ± 0,44	0,4670
Lactose (%)	130	4,50[b] ± 0,30	75	4,18[a] ± 0,58	< 0,0001
Extrato seco (%)	130	11,52[a] ± 1,68	75	12,0[b] ± 2,30	0,0019
Estrato seco desengordurado (%)	130	8,88[b] ± 0,49	75	8,68[a] ± 0,70	0,0005

Estatística: médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste t de Student. CMT: "California Mastitis Test"; N: número de amostras.

5.3 Pesquisa de substâncias inibidoras/resíduos

Dentre as 86 amostras de leite colhidas da propriedade I, seis (6,97%) foram positivas para o teste de detecção de substâncias inibidoras, das quais 3/6 (50,0%) de latões e 3/6 (50,0%) de animais (um teto com mastite clínica e dois tetos com mastite subclínica). Das 173 amostras de leite colhidas da propriedade II, 16 (9,24%) foram positivas. Destas, 3/16 (18,75%) foram obtidas de latões, dos quais dois latões continham leite de vacas com tetos positivos para resíduos. As demais 13/16 (81,25%) amostras com presença de resíduos foram provenientes de animais (um teto com mastite clínica e 12 com mastite subclínica). No total, 22/259 (8,48%) das amostras de leite colhidas de vacas e latões foram positivas para resíduos.

5.4 Cultivo microbiano

Os resultados do cultivo microbiano do leite dos animais e dos latões das duas propriedades orgânicas estão apresentados no quadro 4. *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium bovis* foram os micro-organismos mais freqüentes isolados em 58/259 (22,39%) e 50/259 (19,30%), respectivamente, das amostras dos animais. Apenas uma (1/63 – 1,58%) linhagem de *Staphylococcus* spp foi recuperada de um latão. Não houve isolamento de *E. coli*.

Quadro 4. Micro-organismos de origem bacteriana isolados do leite de vacas e de latões obtidas de duas propriedades orgânicas do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Micro-organismos	Tetos	Latões
	nº linhagens/nº amostras(%)	nº linhagens/nº amostras(%)
Staphylococcus sp.	58/259 (22,39%)	1/63 (1,58%)
Corynebacterium bovis	50/259 (19,30%)	0/63 (0)
Streptococcus sp.	13/259 (5,02%)	0/63 (0)
Micrococcus sp.	10/259 (3,86%)	0/63 (0)
Enterobacter sp.	0/259 (0)	33/63 (52,38%)
Klebsiella sp.	0/259 (0)	14/63 (22,22%)
Bacillus sp.	0/259 (0)	5/63 (7,93%)
Hafnia sp.	0/259 (0)	8/63 (12,70%)
Alcaligenes faecalis	0/259 (0)	5/63 (7,93%)
Providencia alcalifaciens	0/259 (0)	3/63 (4,76%)
Pseudomonas sp.	0/259 (0)	2/63 (3,16%)
Negativas	89/259 (34,36%)	9/63 (14,28%)

Nº: número.

5.5 Identificação de ECP e ECN

Foram isoladas 58 (22,39%) linhagens de *Staphylococcus* spp. das 259 amostras de leite colhidas em 12 meses nas duas propriedades e uma linhagem de latão (Quadro 4).

Destas 58 linhagens de *Staphylococcus* isoladas, 48 (82,76%) foram classificadas como coagulase positivas e 10 (17,24%) coagulase negativas na da prova da coagulase em tubos utilizando plasma filtrado de coelho. Nove

coagulase positivos foram isolados da propriedade I e 39 coagulase positivos e 10 coagulase negativos da propriedade II.

As espécies de *Staphylococcus* coagulase positivos e negativos segundo as propriedades e presença ou não de mastite estão sumarizadas nos Quadros 5 e 6.

Quadro 5. Distribuição das espécies de ECP e ECN identificadas no leite de vacas de duas propriedades em sistema orgânico de produção. Botucatu, SP, 2011.

Propriedades Espécies	Propriedade I nº linhagens / total de linhagens (%)	Propriedade II nº linhagens / total de linhagens (%)	TOTAL DE LINHAGENS
ECP	9/9 (100,00%)	39/49 (79,60%)	48/58 (82,76%)
S. intermedius	3/9 (33,33%)	24/49 (48,98%)	27/58 (46,56%)
S. aureus	3/9 (33,33%)	10/49 (20,40%)	13/58 (22,42%)
S. aureus anaerobius	2/9 (22,22%)	2/49 (4,08%)	4/58 (6,88)
S. schleiferi coagulans	0/9	3/49 (3,12%)	3/58 (5,18)
S. hyicus	1/9 (11,11%)	0/49	1/58 (1,72%)
ECN	(0/9)	10/49 (20,40%)	10/58 (17,24%)
S. warneri	0	8/49 (16,32%)	8/58 (13,80%)
S. capitis urealyticus	0	1/49 (2,04%)	1/58 (1,72%)
S. epidermidis	0	1/49 (2,04%)	1/58 (1,72%)
TOTAL DE LINHAGENS	9 /9 (100,00%)	49/49 (100,00%)	58/58 (100,00%)

ECP: Estafilococos Coagulase Positivo; ECN: Estafilococos Coagulase Negativo; nº: número.

Quadro 6. Distribuição das espécies de ECP e ECN isoladas de vacas com e sem mastite, segundo o quarto mamário avaliado em criatórios com sistema orgânico de produção. Botucatu, SP, 2011.

Propriedades / Espécies	Propriedade I		Propriedade II	
	nº linhagens / total de linhagens (%)		nº linhagens / total de linhagens (%)	
ECP	MASTITE	NEGATIVO	MASTITE	NEGATIVO
S. intermedius	1/9 (11,11%)	2/9 (22,22%)	21/49 (42,12%)	3/49 (6,12%)
S. aureus	3/9 (33,33%)	0	9/49 (18,36%)	1/49 (2,04%)
S. aureus anaerobius	1/9 (11,11%)	1/9 (11,11%)	1/49 (2,04%)	1/49 (2,04%)
S. schleiferi coagulans	0	0	2/49 (4,08%)	1/49 (2,04%)
S. hyicus	0	1/9 (11,11%)	0	0
ECN	MASTITE	NEGATIVO	MASTITE	NEGATIVO
S. warneri	0	0	3/49 (6,12%)	5/49 (10,20%)
S. capitis urealyticus	0	0	1/49 (2,04%)	0
S. epidermidis	0	0	1/49 (2,04%)	0

ECP: Estafilococos Coagulase Positivo; ECN: Estafilococos Coagulase Negativo; nº: número.

Os valores de CCS e CBT de acordo com os micro-organismos estão apresentados nas tabelas 5 e 6. Apesar de não haver diferença estatística (p>0,05), foram observados maiores valores de CCS nos quartos mamários com resultado positivo no CMT, comparativamente aos CMT negativos.

Tabela 5. Número de amostras avaliadas, mediana, valores máximo e mínimo, e percentis 25 e 75 dos valores de contagem de células somáticas (x1000/mL) em duas propriedades de leite orgânico, segundo o resultado do exame microbiológico, em animais com CMT negativo. Botucatu, SP, 2011.

Microbiológico	**N**	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**	**P25**	**P75**
Corynebacterium bovis	15	158,0[a]	9,0	888,0	68,0	273,0
ECP	6	184,5[a]	69,0	409,0	126,0	347,0
Streptococcus sp.	4	480,0[a]	109,0	1872,0	252,0	1218,5
ECN	3	171,3[a]	92,0	217,0	92,0	217,0
Micrococcus sp.	2	132,0[a]	23,0	241,0	23,0	241,0
ECN/CB	1	359,0[a]	359,0	359,0	359,0	359,0
ECP/ECN	1	32,0[a]	32,0	32,0	32,0	32,0
ECP/*Streptococcus* sp.	1	4303,0[a]	4303,0	4303,0	4303,0	4303,0
ECP/*Micrococcus* sp.	1	519,0[a]	519,0	519,0	519,0	519,0
Negativo	96	118,0[a]	2,0	1003,0	52,0	197,5

Estatística: medianas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Kruskall-Wallis. ECP: Estafilococos Coagulase Positivo; ECN: Estafilococos Coagulase Negativo; CB: *Corynebacterium bovis;* N: número de amostras.

Tabela 6. Número de amostras avaliadas, mediana, valores máximo e mínimo, e percentis 25 e 75 dos valores de contagem de células somáticas (x1000/mL) em duas propriedades de leite orgânico, segundo o resultado do exame microbiológico, em animais com CMT positivo. Botucatu, SP, 2011.

Microbiológico	**N**	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**	**P25**	**P75**
Corynebacterium bovis	11	3197,0[a]	127,0	5797,0	1459,0	3986,0
ECP	21	786,0[a]	123,0	4064,0	547,0	1295,0
ECP/ECN	4	1279,0[a]	422,0	1950,0	728,0	1737,0
Streptococcus sp.	2	501,0[a]	475,0	527,0	475,0	527,0
Micrococcus sp.	2	932,0[a]	648,0	1216,0	648,0	1216,0
ECN	1	749,0[a]	749,0	749,0	749,0	749,0
ECP/*Micrococcus* sp.	1	1604,0[a]	1604,0	1604,0	1604,0	1604,0
ECP/CB/*Micrococcus* sp.	1	995,0[a]	995,0	995,0	995,0	995,0
ECN/*Micrococcus* sp./ *Streptococcus* sp.	1	939,0[a]	939,0	939,0	939,0	939,0
ECP/*Streptococcus* sp.	1	5854,0[a]	5854,0	5854,0	5854,0	5854,0
ECP/CB	1	1257,0[a]	1257,0	1257,0	1257,0	1257,0
Negativo	27	777,0[a]	39,0	9999,0	253,0	3253,0

Estatística: medianas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Kruskall-Wallis. ECP: Estafilococos Coagulase Positivo; ECN: Estafilococos Coagulase Negativo; CB: *Corynebacterium bovis;* N: número de amostras.

As análises comparativas entre a CCS, resultado do CMT e exame microbiológico negativo ou positivo estão apresentadas nas tabelas 7 e 8. Em ambas os valores de CCS são estatisticamente significativos no leite com resultado do CMT positivo.

Tabela 7. Número de amostras avaliadas, mediana, valores máximo e mínimo, e percentis 25 e 75 dos valores de contagem de células somáticas (x1000/mL) em duas propriedades de leite orgânico, segundo o resultado do California Mastitis Test (CMT), em animais com exame microbiológico negativo. Botucatu, SP, 2011.

Mastite	N	Mediana	Mínimo	Máximo	P25	P75
CMT negativo	96	118,0[a]	2,0	1003,0	52,0	197,5
CMT positivo	28	698,0[b]	39,0	9999,0	265,5	2757,5

Estatística: medianas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. N: número de amostras.

Tabela 8. Número de amostras avaliadas, mediana, valores máximo e mínimo, e percentis 25 e 75 dos valores de contagem de células somáticas (x1000/mL) em duas propriedades de leite orgânico, segundo o resultado do California Mastitis Test (CMT), em animais com exame microbiológico positivo. Botucatu, SP, 2011.

Mastite	N	Mediana	Mínimo	Máximo	P25	P75
CMT negativo	34	201,5[a]	9,0	4303,0	92,0	359,0
CMT positivo	47	1121,0[b]	123,0	5854,0	606,0	1857,0

Estatística: medianas seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney. N: número de amostras.

A influência do isolamento de ECP ou ECN sobre os constituintes do leite está demonstrada nas tabelas 9 e 10. Em ambas foi observada diferença estatística para o isolamento de ECP ou ECN em relação aos teores de lactose.

Tabela 9. Número de amostras avaliadas, média e desvio-padrão dos constituintes lácteos em duas propriedades de leite orgânico, segundo o isolamento de *Staphylococcus* coagulase positivo (ECP). Botucatu, SP, 2011.

Constituintes	Isolamento de ECP						Valor de P
	Negativos		IP		IM		
	N	X ± DP	N	X ± DP	N	X ± DP	
Gordura (%)	123	3,0[a] ± 1,7	27	3,0[a] ± 1,9	11	2,9[a] ± 1,1	0,9756
Proteína (%)	123	3,4[a] ± 0,4	27	3,5[a] ± 0,4	11	3,4[a] ± 0,3	0,6074
Lactose (%)	123	4,5[b] ± 0,3	27	4,3[ba] ± 0,5	11	4,1[a] ± 0,6	0,0008
Extrato seco (%)	123	11,9[a] ± 1,9	27	11,8[a] ± 2,1	11	11,4[a] ± 1,5	0,7223
ESD (%)	123	8,9[a] ± 0,5	27	8,9[a] ± 0,6	11	8,5[a] ± 0,6	0,0692

Estatística: médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey. IP: isolamento puro; IM: isolamento misto; ESD: extrato seco desengordurado; N: número de amostras; X: média; DP: desvio padrão.

Tabela 10. Número de amostras avaliadas, média e desvio-padrão dos constituintes lácteos em duas propriedades de leite orgânico, segundo o isolamento de *Staphylococcus* coagulase negativo (ECN). Botucatu, SP, 2011.

Constituintes	Isolamento de ECN						Valor de P
	Negativos		IP		IM		
	N	X ± DP	N	X ± DP	N	X ± DP	
Gordura (%)	123	3,0[a] ± 1,7	4	3,8[a] ± 2,3	7	3,2[a] ± 1,7	0,5764
Proteína (%)	123	3,4[a] ± 0,4	4	3,4[a] ± 0,5	7	3,5[a] ± 0,3	0,7763
Lactose (%)	123	4,5[b] ± 0,3	4	4,4[ba] ± 0,2	7	4,0[a] ± 0,4	0,0137
Extrato seco (%)	123	11,9[a] ± 1,9	4	12,7[a] ± 2,8	7	11,8[a] ± 1,7	0,7361
ESD (%)	123	8,9[a] ± 0,5	4	8,8[a] ± 0,6	7	8,5[a] ± 0,4	0,4488

Estatística: médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey. N: número de amostras; X: média; DP: desvio padrão; IP: isolamento puro; IM: isolamento misto; ESD: extrato seco desengordurado.

5.6 Perfil de sensibilidade microbiana e detecção de linhagens multirresistentes

Os maiores índices de sensibilidade das linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas do leite proveniente da propriedade I foram observados para ceftiofur (88,89%), oxacilina (88,89%) e sulfametoxazole/trimetoprim (88,89%). Coincidentemente, oxacilina (100,0%), ceftiofur (97,96%) e sulfametoxazole/trimetoprim (97,96%) também foram os antimicrobianos mais efetivos frente aos isolados da propriedade II.

Penicilina G e ampicilina foram os antimicrobianos menos efetivos frente aos isolados em ambas as propriedades. Nas linhagens da propriedade I, 88,89% apresentaram resistência para penicilina G e 66,66% para ampicilina, enquanto na propriedade II foram observadas 89,80% dos isolados resistentes para penicilina G e 57,14% para ampicilina (Tabela 11, Figura 11).

Multirresistência para três ou mais antimicrobianos foi observada em 5/9 (55,55%) linhagens de *Staphylococcus* coagulase positivos isoladas a partir de amostras de leite colhidas na propriedade I. Dentre as linhagens isoladas da propriedade II, 4/49 (8,16%) *Staphylococcus* spp., 3/49 (6,12%) ECP e 1/49 (2,04%) ECN foram multirresistentes para três ou mais antimicrobianos, enquanto um isolado ECP mostrou resistência múltipla a mais de cinco fármacos.

5.7 Teste de difusão com discos e CIM para detecção fenotípica de linhagens de MRS

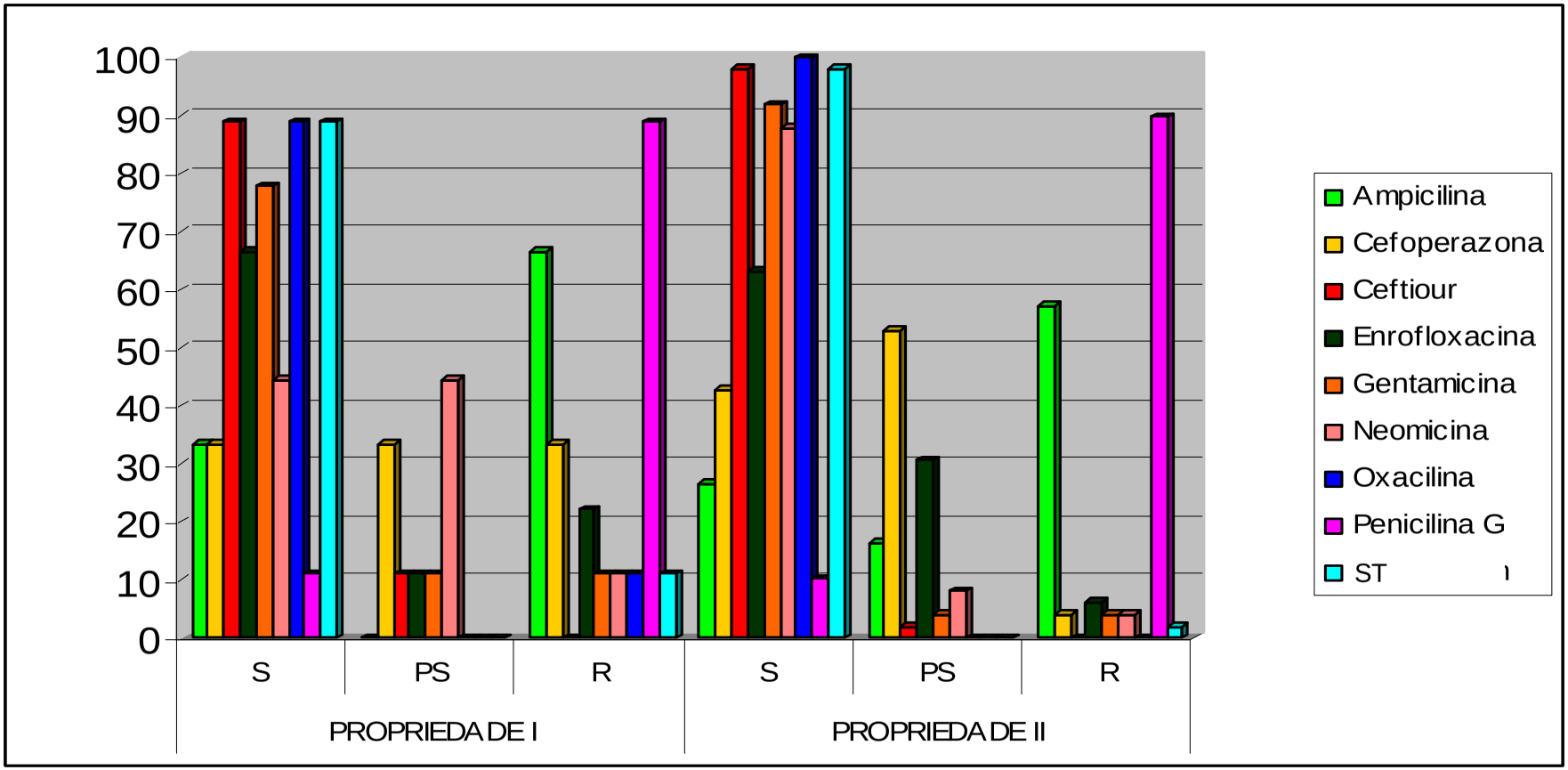
Somente uma linhagem de *S. aureus*, isolada da propriedade I, apresentou resistência na prova de difusão com disco e com a fita de oxacilina. Na propriedade II foram encontradas uma linhagem de *S. intermedius* e uma de *S. epidermidis* resistentes para difusão com disco de cefoxitina e uma linhagem de *S. warneri* com resistência intermediária na fita de oxacilina utilizada na detecção de isolados MRS (figura 12).

Tabela 11. Perfil de sensibilidade microbiana, na prova de difusão com discos, em estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas criadas em sistema orgânico, provenientes de duas propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Antimicrobianos	**Propriedade I**			**Propriedade II**		
	S	PS	R	S	PS	R
	nº linhagens/total de isolados (%)			nº linhagens /total de isolados (%)		
Ampicilina	3/9 (33,33%)	0/9 (-)	6/9 (66,66%)	13/49 (26,54%)	8/49 (16,32%)	28/49 (57,14%)
Cefoperazona	3/9 (33,33%)	3/9 (33,33%)	3/9 (33,33%)	21/49 (42,86%)	26/49 (53,06%)	2/49 (4,08%)
Ceftiour	8/9 (88,89%)	1/9 (11,11%)	0/9 (-)	48/49 (97,96%)	1/49 (2,04%)	0/49 (-)
Enrofloxacina	6/9 (66,66%)	1/9 (11,11%)	2/9 (22,22%)	31/49 (63,26%)	15/49 (30,62%)	3/49 (6,12%)
Gentamicina	7/9 (77,77%)	1/9 (11,11%)	1/9 (11,11%)	45/49 (91,84%)	2/49 (4,08%)	2/49 (4,08%)
Neomicina	4/9 (44,44%)	4/9 (44,44%)	1/9 (11,11%)	43/49 (87,76%)	4/49 (8,16%)	2/49 (4,08%)
Oxacilina	8/9 (88,89%)	0/9 (-)	1/9 (11,11%)	49/49 (100,0%)	0/49 (-)	0/49 (-)
Penicilina G	1/9 (11,11%)	0/9 (-)	8/9 (88,89%)	5/49 (10,20%)	0/49 (-)	44/49 (89,80%)
ST	8/9 (88,89%)	0/9 (-)	1/9 (11,11%)	48/49 (97,96%)	0/49 (-)	1/49 (2,04%)

* S: Sensível; PS: Parcialmente Sensível; R: Resistente; nº: número; %: porcentagem; ST: sulfametoxazole/trimetoprim.

Figura 11. Perfil de sensibilidade microbiana, na prova de difusão com discos, em estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas criadas em sistema orgânico, provenientes de duas propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.



* S: Sensível; PS: Parcialmente Sensível; R: Resistente; ST: sulfametoxazole/trimetoprim.

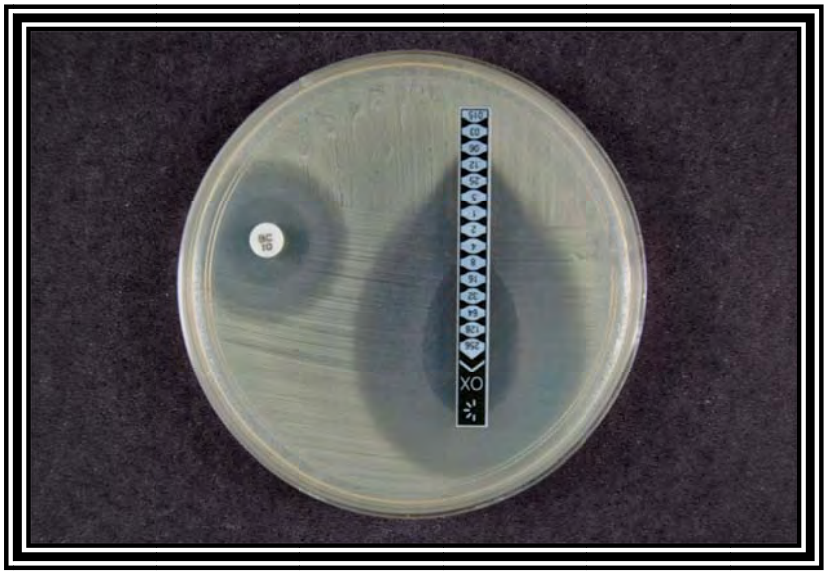


Figura 12. Pesquisa fenotípica da presença de resistência à meticilina em linhagem de ECP isolada de vaca em produção orgânica, utilizando o método de difusão com discos em ágar e fitas de oxacilina[3] (0,015 – 256 µg/mL). Botucatu, SP, 2011.

5.8 Detecção de hemolisinas

A detecção da produção de hemolisina foi realizada semeando todas as amostras de leite no meio de ágar sangue bovino desfibrinado 5%, mantidas em condições de aerobiose, a 37ºC, por três dias. Das 58 linhagens de *Staphylococcus* spp., 57 (98,27%) apresentaram hemólise total ao redor das colônias. Apenas a linhagem de *S. hyicus,* isolada de leite proveniente da propriedade I, não apresentou hemólise.

5.9 Detecção de gene de resistência e fatores de virulência

A presença do gene *mecA* foi observada em 8/58 (13,79%) linhagens de *Staphylococcus* spp., isoladas nas duas propriedades (figura 13). Destas, 7/8 (87,50%) foram classificadas como ECP e 1/8 (12,5%) como ECN (tabela 12).

O gene da enterotoxina A (*sea*) [figura 14] foi observado em 19/58 (32,75%) linhagens (tabela 12), 15/19 (78,94%) ECP e 4/19 (21,06%) ECN. O gene da enterotoxina B (*seb*) foi encontrado em 2/58 (3,44%) isolados de ECP. O gene da enterotoxina C (*sec*) [figura 15] foi detectado em 23/58 (39,65%)

[3] Oxoid M.I.C.Evaluator

linhagens (tabela 12). Destas, 18/23 (78,26%) foram classificadas como ECP e 5/23 (21,74%) como ECN. O gene codificador da enterotoxina D (*sed*) foi observado em 2/58 (3,44%) isolados de ECP. Todos os isolados de *Staphylococcus* spp. foram negativos para a presença do gene *tsst-1* (tabela 12).

Em nenhuma das 17 linhagens de *S. aureus* foi encontrado o gene *mecA*. *sea* foi observado em 5/17 (29,41%) linhagens, *seb* em 1/17 (5,88%), *sec* em 4/17 (23,52%) e *sed* em 1/17 (5,88%) [tabela 12]. Nas demais 10/17 (58,82%) linhagens de *S. aureus* não foi detectado nenhum dos genes pesquisados. A associação entre os genes *sea* e *sec* foi encontrada em 2/17 (11,76%) linhagens e a associação *sea*, *seb* e *sec* em 1/17 (5,88%).

Das 27 linhagens de *S. intermedius*, o gene *mecA* foi detectado em 6/27 (22,22%), *sea* em 8/27 (29,62%), *seb* em 1/27 (3,70%), *sec* em 13/27 (48,14%), *sed* em 1/27 (3,70%) [tabela 12], enquanto em 9/27 (33,33%) linhagens nenhum dos genes pesquisados foi encontrado. Os genes *sea* e *sec* foram encontrados em associação em 4/27 (14,81%), enquanto que a associação *mecA* e *sea* e *mecA* e *sec* foram encontradas, cada uma, em 1/27 (3,70%).

Dentre as três linhagens de *S. schleiferi coagulans,* em 1/3 (33,33%) foi encontrado o gene *mecA*. O gene codificador para enterotoxina A (*sea*) foi detectado em 2/3 (66,66%) isolados e em 1/3 (33,33%) foi observado *sec* (tabela 12). A associação entre os genes *sea* e *sec* foi encontrada em 1/3 (33,33%).

Na única linhagem de *S. hyicus* isolada foi detectado o gene *sea* (tabela 12).

Dentre os ECN, as oito linhagens de *S. warneri* não apresentaram o gene codificador para resistência à meticilina, 3/8 (37,50%) apresentaram *sea*, 4/8 (50,0%) *sec* (tabela 12) e 3/8 (37,50%) não apresentaram nenhum gene pesquisado. A associação *sea* e *sec* foi encontrada em 2/8 (25,0%) linhagens. A única estirpe de *S. capitis urealyticus* isolada não apresentou qualquer gene analisado. Na linhagem de *S. epidermidis* foram identificados simultaneamente os genes *mecA*, *sea* e *sec*.

Das 58 linhagens de *Staphylococcus* spp. identificadas, em 34 (58,62%) foi detectado pelo menos um gene investigado. As enterotoxinas A,

B, C ou D foram encontradas em 32/58 (55,17%) das linhagens. Destas, 12/32 (37,5%) apresentaram genes para duas ou mais enterotoxinas. A associação entre o gene *mecA* e pelo menos uma enterotoxina foi encontrada em 6/8 (75,0%) das linhagens ou em 6/58 (10,34%) do total de linhagens isoladas. A presença simultânea dos genes codificadores para as enterotoxinas A e C foi observada em 10/58 (17,24%) linhagens de *Staphylococcus* spp. (tabela 13). Em 24/58 (41,37%) das linhagens isoladas, não foi detectado nenhum dos genes pesquisados.

O gene *mecA* foi observado em 8/58 (13,79%) linhagens. Destas 6/8 (75,0%) foram caracterizadas como *S. intermedius*, 1/8 (12,50%) como *S. schleiferi coagulans* e 1/8 (12,50%) como *S. epidermidis*.

Uma linhagem de *S. aureus* (1/58 – 1,72%) apresentou-se resistente no teste de disco difusão e de concentração inibitória mínima com fitas de oxacilina. 1/58 (1,72%) linhagem de *S. intermedius* foi resistente para o disco de cefoxitina. Uma linhagem de *S. warneri* (1/58 – 1,72%) apresentou resistência intermediária na fita de oxacilina. O gene *mecA* foi encontrado em uma linhagem de *S. epidermidis* (1/58 – 1,72%) que também apresentou resistência para o disco de cefoxitina.

Um total de 3/58 (5,16%) linhagens isoladas foi resistente em um teste de susceptibilidade a oxacilina ou cefoxitina sendo negativas para a presença do gene *mecA*.

Dentre as 8/8 (100,0%) linhagens detentoras do gene *mecA*, 6/8 (75,0%) apresentaram genes codificadores para pelo menos uma das enterotoxinas pesquisadas. A associação *mecA* e *sec* apareceu em 4/8 (50,0%) das linhagens avaliadas.

Tabela 12. Gene de resistência e marcadores de virulência investigados em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas do leite de vacas criadas em sistema orgânico de produção. Botucatu, SP, 2011.

Gene	***mecA***	***tsst-1***	***sea***	***seb***	***sec***	***sed***
	nº linhagens / nº total de linhagens (%)	**nº linhagens / nº total de linhagens (%)**	**nº linhagens / nº total de linhagens (%)**	**nº linhagens / nº total de linhagens (%)**	**nº linhagens / nº total de linhagens (%)**	**nº linhagens / nº total de linhagens (%)**
ECP						
S. aureus	-	-	5/17 (29,41%)	1/17 (5,88%)	4/17 (23,52%)	1/17 (5,88%)
S. intermedius	6/27 (22,22%)	-	8/27 (29,62%)	1/27 (3,70%)	13/27 (48,14%)	1/27 (3,70%)
S. schleiferi coagulans	1/3 (33,33%)	-	1/3 (33,33%)	-	1/3 (33,33%)	-
S. hyicus	-	-	1/1 (100,0%)	-	-	-
ECN						
S. warneri	-	-	3/8 (37,50%)	-	4/8 (50,0%)	-
S. epidermidis	1/1 (100,0%)	-	1/1 (100,0%)	-	1/1 (100,0%)	-
S. capitis urealyticus	-	-	-	-	-	-
Total	8/58 (13,79%)	-	19/58 (32,75%)	2/58 (3,44%)	23/58 (39,65%)	2/58 (3,44%)

mecA: gene codificador de resistência para meticilina; *tsst-1:* gene codificador para toxina da síndrome do choque tóxico 1; *sea*: gene codificador da enterotoxina A; *seb*: gene codificador da enterotoxina B; *sec*: gene codificador da enterotoxina C; *sed*: gene codificador da enterotoxina D; nº : número; ECP: estafilococos coagulase positiva; ECN: estafilococo coagulase nagtiva.

Tabela 13. Associações entre diferentes genes de enterotoxinas e resistência a oxacilina (*mecA*) investigados em 58 linhagens de *Staphylococcus* spp. isolados do leite de vaca em duas propriedades orgânicas. Botucatu, SP, 2011.

Genes	*sea*	*sec*	*sed*	*sea + sec*	*sea + seb + sec*	SA
mecA	1	4	0	1	0	2
SA	6	7	2	10	2	17

* SA: sem associação. *sea*: gene codificador da enterotoxina A; *seb*: gene codificador da enterotoxina B; *sec*: gene codificador da enterotoxina C; *sed*: gene codificador da enterotoxina D; *mecA*: gene codificador de resistência para meticilina.

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *mecA* em linhagens de ECN isoladas do leite de vacas de propriedades orgânicas localizadas no interior do estado de São Paulo. 1-17: linhagens de ECNs; 18: controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591); 19: negativo (*S. aureus* ATCC 25923); 20: 100 pb DNA ladder. Botucatu, 2011.

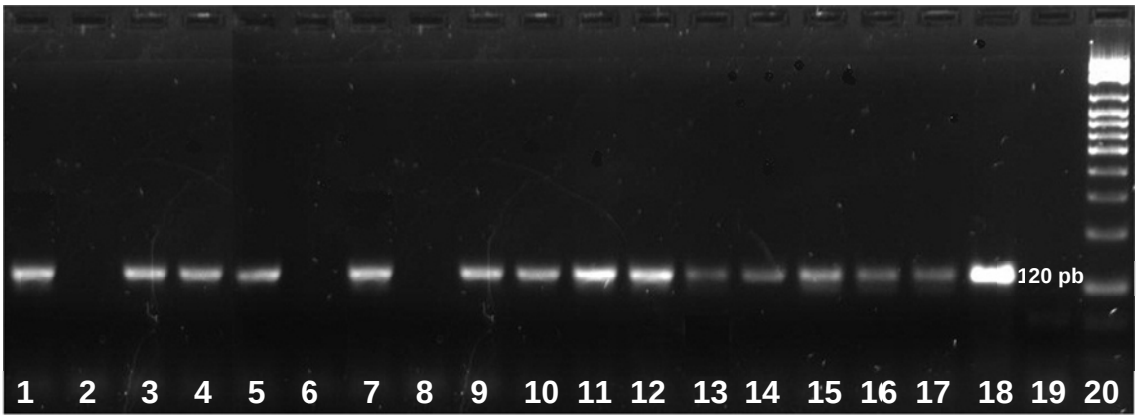


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *sea* em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas do leite de vacas de propriedades orgânicas localizadas no interior do estado de São Paulo. 1-17: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 18: controle positivo (ATCC 13565); 19: controle negativo (Água MilliQ esterilizada); 20: 100 pb DNA ladder. Botucatu, 2011.

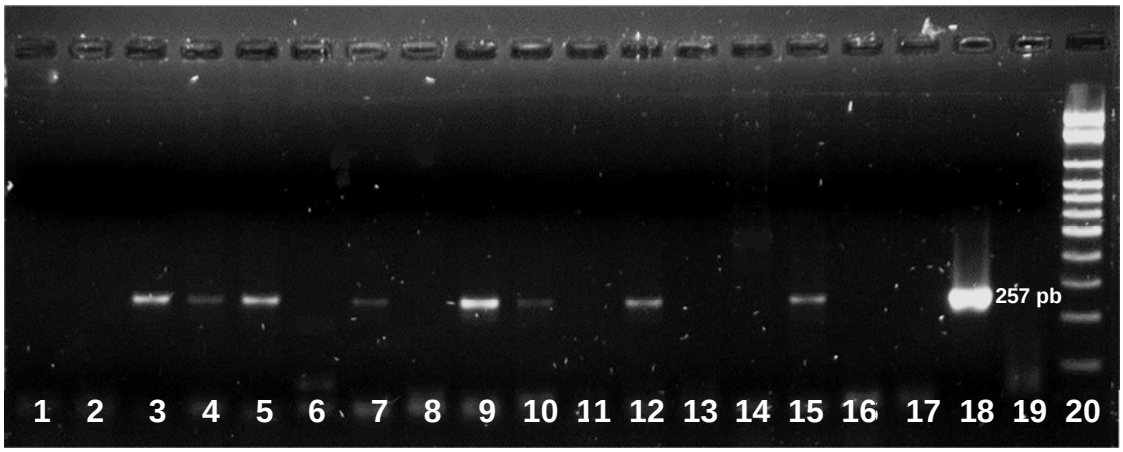


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *sec* em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas do leite de vacas de propriedades orgânicas localizadas no interior do estado de São Paulo. 1-17: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 18: controle positivo (ATCC 19095); 19: controle negativo (Água MilliQ esterilizada); 20: 100 pb DNA ladder. Botucatu, 2011.

Discussão

6. DISCUSSÃO

A mastite subclínica em vacas gera graves perdas econômicas e aumento nas contagens celulares do leite. Pode ser considerada uma forma silenciosa de prejuízo, pois não há mudanças visíveis no úbere ou no aspecto do leite (Dias, 2007). Diversos autores, principalmente da Europa – berço da agricultura orgânica -, têm ressaltado para alta prevalência da mastite subclínica neste sistema de produção pecuária (Busato et al., 2000; Hamilton et al., 2006; Bennedsgaard et al., 2006; Roesch et al., 2006, 2007). A ocorrência de mastite subclínica em vacas em sistema orgânico é justificada, em parte, pela restrição no uso de antimicrobianos para o tratamento das mastites na lactação, bem como para a terapia/profilaxia da "vaca seca" (Roesch et al. 2007). Os achados do presente estudo estão em consonância com os resultados de estudo da mastite em vacas produtoras de leite orgânico na Europa, uma vez que 48,27% dos tetos avaliados apresentaram mastite subclínica, contra somente 0,77% de mastite clínica.

O predomínio de animais com mastite subclínica pressupõe maior isolamento de micro-organismos do grupo dos contagiosos, dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Corynebacterium bovis*. Devido ao habitat deste grupo de micro-organismos ser constituído pela mucosa e pele dos animais, as infecções mamárias em vacas pelos contagiosos, geralmente ficam restritas a forma subclínica, provavelmente pela adaptação destas bactérias a mucosa da glândula mamária, ao contrário dos ambientais que comumente exteriorizam sinais de mastite clínica (Ribeiro, 2008).

Vaarst e Enevoldsen (1997), na Dinamarca, descreveram a associação de *S. aureus* e ECN com mastite subclínica em bovinos criados em sistema orgânico. Hamilton et al. (2006) isolaram *Staphylococcus* spp. em mais de 50% das amostras de leite colhidas em propriedades orgânicas da Suécia. Bennedsgaard et al. (2006) recuperaram *Staphylococcus* em aproximadamente 30% do leite orgânico colhido em fazendas da Dinamarca. Roesch et al. (2007) isolaram *S. aureus* em 49% e ECN em 55% das amostras de leite provenientes de propriedades suiças certificadas como orgânicas. Bombyk et al. (2008) isolaram espécies de *Staphylococcus* em 47,7% das amostras de leite orgânico provenientes dos EUA, representando o micro-organismo mais frequentemente isolado nas propriedades envolvidas no levantamento. De maneira similar, nas

propriedades orgânicas amostradas no presente estudo no estado de São Paulo, *Staphylococcus* spp. (22,39%) também foi o micro-organismo mais freqüente isolado comparativamente aos outros agentes de mastite, reforçando também o predomínio deste gênero de micro-organismo nas infecções mamárias em vacas em sistema orgânico.

S. aureus e *S. intermedius* estão entre os estafilococos mais prevalentes na casuística da mastite em bovinos (Radostits et al., 2007; Winn Jr. et al., 2008). *S. intermedius* foi detectado em 46,56% das linhagens do gênero *Staphylococcus* isoladas das propriedades I e II. Estes micro-organismos possuem como habitat a microbiota da pele e mucosas de diversas espécies animais, principalmente cães. Porém, de forma oportunista, estão relacionados com diversas infecções em animais de produção, particularmente na glândula mamária de ruminantes domésticos (Winn Jr. et al., 2008).

Estima-se que *S. aureus* cause entre 30 e 40% das infecções mamárias em ruminantes produtores de leite (Asperger e Zangerl, 2003), além de ser o principal agente causal de infecções nosocomiais em humanos (Aarestrup et al., 2001). *S. aureus* foi isolado em 21,9% das amostras de leite colhidas de vacas em sistema convencional na Turquia (Kirkan et al., 2005) e em 28,33% no Paquistão (Moniri et al., 2007). Ferguson et al. (2007), na Itália, descreveram *S. aureus* em 20,6% das amostras de leite de vacas com mastite colhidas em ordenha convencional. No Brasil, em propriedades convencionais no Sergipe, Oliveira et al. (2009) isolaram *S. aureus* em 21,95% das amostras de leite de vacas com mastite. No presente estudo, 22,42% das 58 linhagens de *Staphylococcus* isoladas foram classificadas como *S. aureus*, ressaltando a alta presença deste micro-organismo em vacas no sistema orgânico de produção.

Nas últimas décadas, os estafilococos coagulase negativos eram considerados patógenos menores (Radostits et al., 2007). No entanto, estudos recentes indicam a emergência de ECN na gênese das mastites, clínicas e subclínicas, associados com danos ao tecido secretor de leite (Moon et al., 2007a; Sawant et al., 2009). Schultz et al. (2004) identificaram 78,0% de ECN dentre 202 bactérias isoladas em amostras de leite de vacas criadas no sistema convencional. Na Turquia foram isoladas 28,33% linhagens de *S. aureus* e 20% de ECN em vacas criadas em sistema convencional (Kirkan et

al., 2005). Na Itália, Ferguson et al. (2007) descreveram o predomínio de ECN (22,6%) em amostras de leite convencional. Nas 58 linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas nas duas propriedades orgânicas amostradas, ECP representaram 82,76% (22,42% *S. aureus*) e os ECN 17,24%. Diferentes autores têm destacado a emergência dos ECNs como agentes patogênicos, notadamente pelos prejuízos provocados com o aumento na CCS e alteração nos teores dos constituintes do leite (Gentilini et al., 2002). No entanto, o número restrito de estudos com classificação de coagulase positivos ou negativos em *Staphylococcus* isolados de vacas em sistema orgânico, limitaram confrontar os resultados do presente estudo em relação a presença de ECP e ECN.

As espécies de ECNs mais freqüentes isoladas de mastite bovina são *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. xylosus* e, em menor freqüência, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. capitis*, *S. saprophyticus* e *S. lentus* (Radostits et al., 2007).

Staphylococcus warneri foi identificado em 80% (8/10) das linhagens de ECN isoladas dos animais estudados, com e sem mastite, representando 13,80% das 58 linhagens de *Staphylococcus* sp. isoladas. Luthje e Schwars (2006) também isolaram *S. warneri* de 13,2% das amostras de leite de vacas criadas no sistema convencional. Bal et al. (2010) isolaram oito (8,0%) linhagens de *S. warneri* a partir de leite bovino convencional proveniente de vacas com mastite subclínica. No Brasil, Belotti et al. (1991) e Machado et al. (2008) encontraram, respectivamente, 5,0% e 1,8%, das amostras de ECN caracterizadas como *S. warneri* em vacas com e sem mastite criadas em sistema convencional. As infecções mamárias por *S. warneri* geralmente são persistentes, com elevação das contagens celulares e diminuição da qualidade do leite (Taponem et al., 2008; Pyorala e Taponem, 2009; Thorberg et al., 2009), restritos à forma subclínica de mastite (Radostits et al., 2007). No entanto, podem ser isolados de leite não mastítico, visto que estão presentes na microbiota da pele dos tetos e do úbere dos bovinos (Boddie et al., 1987; Radostits et al., 2007; Taponem e Pyorala, 2009), assim como na pele de humanos (Winn Jr. et al. 2008). O isolamento de *S. warneri* nas propriedades orgânicas do estado de São Paulo, à semelhança de estudos de outros países,

denota o envolvimento desta espécie de estafilococo nas infecções mamárias em vacas.

Udo et al. (1999), no Kwait, encontraram *S. warneri* em 20,6% dos isolados obtidos das mãos de manipuladores de alimentos. No Brasil, Cunha et al. (2006) isolaram 20 linhagens de ECNs em leite e queijo branco coletadas de supermercados da cidade de Botucatu, das quais, quatro (20%) foram classificadas como *S. warneri*. Esses achados sugerem a possibilidade de veiculação de *S. warneri* pelas mãos dos ordenhadores, bem como risco de estafilococcias em humanos decorrente da manipulação inadequada do leite, ou contaminação durante os processos de embalagem, armazenagem e/ou distribuição de produtos e derivados.

S. epidermidis foi isolado somente em 1/58 (1,72%) amostra de leite de vaca com mastite subclínica nas propriedades orgânicas amostradas. Bal et al. (2010) encontrarm 2/100 (2,0%) *S. epidermidis* em leite bovino convencional com mastite subclínica. Gillespie et al. (2009) identificaram 10% de *S. epidermidis* entre 383 ECNs isolados em três rebanhos leiteiros convencionais. Estas espécies de estafilococos são consideradas habitantes normais da pele e membranas mucosas de animais (Radostits et al., 2007) e de humanos. Tem sido isoladas também de alimentos (Bergdoll, 1995). No Brasil, Cunha et al. (2006) identificaram *S. epidermidis* em 20% das linhagens de ECNs isoladas de alimentos processados disponibilizados para o consumo. A presença de ECNs em alimentos já processados indica também para o risco de toxinfecções alimentares por estes micro-organismos.

S. capitis é considerado agente secundário na gênese das mastites bovinas. Mathews et al. (1990) identificaram o micro-organismo em menos de 1% das linhagens de ECNs de origem bovina. Stamford et al. (2006) identificaram *S. capitis* em 1,8% dentre 109 linhagens de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite bovino em criação convencional. Feßler et al. (2010) isolaram 121 ECN de casos de mastite bovina, dos quais, somente um isolado foi classificado como *S. capitis*. Das 58 linhagens de *Staphylococcus* sp. isoladas nas duas propriedade orgânicas estudadas, apenas 1,72% foram caracterizadas como *S. capitis*. À semelhança de *S. warneri*, a baixa freqüência de isolamento de *S. capitis* no presente estudo indica o reduzido envolvimento deste micro-organismo nas infecções mamárias em vacas.

Nenhuma amostra de leite acusou o isolamento de *E. coli* no ágar MacConkey. Ribeiro et al. (2009) também não observaram o isolamento deste micro-organismo no leite de quatro pequenas propriedades orgânicas do interior do estado de São Paulo. Este resultado sinaliza para a baixa participação deste micro-organismo nas infecções mamárias em vacas no sistema orgânico. Ademais, Philpot e Nickerson (2002) afirmaram que há uma tendência mundial na diminuição das mastites causadas por micro-organismos ambientais, particularmente *E. coli*, em virtude da adoção de boas práticas de manejo na ordenha.

A preocupação com linhagens bacterianas resistentes aos antimicrobianos é tema frequente no meio científico (Brito et al., 2001). A OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) recomenda o monitoramento da sensibilidade microbiana aos fármacos de uso corrente no tratamento de bactérias patogênicas e comensais isoladas de animais domésticos (Acar e Rostel, 2001).

Ceftiofur e oxacilina foram os antimicrobianos mais efetivos (>88,0%) frente às linhagens de estafilococos nas duas propriedades estudadas, fato também verificado por Hendriksen et al. (2008) onde estes fármacos apresentaram mais de 90,0% de eficácia para linhagens de *S. aureus* isolados de leite convencional. De maneira similar, Sawant et al. (2009) também observaram alta efetividade de ceftiofur e oxacilina frente aos ECNs isolados de casos de mastite bovina na Coréia. No Brasil, Ribeiro et al. (2009) observaram que o perfil de sensibilidade em linhagens bacterianas obtidas de vacas em sistema orgânico mostrou que ceftiofur (95,2%), oxacilina (84,2%), gentamicina (76,3%) e cefoperazona (70,3%) foram os antimicrobianos mais efetivos frente aos isolados. Estes achados reforçam a efetividade da cefalexina e oxacilina em estafilococos isolados de vacas mantidas em sistema orgânico de produção, bem como o uso destes fármacos como de eleição em graves infecções mamárias, ainda que estes animais sejam retirados da produção orgânica.

Em contraste, Tikofsky et al. (2003) nos EUA encontraram, respectivamente, 28,0% e 29,0% de resistência para ampicilina e penicilina G entre as linhagens de *Staphylococcus* provenientes de amostras de leite orgânico. Na Suiça, Roesch et al. (2006) identificaram mais de 30,0% das

linhagens de *Staphylococcus* isolados de propriedades orgânicas resistentes a penicilina G. Bennedsgaard et al. (2006), na Dinamarca, encontraram ao redor de 12,0% de linhagens de *S. aureus* resistentes para a penicilina, tanto em propriedades leiteiras no sistema orgânico como no convencional. Bombyk et al. (2008) descreveram que 15,5% das linhagens de *Staphylococus* sp isoladas de leite orgânico em propriedades dos EUA foram resistentes para penicilina G.

No Brasil, Ribeiro et al. (2009) verificaram altas taxas de resistência para penicilina G (53,5%), ampicilina (41,6%) e neomicina (38,6%) no leite de 148 vacas, de quatro pequenas propriedades certificadas como orgânicas do estado de São Paulo. No mesmo estudo foi verificada multirresistência a três ou mais antimicrobianos em 40 (39,6%) linhagens bacterianas. Estes achados são equivalentes aos obtidos no presente estudo, já que as maiores taxas de resistência dos isolados obtidos das propriedades de leite orgânico também foram observadas para penicilina G (>88,0%) e ampicilina (>57,0%) e a multirresistência para três ou mais antimicrobianos foi observada em 55,55% das linhagens de estafilococos da propriedade I e em 8,16% da propriedade II. De acordo com o Siegel et al. (2006) micro-organismos com resistência múltipla a drogas são caracterizados quando apresentam resistência para mais que uma classe de antimicrobiano testada. Na presente pesquisa encontramos multirresistência principalmente para antimicrobianos do grupo dos β-lactâmicos, no entanto, a alta prevalência de resistência para três ou mais antimicrobianos, mesmo que da mesma classe, deve ser levada em consideração, posto que a grande maioria dos anti-mastíticos tem em sua formulação uma droga do grupo dos β-lactâmicos.

Apesar da proibição do uso de antimicrobianos em vacas no sistema orgânico, a presença de multirresistência dos estafilococos isolados do leite indica provável uso indevido de antimicrobianos no tratamento das vacas dos plantéis estudados. Este resultado pode encontrar justificativa em que estas propriedades possuem poucos anos certificadas como orgânicas, e podem guardar ainda algumas mazelas de uso indevido de antimicrobianos na prática de tratamentos nos animais, que aumentam a pressão seletiva para a resistência múltipla dos isolados, particularmente para os antimicrobianos convencionais, como ampicilina e penicilina. Outrossim, mesmo diante da certificação das propriedades como orgânicas, os isolados multirresistentes de

estafilococos podem ter permanecido em infecções crônicas nos animais ou nos equipamentos e utensílios de ordenha.

A década de 1940 marcou o aparecimento de resistência bacteriana para a penicilina. Desde então, os mecanismos de resistência são objeto de estudo e motivo de preocupação para profissionais da saúde. A emergência e o aumento da resistência aos antimicrobianos no Brasil e no mundo apontam para a necessidade de estudos continuados do perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de humanos e animais (Dzidic e Bedekovic, 2003; Livermore e Pearson, 2007). O uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento das mastites pode induzir o aparecimento de micro-organismos resistentes, além de comprometer a eficácia dos tratamentos instituídos (Barberio et al., 2002).

A pesquisa de *Staphylococcus* meticilina resistentes (MRS) é assunto emergente em medicina humana. Nos animais, os estudos das linhagens MRS são recentes, embora existam evidências do risco da transmissão de estirpes MRS entre animais de companhia e seus proprietários (Weese et al., 2006; Juhász-Kaszanyitzky et al., 2007; VanLoo et al., 2007). A meticilina foi introduzida em 1961 para ser utilizada contra linhagens de *S. aureus* produtoras de penicilinases. Porém, os relatos de resistência foram descritos poucos anos após o uso do fármaco (Schito, 2006). Diferentes estudos têm mostrado o isolamento de MRS em rebanhos bovinos, granjas de suínos e de frangos, além de alimentos de origem animal provenientes de supermercados (Lee, 2003; Kitai et al., 2005; Normanno et al., 2007; Stein, 2009).

Nunes et al. (2006), em Portugal, avaliaram a sensibilidade antimicrobiana de 30 linhagens de *S. aureus* e 31 *S. epidermidis* isoladas de animais com mastite subclínica, criados em sistema convencional. A produção de β-lactamases foi detectada em 20 *S. aureus* (66,7%), todos resistentes para penicilina. Dos 31 *S. epidermidis*, 24 (77,4%) foram β-lactamases positivos. Nove (29,03%) *S. epidermidis* foram resistentes para oxacilina. Na presente pesquisa, mais de 88,0% dos estafilococos apresentaram resistência para a penicilina na prova de difusão com discos e mais de 57% para ampicilina, caracterizando resistência, principalmente para β-lactâmicos.

No mesmo estudo, Nunes et al. (2006) observaram 100% de sensibilidade de *S. aureus* isolados de mastite para oxacilina e 71,0% de ECN.

Resultados similares foram obtidos na presente pesquisa, pois mais de 88,0% das linhagens de *Staphylococcus* spp. foram sensíveis a oxacilina. Em contraste, baixa porcentagem de linhagens meticilina resistentes tem sido descrita em *Staphylococcus* isolados de mastite bovina (Nunes et al., 2006). Bal et al. (2010) encontraram somente 1,22% das linhagens de ECNs isoladas de mastite bovina subclínica carreando o gene *mecA*.

A prova fenotípica de difusão com discos tem sido pouco eficiente para predizer a presença de *mecA* em estafilococos quando comparada com a PCR (Swenson e Tenover, 2005; Bemis et al., 2006; Zhang et al., 2011). Desta forma, a investigação do gene é fundamental para avaliar a presença de MRS entre linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite orgânico. O gene *mecA* foi detectado em 13,79% (8/58) das amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas das duas propriedades orgânicas amostradas e, dentre estas, apenas uma linhagem também apresentou resistência para o disco de cefoxitina. 7/8 (87,50%) isolados *mecA* positivosforam classificados como ECPs e 1/8 (12,5%) ECN. Estes achados indicam alta prevalência de MRS entre os isolados obtidos de leite bovino em produção orgânica nas propriedades estudadas. Estudo desenvolvido com ECNs isolados de casos de mastite bovina na Coréia, o gene *mecA* foi identificado em 32,43% das linhagens (Sawant et al., 2009), destacando maior prevalência deste gene de resistência nas linhagens de estafilococos de leite convencional comparativamente as propriedades orgânicas.

Walther e Perreten (2007) relataram a identificação de duas linhagens de *S. epidermidis* resistentes à meticilina isolados de vacas com mastite subclínica em sistema orgânico de produção. Ambas as linhagens apresentaram resistência para oxacilina e o gene *mecA*. Coincidentemente, no presente estudo, a resistência para oxacilina e a presença do gene *mecA* foram observadas em uma linhagem de *S. epidermidis* isolada de leite de vaca com mastite subclínica. Em produção de leite convencional a presença de *S. epidermidis* carreando e/ou expressando o gene *mecA* também tem sido descrita (Juhász-Kaszanyitsky et al., 2004; Bengtsson et al., 2009). A presença do gene *mecA* em isolados de ECP e ECN no presente estudo evidencia o risco de transmissão para os humanos, pelo leite, de isolados contendo este gene de resistência, principalmente em animais com mastite subclínica, cujo

leite pode, inclusive, ser destinado ao consumo ou a produção de derivados lácteos, ou mesmo pelo manejo diário desses animais.

As enterotoxinas estafilocócicas são responsáveis por intoxicações alimentares no mundo todo (Silva et al., 2005). São consideradas exotoxinas termoestáveis protéicas da família das toxinas pirogências ou superantígenos (Becker et al., 2001). Diversos estudos têm reportado *Staphylococcus* sp. produtores de enterotoxinas isolados de mastite bovina (Magalhães Lopes et al., 1990; Larsen et al., 2000; Stephan et al., 2001; Silva et al., 2005). Neste contexto, o leite e seus derivados são os alimentos mais envolvidos em surtos de intoxicações alimentares, representando cerca de 2/3 dos casos (Loir et al., 2003). A ingestão das toxinas EEA e EED é responsável pela maioria das toxinfecções (Zoli et al., 2002).

Cenci-Goga et al. (2003) encontraram 22 (14.0%) linhagens de *Staphylococcus* isoladas de vacas de leite nos EUA produtoras de enterotoxinas, das quais, sete produtoras de EEC, 12 de EED e três de EEC e EED. Adwan et al. (2005), na Palestina, encontraram 10,8% das linhagens de *S. aureus* isoladas de leite cru convencional carreando *sea*, 54,1% *seb*, 10,8% *sec* e 16,2% *sed*. Jorgensen et al. (2005b) encontraram genes para enterotoxinas em 52,5% dos isolados de leite de tanques de expansão na Noruega. Hata et al. (2006) observaram pelo menos um gene para toxinas em 74,90% dos 231 *S. aureus* isolados de leite mastítico de bovinos no Japão, nos quais a enterotoxina C foi detectada em 109/231 (47,18%) linhagens. Srinivasan et al. (2006) encontraram 73/78 (93,6%) de *S. aureus* isolados de mastite no Tennessee (EUA) carreando uma ou mais toxinas. Destas, SED foi encontrada em 41/78 (52,60%) linhagens e SEB em 1/78 (1,3%). Na Turquia, Karahan et al. (2009) encontraram genes para pelo menos uma enterotoxina em 29,3% de *S. aureus* isolados de vacas com mastite criadas no sistema convencional. Além das enterotoxinas, *tsst* foi encontrado em 3,3% das linhagens. No presente estudo, 55,17% das linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite orgânico de animais com e sem mastite apresentaram pelo menos um gene para as enterotoxinas pesquisadas (A, B, C e D). Os genes codificadores para EEC (*sec*) foram mais encontrados, seguidos dos codificadores de EEA (*sea*). Nenhuma linhagem recuperada das propriedades orgânicas apresentou o gene para a toxina da síndrome do choque tóxico.

No Brasil, dentre 127 linhagens de *S. aureus* isoladas de casos de mastites em rebanhos convencionais de municípios de Minas Gerais, 47% produziram pelo menos uma enterotoxina pesquisada (EEA, EEB, EEC e EEE) [Cardoso et al., 2000]. Silva et al. (2005) investigaram a presença de genes para as enterotoxinas A, B e C em 64 isolados de *S. aureus* isolados de mastite bovina. Os genes das toxinas A e B em conjunto foram encontradas em quatro (6,3%) linhagens e da toxina C em duas (3,1%). Santana et al. (2010) isolaram 51 *Staphylococcus* spp. em 101 amostras de leite cru bovino provenientes de Londrina, PR, e Pelotas, RS. Destas, 27,45% (14/51) possuiam o gene *sea*. Oliveira et al. (2011) encontraram 19,0% das 574 linhagens de *Staphylococcus* isoladas de amostras de leite cru de vacas de rebanhos nacionais com potencial enterotoxigênico. Destas, 68,80% produziram EED e 12,80% EEA. No presente estudo, *sea* foi detectado em 32,75% das linhagens de *Staphylococcus* isoladas, *seb* em 3,44%, *sec* em 39,65% e *sed* em 3,44%.

Apesar das divergências no número de isolados em relação as toxinas, a enterotoxina A tem se mostrado a principal toxina envolvida nos surtos alimentares em humanos (Balaban e Rasooly, 2000), enquanto EEC frequentemente é detectada em linhagens isoladas de casos de mastite bovina (Jorgensen et al., 2005b). A associação entre os genes codificadores das enterotoxinas A e C foi mais freqüente nas linhagens isoladas das duas propriedades orgânicas estudadas. Também foi possível observar que dentre oito linhagens positivas para o gene *mecA*, 6/8 (75,0%) apresentaram pelo menos um gene codificador para as enterotoxinas analisadas (A, B, C ou D), sendo que em 4/8 (50,0%) linhagens houve associação com *sec*.

As variações geográficas podem influenciar na ocorrência de genes para toxinas em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite (Cenci-Goga et al., 2003; Silva et al., 2005; Srinivasan et al., 2006). No entanto, a presença destas enterotoxinas em leite produzido no sistema orgânico, principalmente associada com genes de resistência para antimicrobianos, alerta para o risco em consumir leite cru e derivados contaminados com potentes toxinas estafilocócicas e para a dificuldade de tratamento das infecções causadas por estas linhagens.

Srinivasan et al. (2006) encontraram 93,6% de *S. aureus* isolados de vacas criadas em sistema convencional com mastite no Tennessee (EUA)

carreando uma ou mais toxinas, das quais TSST-1 foi encontrada em 20/78 (25,60%). No Brasil, em 127 linhagens de *S. aureus* isoladas de casos de mastites em rebanhos convencionais em Minas Gerais, 47% produziram pelo menos uma toxina pesquisada, incluindo TSST-1 (Cardoso et al., 2000). Nas propriedades de leite orgânico estudadas, nenhuma das linhagens de *Staphylococcus* sp. possuíam o gene codificador para *tsst-1*. Sá et al. (2004) também não encontraram linhagens positivas para TSST-1 em *S. aureus* isolados de mastite clínica de animais provenientes de propriedades convencionais do interior do estado de São Paulo. Estes achados provavelmente sinalizam para a baixa produção de TSST-1 em isolados de estafilococos obtidos de vacas.

Dentre os parâmetros utilizados na avaliação da qualidade do leite de vacas, destaca-se a contagem de células somáticas. A alta celularidade no leite decorre, principalmente, de deficiências no manejo higiênico da ordenha e na saúde do úbere. Pode também estar relacionada à fase de lactação e idade do animal (Fonseca e Santos, 2000).

Na Suiça, Roesch et al. (2007) encontraram médias de CCS ao redor de 4,0 x 10^4 células/mL em leite de vacas criadas em sistema orgânico de produção. Em contraste, na Suécia, Hamilton et al. (2006) constataram valores de CCS variando entre 8,3 x 10^4 células/mL e 2,8 x 10^5 células/mL também em vacas criadas em sistema orgânico.

Fernandez et al. (2009) encontraram média de CCS, em leite orgânico proveniente do RS, acima de 1,2 x 10^6 células/mL, valor bem superior aos 7,13 x 10^5 obtidos na propriedade I e 3,2 x 10^5 células/mL da propriedade II utilizadas no presente estudo. Ribeiro et al. (2009) e Langoni et al. (2009), ao pesquisarem as contagens celulares de leite proveniente de propriedades orgânicas do estado de São Paulo, observaram valores inferiores a 4,0 x 10^5 células/mL em animais com ou sem mastite. O Brasil adotou o pagamento de qualidade do leite na última década. Aceita-se atualmente CCS até 750.000 células/mL (Brasil, 2002). Os resultados do presente estudo mostraram que, na média, os valores da celularidade das duas propriedades orgânicas estão dentro dos limites aceitáveis vigentes pela IN 051 do MAPA. No entanto, a partir de julho de 2011 haverá maior rigor para a CCS do leite bovino (até 400.000 células/mL para a região Sudeste), fato que sinaliza a necessidade de

melhorias nas práticas de ordenha higiênica e incremento das ações de profilaxia e controle da mastite.

A CBT é outro indicador adotado recentemente pelo Brasil para o pagamento de qualidade do leite bovino (Brasil, 2002). No Brasil, Campos (2004) encontrou valores de CBT acima do permitido pela IN 051 tanto nas amostras de leite produzidas em sistema orgânico quanto no convencional. Nas colheitas dos latões, realizadas mensalmente por 12 meses, apenas a propriedade I apresentou média da CBT superior ao preconizado pela IN 051 (Brasil, 2002). Os meses de setembro, outubro e novembro de 2008 (inverno e primavera), além de abril de 2009 (outono), foram os meses com os maiores valores de CBT. Outros estudos realizados no Brasil demonstraram que em tanques coletivos a CBT é o principal aspecto em desacordo com a IN 051. Este resultado reforça a importância da avaliação periódica como parâmetro de qualidade do leite e a necessidade das propriedades orgânicas amostradas melhorarem às condições da prática de ordenha, visando reduzir a CBT. Ao contrário da CCS, a adoção de ações nos plantéis para redução de CBT se apresenta como mais preocupante para os criadores, visto que a partir de julho de 2011, serão aceitos na plataforma somente leite com CBT < 300.000 UFC/mL para tanques coletivos e < 100.000 UFC/mL para tanques individuais (Brasil, 2002).

A preocupação com a presença de resíduos em leite de animais criados no sistema convencional tem sido avaliada no Brasil. Barros et al. (2001) encontraram 38,5% das amostras de leite C pasteurizado, comercializadas na cidade de Salvador, que acusaram a presença de resíduos de antimicrobianos. Nascimento et al. (2001) encontraram 50% de amostras positivas para resíduos em leite comercializado em Piracicaba, SP. Na região de Uberlândia, Almeida et al. (2003) ao amostrarem leite de vacas de 158 propriedades, encontraram 1,89% de positividade para antimicrobianos do grupo dos β-lactâmicos. Biacchi et al. (2004) encontraram resíduos de antimicrobianos em 80% das amostras analisadas de leite do tipo B e 100% de leite C provenientes do Vale do Paraíba, SP. Tetzner et al. (2005), no Triângulo Mineiro, detectaram resíduos em 33,3% das amostras de leite. Nero et al. (2007) constataram resíduos em 11,4% das amostras de leite colhidas em quatro regiões leiteiras do Brasil. Fonseca et al. (2009) verificaram a presença

de resíduos de antimicrobianos em 4% das amostras de leite UHT provenientes de Minas Gerais.

No entanto, são escassos os estudos direcionados na detecção de resíduos em vacas de produção orgânica, fato relevante, posto que este sistema de produção permite o uso de antimicrobianos, apenas em casos extremos. No caso do uso de antimicrobianos, os produtores devem retirar os produtos e subprodutos do animal da categoria de orgânico. Além disto, o período de carência e descarte de leite deve ser duas vezes o que é o recomendado para a criação convencional e o animal deverá ser identificado e alojado em ambiente isolado (Brasil, 2008).

A presença de resíduos de substâncias inibidoras no leite foi encontrada em 6,97% de amostras da propriedade I e em 9,24% da propriedade II. Destas, 3,48% da propriedade I e 7,51% da propriedade II foram provenientes de animais e o restante de latões. Ribeiro et al. (2009) encontraram quatro (2,7%) amostras de leite com resíduos, provenientes de vacas criadas em sistema orgânico no interior do estado de São Paulo. Em contrapartida, Mendes et al. (2008) não detectaram a presença de resíduos de antimicrobianos em 32 amostras de leite cru comercializado clandestinamente no município de Mossoró, RN.

Ambas as propriedades acompanhadas no estudo acusaram leite com a presença de substâncias inibidoras, provavelmente antimicrobianos, obtidos de tetos com mastite e/ou latões. O leite destas propriedades é processado em laticínios próprios. A detecção de resíduos de antimicrobianos indica falha nos preceitos de produção orgânica, e que provavelmente os animais estão sendo tratados com antimicrobianos e o leite aproveitado na linha de ordenha. O consumo dos produtos orgânicos vem aumentando em função da prerrogativa de produtos saudáveis. Desta forma, o produtor orgânico deve atentar para as normas e também para os riscos do processamento do leite fora das especificações exigidas. A detecção de qualquer resíduo de antimicrobiano no leite de vacas produzido no Brasil está em desacordo com as normas instituídas pela IN 064 do MAPA (Brasil, 2008). A detecção de resíduos no leite de vacas e latões amostrados reforça a necessidade de maior rigor dos laticínios para a detecção dos mesmos no leite produzido no país.

Ademais, a presença de resíduos de antimicrobianos em leite produzido em sistema convencional ou orgânico é fator preocupante para os profissionais de saúde, visto que resulta em grandes prejuízos para a indústria leiteira e o tratamento térmico não elimina os antimicrobianos, podendo ocasionar reações indesejáveis nos humanos após a ingestão do produto (Almeida et al., 2003).

O leite de vaca contém cerca de 0,9% de minerais e vitaminas, 3,2% de proteínas, 3,9% de gorduras, 4,6% de lactose e 87% de água (Brasil, 2002). O tipo de ordenha, manual ou mecânica, e a metodologia da colheita podem influenciar nos teores dos componentes do leite, particularmente no que tange aos valores de gordura (Reis et al., 2007). Com o intuito de avaliar os efeitos do tipo de ordenha e do método de colheita de leite na composição e na celularidade em fazenda na região de Pedro Leopoldo, MG, Reis et al. (2007) realizaram a colheita manual de leite antes da ordenha e dos coletores individuais da ordenhadeira mecânica após a ordenha completa. Observaram que os percentuais de gordura foram menores no método manual, justificando que, como a gordura possui menor densidade do que a proteína e a lactose, os teores de gordura são mais elevados ao final da ordenha quando o úbere já está “vazio”. Também observaram que o leite ordenhado pela tarde apresentou maiores teores de gordura comparativamente ao da manhã. Tal fato pode ser creditado a maior quantidade de leite na primeira ordenha, diluindo os teores de gordura na ordenha da manhã. No Canadá, Quist et al. (2008) realizaram estudo semelhante em 16 propriedades leiteiras, e também constataram maiores teores de gordura e proteína na última ordenha do dia.

As colheitas do presente estudo foram realizadas de forma a respeitar o manejo peculiar das propriedades de produção orgânica. No início do estudo, em ambas as propriedades os bezerros adentravam na sala de ordenha para estimular a descida do leite, antes do início das colheitas. Este fato resultou em baixos teores de gordura no início do estudo. Desta forma, foi necessário a adoção de colheitas mistas, pré e pós-ordenha, com o intuito de minimizar alterações nos resultados da qualidade do leite das propriedades, particularmente nos teores de gordura. Tal medida refletiu positivamente nos resultados, pois os teores de gordura mensurados após a adequação do

método de colheita apresentaram resultados considerados dentro do esperado para vacas em lactação, com o mínimo de 3% de gordura (Brasil, 2002).

No Brasil, Pereira et al. (1999) observaram aumento nos teores de gordura no leite de animais com mastite quando comparados com os animais sem mastite criados em sistema convencional. Machado et al. (2000) encontraram aumento significativo na concentração de gordura em amostras colhidas de tanques de expansão, de propriedades convencionais, que continham leite de animais com mastite. No presente estudo foram observados valores de gordura considerados normais na média do leite dos animais de produção orgânica. No entanto também foi observado aumento dos teores de gordura no leite orgânico de animais positivos no CMT quando comparados com aqueles de animais sem mastite. Segundo Bueno et al. (2005) o aumento dos teores de gordura do leite pode ser apenas relativo em virtude da redução dos demais componentes. Porém, Harmon (1994) descreveu que quando há diminuição da produção de leite proporcionalmente maior do que a diminuição da síntese de gordura, os teores de gordura aumentam em função do efeito da concentração. Contrariamente, Bueno et al. (2005) observaram redução dos teores de lipídeos no leite convencional de animais com mastite do estado de Goiás. Santos (2003) sugeriu que a redução da concentração total de gordura no leite se deve a diminuição da capacidade de síntese de lipídeos pela glândula mamária com mastite.

Segundo a Normativa 051 (Brasil, 2002) o leite de qualidade para o consumidor deve conter no mínimo 2,9% de proteína. Diferentes autores têm relatado aumento dos teores de proteína no leite de animais mastíticos (Harmon, 1994; Pereira et al., 1999). O aumento dos teores de proteína é creditado ao aumento das proteínas plasmáticas em decorrência da resposta inflamatória (Harmon, 1994) e também ao maior influxo de substâncias do sangue para o leite (Santos, 2003). Pereira et al. (1999) observaram teores maiores de proteína em amostras de leite colhidas de vacas com mastite, criadas em sistema convencional. Em contraste, Bueno et al. (2005) observaram redução dos teores de proteína do leite de vacas com mastite criadas em sistema convencional no estado de Goiás. Na média, os teores de proteínas do leite das vacas e latões amostrados nas propriedades orgânicas foram considerados dentro dos padrões mínimos exigidos pela IN 051 do

MAPA (Brasil, 2002). No entanto, foi observado diminuição dos valores de proteína nos animais com CMT negativo comparados aos com CMT positivo para ambas as propriedades amostradas.

Gonzalez et al. (2004) afirmaram que a lactose é o componente que menos varia no leite bovino. Machado et al. (2000) observaram pequena redução dos teores de lactose de leite colhido de tanques de expansão de propriedades convencionais. Na avaliação da qualidade do leite da bacia leiteira de Pelotas, RS, Gonzalez et al. (2004) observaram que os teores de lactose foram menores nos meses de março, abril e maio. Bueno et al. (2005) observaram que os valores de lactose foram inversamente proprocionais a CCS de vacas com mastite criadas em sistema convencional no estado de Goiás. Coincidentemente, os teores de lactose foram menores principalmente no mês de abril, nas duas propriedades orgânicas envolvidas neste estudo. Ademais foi estatisticamente significante a redução da lactose em animais com isolamento de *Staphylococcus* spp.. A redução dos teores de lactose no leite de quartos infectados por estafilococos pode ser justificado pela diminuição na síntese deste açúcar nas células mamárias, em virtude do processo inflamatório e agressão tecidual provocadas pelo micro-organismo (Santos, 2003).

Fernandez et al. (2009), avaliaram o leite ecológico ou orgânico produzido em unidade de produção do Rio Grande do Sul e verificaram 3,14% de gordura, 9,3% de sólidos desengordurados e 3,19% de proteína. Estes valores são semelhantes aos encontrados nas duas propriedades orgânicas amostradas do interior do estado de São Paulo. As pequenas variações observadas na composição dos constituintes do leite nas duas propriedades estudadas podem ser reflexo de diferenças raciais, fase de lactação dos animais, idade, além de manejo, principalmente nutricional (Comeron et al., 2005).

No presente estudo foram encontrados valores de constituintes do leite dentro dos limites estabelecidos pela IN 051, sem influência significativa das estações do ano sobre os teores. Em contraste, foram observadas médias superiores de CCS nas colheitas trimestrais de todos os animais nos meses de fevereiro (verão) e maio (outono) da propriedade I e nos meses de novembro (primavera), maio (outono) e agosto (inverno) da propriedade II, porém sem

influência estatisticamente significante. Vasconcelos et al. (1997) também não observaram influência estatisticamente significativa das estações do ano nos valores de CCS e nos teores dos constituintes do leite em propriedades convencionais. De maneira similar, Gonzalez et al. (2004) não observaram influência dos meses do ano na celularidade e nos constituintes do leite de bovinos criados em regime convencional na bacia leiteira de Pelotas, RS. Igualmente, Fagan et al. (2008) não observaram influência das variações climáticas sobre a CCS do leite de vacas em granjas leiteiras convencionais do estado do Paraná. Em estudo recente, Zafalon et al. (2010) investigaram a relação entre CCS de animais com mastite bovina por *S. aureus*, sob sistema convencional de criação, frente as condições climáticas. Os autores também não observaram diferença estatística significativa na contagem celular do leite dos quartos mamários infectados quando comparada as estações do ano. O conjunto destes achados sinaliza que estações climáticas definidas, sem grandes variações, não influenciam significativamente nas contagens celulares e bacterianas, apesar de maior tendência de aumento de CCS no outono nas duas propriedades orgânicas estudadas. Este fato poderia ser reflexo do aumento da umidade do ambiente nos meses de verão e outono, que coincidem e sucedem, respectivamente, com períodos de chuva, que poderiam contribuir para o aumento das taxas de infecção mamária e, consequentemente, na celularidade do rebanho.

A implantação do sistema orgânico de produção no Brasil é recente. A grande maioria das propriedades passa por período de transição e adquire animais do sistema convencional. Ao contrário, os países europeus estão há décadas desenvolvendo este tipo de produção, fato que pode se traduzir com melhor qualidade do leite e certas diferenças nos parâmetros de constituintes do leite, se comparadas com as propriedades orgânicas nacionais. No entanto, são necessários estudos no país que avaliem parâmetros microbiológicos, de celularidade, físico-químicos e dos principais constituintes do leite orgânico, com o intuito de subsidiar indicadores específicos de qualidade para esta modalidade de produção animal.

Conclusões

7. CONCLUSÕES

- Os teores dos principais constituintes do leite (gordura, proteína, lactose, extrato seco e extrato seco desengordurado) foram similares aos encontrados em vacas em sistema convencional, mostrando que o sistema orgânico não altera significativamente estes constituintes;
- As médias e medianas das CCS e das CBT mantiveram-se dentro dos parâmetros exigidos pela IN 051, refletindo de modo geral a qualidade do leite orgânico para estes parâmetros nas propriedades estudadas;
- A ausência de significância estatística das variações climáticas das estações sobre os parâmetros estudados indicou pouca influência dos períodos do ano nos indicadores de qualidade do leite orgânico;
- A detecção de substâncias inibidoras em amostras de leite colhidas dos tetos dos animais e dos latões em ambas as propriedades, alerta para os riscos em saúde pública do consumo de leite e derivados destas propriedades e o descumprimento desta exigência da IN 064, que proíbem qualquer resíduo de fármaco no leite de vaca no Brasil;
- A alta frequência do isolamento de *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium bovis* no leite dos animais reforça o predomínio de micro-organismos contagiosos na casuística da mastite subclínica em vacas de propriedades orgânicas;
- A identificação de 80,0% das linhagens de *Staphylococcus* sp. isoladas como ECPs em comparação a de 17,0% de ECNs, principalmente em vacas com mastite subclínica, mostra o maior envolvimento de ECPs na gênese da mastite em vacas em produção orgânica;
- Ceftiofur, oxacilina e sulfametoxazole/trimetoprim foram efetivos em mais de 88,0% das linhagens de *Staphylococcus* sp. isoladas, podendo ser considerados antimicrobianos de escolha no tratamento somente de casos severos de mastite em vacas nas propriedades estudadas;
- Resistência múltipla aos antimicrobianos foi observada nos isolados, particularmente frente à fármacos amplamente utilizados no tratamento de mastite em vacas, como penicilina e ampicilina, indicando a necessidade de adoção de tratamento de afecções mamárias com o respaldo do antibiograma e para o uso racional de antimicrobianos em vacas;

- O gene *mecA* foi observado em 13,79% das estirpes isoladas, mostrando que o leite cru de vacas em sistema orgânico de produção podem ser considerados vias de transmissão de MRS para os humanos;
- Não foi encontrada nas linhagens a presença do gene *tsst-1*, revelando que, provavelmente, vacas em sistema orgânico de produção são de baixo risco para a transmissão de estirpes produtoras deste tipo de toxina;
- A presença dos genes codificadores das enterotoxinas A, B, C e D nas linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas alerta para os riscos em saúde pública de toxi-infecções alimentares pelo consumo humano de leite produzido em sistema orgânico.

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS

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

ACAR, J.; ROSTEL, B. Antimicrobial resistance: an overview. *Revue Scientifique et Technique*, v.20, p.797-810, 2001.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermidades transmisibles comunes al hombre y a los animales.* 3.ed. Organización Panamericana de La Salud: Washington, 2001. 398p.

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

ALMEIDA, L.P.; VIEIRA, R.L.; ROSSI, D.A.; CARNEIRO, A.L.; ROCHA, M.L. Resíduos de antibióticos no leite de propriedades rurais da região de Uberlândia – MG. *Bioscience Journal*, v.19, n.3, p.83-87, 2003.

ANSAY, S.E.; KASPAR, C.W. Survey et retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, v.25, p.131-134, 1997.

ARASHIRO, E.K.N.; TEODORO, V.A.M.; MIGUEL, E.M. *Mastite bovina: importância econômica e tecnológica.* Disponível em: (www.cienciadoleite.com.br). Acesso em 19 de fevereiro de 2008.

ARVE, A.M. Organic ways in Denmark. *Scandinavian Dairy Information*, n.4, p.12-15, 1999.

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

BAKER, J.S. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. *Journal of Clinical Microbiology*, v.19, p.875-879, 1984.

BAL, E.B.B.; BAYAR, S.; BAL, M.A. Antimicrobial susceptibilities of coagulase-negative staphylococci (CNS) and streptococci from bovine subclinical mastitis cases. *The Journal of Microbiology*, v.48, n.3, p.267-274, 2010.

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

BANSAL, B.K.; HAMMAN, J.; GRABOWSKI, N.T.; SINGH, K.B. Variation in the composition of selected milk fraction samples from healthy and mastitic quarters, and its significance for mastitis diagnosis. *Journal of Dairy Research*, v.72, p.144-152, 2005.

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. *Revista Napgama*, v.5, n.1, p.10, 2002.

BARBOSA, C.P.; BENEDETTI, E.; RIBEIRO, S.C.A.; GUIMARÃES, E.C. Relação entre contagem de células somáticas (CCS) e os resultados do “California Mastitis Test” (CMT), no diagnóstico de mastite bovina. *Bioscience Journal*, v.18, n.1, p.93-102, 2002.

BARROS, G.M.S.; JESUS, N.M.; SILVA, M.H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade de Salvador. *Revista Brasileira de Saúde em Produção Animal,* v.2, n.3, p.69-73, 2001.

BECKER, K.; KELLER, B.; VON EIFF, C.; BRICK, M.; LUBRITZ, G.; ETIENNE, J.; PETERS, G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. Applied and Environmental Microbiology, v.67, n.12, p.5551-5557, 2001.

BELOTTI, V.; MUELLER, E.E.; MEGID, J.; ROCHA, L.C.; METTIFOGO, E.; FREITAS, J.C. Ocorrência e caracterização de estafilococos coagulase negativos em mastite subclínica bovina no norte do Paraná, Brasil. *Semina*, v.12, n.1, p.49-52, 1991.

BEMIS, D.A.; JONES, R.D.; HIATT, L.E.; OFORI, E.D.; ROHRBACH, B.W.; FRANK, L.A.; KANIA, S.A. Comparison of tests to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* isolates from canine hosts. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, n.9, p.3374-3376, 2006.

BENGTSSON, B.; UNNERSTAD, H.E.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-OST, M.; WALLER, K.P. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Veterinary Microbiology*, v.136, p.142-149, 2009.

BENNEDSGAARD, T.W.; THAMSBORG, S.M. AARESTRUP, F.M.; ENEVOLDSEN, C.; VAARST, M.; CHRISTOFFERSEN, A.B. Resistance to penicillin of *Staphylococcus aureus* isolates from cows with high somatic cell counts in organic and conventional dairy herds in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.48, n.24, p.1-6, 2006.

BERGDOLL, M.S. Importance of staphylococci that produce nanogram quantities of enterotoxin. *Zentralblatt fur Bakteriologie*, v.282, p.1-6, 1995.

BESSER, R.E.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 gastroenterits and the hemolytic uremic syndrome: an emerging infectious disease. *Annual Review of Medicine*, v.50, p.355-367, 1999.

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 de Biociências*, v.10, n.1-2, p.47-49, 2004.

BODDIE, R.L.; NICKERSON, S.C.; OWENS, W.E.; WATTS, J.L. Udder microflora in non lactating heifers. *Agriculture Practice*, v.8; p.22-25, 1987.

BOMBYK, R.A.M.; BYKOWSKY, A.L.; DRAPER, C.E.; SAVELKOUL, E.J.; SULLIVAN, L.R.; WYCKOFF, T.J.O. Comparison of types and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* from conventional and organic dairies in west-central Minnesota, USA. *Journal of Applied Microbiology*, v.104, p.1726-1731, 2008.

BOQUET, P. The cytotoxic necrotizing factor 1 (cnf1) from *Escherichia coli*. *Toxicon*, v.39, p.1673-1680, 2001.

BORDOLLA, C.C. Métodos de detección de las mastitis bovina. *Revista Eletrónica de Veterinaria*, v.8, n.9, p.1-17, 2007.

BRABES, K.C.S.; CARVALHO, E.P.; DIONÍSIO, F.L.; PEREIRA, M.L.; GARINO, F.; COSTA, E.O. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Napgama*, n.3, p.4-11, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.007 de 17 de maio de 1999. *Normas disciplinadoras para a produção, tipificação, processamento, envase, distribuição, identificação e certificação de qualidade de produtos orgânicos, sejam de origem animal ou vegetal*. Brasília, 1999. Disponível em: (http://www.agricultura.gov.br/agricultura orgânica/produtos orgânicos). Acesso em 10 de dezembro de 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.051 de 18 de setembro de 2002. *Regulamentos técnicos de*

produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta do leite crú refrigerado e seu transporte a granel. Brasília, 2002. Disponível em: (http://www.agricultura.gov.br/Instrução Normativa 51). Acesso em 08 de janeiro de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Estatísticas agropecuárias*. Brasília, 2005. Disponível em: (www.mapa.gov.br). Acesso em 15 de fevereiro de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto 6.323. *Regulamentação da Lei dos Orgânicos 10.831/2003.* Brasília, 2007. Disponível em: (www.planetaorganico.com.br/decreto6323.htm). Acesso em 02 de janeiro de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.064 de 18 de dezembro de 2008. *Regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal.* Brasília, 2008. Disponível em: (http://www.agricultura.gov.br/Instrução Normativa 64). Acesso em 18 de fevereiro de 2010.

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

BRITO, M.A.V.P. *Segurança e Qualidade do Leite.* Disponível em: (www.cnpgl.embrapa.br/pesquisa/seguranca.pdf). Acesso em 03 de janeiro de 2008.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, J.P.; NEVES, R.B.S.; MANSUR, J.R.G.; THOMAZ, L.W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. Ciência Rural, v.35, n.4, p.848-854, 2005.

BUERIS, V.; MOREIRA, C.G.; SANTOS, K.R.N. *Staphylococcus epidermidis* e outras espécies de *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Rothia* (*Stomatococcus*). In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia.* 4.ed. Atheneu: São Paulo, p.183-187, 2005.

BUSATO, A.; TRACHSEL, P.; SCHÄLLIBAUM, M.; BLUM, J.W. Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. *Preventive Veterinary Medicine*, v.44, p.205-220, 2000.

CAMPIOLO, F.A.; SILVA, F.F. Orgânicos: garantia de saúde e possibilidade de sucesso econômico para o Brasil. *Revista Cesumar*, v.11, n.2, p.145-165, 2006.

CAMPOS, E.P. *Qualidade microbiológica, físico-química e pesquisa de resíduos de antibióticos e pesticidas no leite bovino produzido pelo sistema convencional e pelo sistema orgânico.* 2004. 58f. Dissertação (Mestrado) – Vigilância Sanitária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

CAPRIOLI, A.; FALBO, V.; RODA, L.G.; RUGGERI, F.M.; ZONA, C. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alteration. *Infection and Immunity*, v.39, p.1300-1306, 1983.

CARDOSO, H.F.T.; SILVA, N.; SENA, M.J.; CARMO, L.S. Production of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, v.29, p.347-349, 1999.

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

CARMO, L.S. *Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e TSST-1 para uso em ensaios imuno-enzimáticos.* 2001. 254f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, BH.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; FARIA, M.E.; PENA, E.C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, v.19, p.9-14, 2002.

CASTRO, C.R.T.; PERES, M.F.A.; AROEIRA, L.J. *Produção de leite orgânico.* Disponível em: (www.planetaorganico.com.br/trab-leiteorganico.htm). Acesso em 08 de janeiro de 2008.

CENCI-GOGA, B.T.; KARAMA, M.; ROSSITO, P.V.; MORGANTE, R.A.; CULLOR, J.S. Enterotoxin production by *S. aureus* isolated from mastitic cows. *Journal of Food Protection*, v.66, n.9, p.1693-96, 2003.

CHAPMAN, P.A.; WRIGHT, D.J.; HIGGINS, P. Untreated milk as a source of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Veterinary Record*, v.133, p.171, 1993.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.* CLSI approved standard M100-S15. Wayne, PA, USA, 2005.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard - 8th ed.* CLSI document M2-A9. Wayne, PA, USA: 2006.

COELHO, S.M.O.; MORAES, R.A.M.; SOARES, L.C.; PEREIRA, I.A.; GOMES, L.P.; SOUZA, M.M.S. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. *Ciência Rural*, v.37, n.1, p.195-200, 2007.

COMERON, E.; ROMERO, L.; CUATRIN, A.; MACIEL, M. El efecto racial e genético. In: TAVERNA, M. (Ed) *Manual de referencias técnicas para el logro de leche de calidad*. 2.ed. INTA: Rafaela, p.119-134, 2005.

CORRENTE, M.; NORMANNO, G.; MARTELLA, V.; BELLACICCO, A.L.; QUAGLIA, N.C.; DAMBROSIO, A.; BUONAVOGLIA, M.D.; BUONAVOGLIA, C. Comparison of methods for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from food products. *Letters in Applied Microbiology*, v.45, p.535-539, 2007.

COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; PARDO, R.B.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.17, n.4, p.156-158, 1995a.

COSTA, E.O; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; WHITE, C.R.; PARDO, R.B. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.17, n.5, p.215-217, 1995b.

COSTA, E.O.; MOTA, R.; SANTOS, F.G.B.; MÁRMORE, C.; ARCARO, J.R.P.; PEREZ, A.A.C. Contagem de células somáticas de amostras de leite de glândulas mamárias de fêmeas bovinas em lactação infectadas por microrganismos dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium*. *Revista Napgama*, v.8, n.2, p.3-7, 2005.

CUNHA, M.L.R.S.; SENZATO, Y.K.; SILVEIRA, L.V.A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative Staphylococci. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.99, n.8, p.855-860, 2004.

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

DANTAS, M.C.; ANDRÉ, P.B.; SANTOS, P.P.; CAMPOS, M.R.H.; BORGES, T.J.; SERAFINI, A.B. Utilização do antibiograma como ferramenta de tipagem fenotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de manipuladores, leite cru e queijo minas frescal em laticínio de Goiás. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.43, p.102-108, 2006.

DIAS, R.V.C. Principais métodos de diagnostico e controle da mastite bovina. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.1, n.1, p.23-27, 2007.

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

DUQUETTE, R.A.; NUTTALL, T.J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? *Journal of Small Animal Practice*, v.45, n.12, p.591-597, 2004.

DZIDIC, S.; BEDEKOVIC, V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bactéria. *Acta Pharmacologica Sinica*, v.24, n.6, p.519-526, 2003.

ECOCERT – ECOCERT BRASIL. *Certificações*. Disponível em: (www.ecocert.com.br/projetos.php). Acesso em 30 de janeiro de 2011.

FAGAN, E.P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; JOBIM, C.C. Avaliação de padrões físico-químico e microbiológico do leite em diferentes fases da lactação nas estações do ano em granjas leiteiras no Estado do Paraná – Brasil. *Semina*, v.29, n.3, p.651-660, 2008.

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

FEßLER, A.; BILLERBECK, C.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from

bovine mastitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.65, p.1576-1582, 2010.

FELICONIO, A.E. *Leite e laticínios orgânicos: resultados de uma nova agropecuária.* Disponível em: (www.sitiodomoinho.com.br). Acesso em 02 de janeiro de 2008.

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

FERNANDEZ, V.N.V.; ZANELA, M.B.; PINTO, A.T.; RIBEIRO, M.E.R. Qualidade do leite ecológico produzido em uma unidade de produção do Rio Grande do Sul. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.37, n.1, p.45-48, 2009.

FITZGERALD, J.R.; STURDEVANT, D.E.; MACKIE, S.M.; GILL, S.R.; MUSSER, J.M. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the* USA, v.98, n.15, p.8821-8826, 2001.

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

FONSECA, M.F. *Mercado de produtos orgânicos.* Disponível em: (www.planetaorganico.com.br/trab-leiteorganico.htm). Acesso em 02 de janeiro de 2008.

FONSECA, G.P.; CRUZ, A.G.; FARIA, R.S.; MOURA, M.R.L.; CARVALHO, L.M.J. Antibiotic residues in Brazilian UHT milk: a screening study. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.2, 451-453, 2009.

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.S.; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J.;

MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana “in vitro” de *Staphylococcus* coagulase-positiva isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

GARCIA, M.I.; LE BOUGUÉNEC, C. Role of adhesion in pathogenicity of human uropathogenic and diarrhoeogenic *Escherichia coli*. *Bulletin Institute Pasteur*, v.94, p.201-236, 1996.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G.; The road map to the manual. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. *Bergey’s manual of systematic bacteriology.* Springer – Verlag: Berlim, v.1, p.119-166, 2001.

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

GILLESPIE, B.E.; HEADRICK, S.I.; BOONYAYATRA, S.; OLIVER, S.P. Prevalence and persistence of coagulase negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. *Veterinary Microbiology*, v.134, p.65-72, 2009.

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

GONZALEZ, H.L.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; GOMES, J.F.; STUMPF JR., W.; SILVA, M.A. Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.33, n.6, p.1531-1534, 2004.

GUARDABASSI, L.; SCHWARTS, S.L. Pet animals as reservoirs of antimicrobial resistant bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.54, n.2, p.321-332, 2004.

GYLES, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Canadian Journal of Microbiology*, v.38, p.734-746, 1992.

HAMMERUM, A.M.; HEUER, O.E. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical Infectious Diseases*, v.48, n.7, p.916-921, 2009.

HAMILTON, C.; EMANUELSON, U.; FORSLUND, K.; HANSSON, I.; EKMAN, T. Mastitis and related management factors in certified organic dairy herds in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.48, n.11, p.1-7, 2006.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, v.77, n.7, p.2103-2112, 1994.

HATA, E.; KATSUDA, K.; KOBAYASHI, H.; OGAWA, T.; ENDO, T.; EGUCHI, M. Characteristics and epidemiologic genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitic milk in Hokkaido, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.68, n.2, p.165-170, 2006.

HENDRIKSEN, R.S.; MEVIUS, D.J.; SCHROETER, A.; TEALE, C.; MEUNIER, D.; BUTAYE, P.; FRANCO, A.; UTINANE, A.; AMADO, A.; MORENO, M.; GREKO, C.; STARK, K.; BERGHOLD, C.; MYLLYNIEMI, A.; WASYL, D.; SUNDE, M.; AARESTRUP, F.M. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.50, n.28, p.1-10, 2008.

HILLERTON, J.E.; BERRY, E.A. Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. *Journal of Applied Microbiology*, v.98, n.6, p.1250-1255, 2005.

HOLANDA JR., E.V.; MADALENA, F.E.; HOLANDA, E.D.; MIRANDA, W.M.; SOUZA, M.R. Impacto econômico da mastite em seis fazendas de Araxá, Minas Gerais, Brasil. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal*, v.13, n.2, p.63-69, 2005.

HOLMBERG, C. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.45, p.141-144, 1973.

IBD – INSTITUTO BIODINÂMICO. *Certificações*. Disponível em: (www.ibd.com.br). Acesso em 30 de janeiro de 2011.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Produção pecuária municipal.* IBGE, v.34, p.1-62, 2006.

IFOAM - INTERNATIONAL FEDERATION OF ORGANIC AGRICULTURE MOVIMENTS. *The world of organic agriculture.* IFOAM, 2006. 175p.

JOHNSON, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Review*, v.4, n.1, p.80-128, 1991.

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

JORGENSEN, H.J.; MORK, T.; CAUGANT, D.A.; KEARNS, A.; RORVIK, L.M. Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from Norweigan bulk milk. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.12, p.8352-8361, 2005a.

JORGENSEN, H.J.; MORK, T.; HOGASEN, H.R.; RORVIK, L.M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *Journal of Applied Microbiology*, v.99, p.158-167, 2005b.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, E.; EGYED, Z.; JANOSI, S.; KESERU, J.; GAL, Z.; SZABO, I.; VERES, Z.; SOMOGYI, P. Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to β-lactamase-resistant β-lactam antibiotics. *Acta Veterinaria Hungarica*, v.52, n.1, p.7-17, 2004.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, E.; JÁNOSI, S.; SOMOGYI, P.; DÁN, A.; BLOOIS, L.G.; DUIJKEREN, E.; WAGENAAR, J.A. MRSA transmission between cows and humans. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, n.4, p.630-632, 2007.

KAIPANEM, T.; POHJANVIRTA, T.; SHPIGEL, N.Y.; SHWIMMER, A.; PYORALA, S.; PELKONEM, S. Virulence factors of *E. coli* isolated from bovine clinical mastitis. *Veterinary Microbiology*, v.85, p.37-46, 2002.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli. Nature*, v.2, p.123-140, 2004.

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

KÉROVANTON, A.; HENNEKINNE, J.A.; LETERTRE, C.; PETIT, L.; CHESNEAU, O.; BRISABOIS, A.; DE BUYSER, M.L. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, v.115, p.369-375, 2007.

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

KITAI, S.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; SATO, E.; NAKANO, C.; UJI, T.; KITAGAWA, H. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.67, p.107-110, 2005.

KUHNERT, P.; DUBOSSON, C.R.; ROESCH, M.; HOMFELD, E.; DOHERR, M.G.; BLUM, J.W. Prevalence and risk factor analysis of Shiga toxigenic

Escherichia coli in faecal samples of organically and conventionally farmed dairy cattle. *Veterinary Microbiology*, v.109, p.37-45, 2005.

KUKUROVA, I.; HOZOVA, B. Interactions of antimicrobials in milk and their detection by the disk diffusion method and delvotest SP. *Journal of Association of Official Analytical Chemistry International*, v.86, n.3, p.529-533, 2003.

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

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

LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP*, v.3, n.3, p.57-64, 2000.

LANGONI, H.; SAKIYAMA, D.T.P.; GUIMARÃES, F.F.; MENOZZI, B.D.; SILVA, R.C. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.11, p.881-886, 2009.

LARSEN, H.F.; HUDA, A.; ERIKSEN, N.H.R.; JENSEN, N.E. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. *Veterinary Microbiology*, v.76, p.153-162, 2000.

LECLERC, V.; DUFOUR, B.; LOMBARD, B.; GAUCHARD, F.; GARIN-BASTUJI, B.; SALVAT, G.; BRISABOIS, A.; POUMEYROL, M.; DE BUYSER, M.L.; GNANOU-BESSE, N.; LAHELLEC, C. Pathogens in meat and milk

products: surveillance and impact on human health in France. *Livestock Production Science*, v.76, p.195-202, 2002.

LEE, J.A. Methicillin (oxacillin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Applied Environmental Microbiology*, v.69, p.6489-6494, 2003.

LINTON, A.H.; HOWE, K.; BENNET, P.M.; RICHMOND, M.H.; WHITESIDE, E.J. The colonization of the human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. *Journal of Applied Microbiology*, v.43, n.3, p.465-469, 1977.

LIVERMORE, D.M.; PEARSON, A. Antibiotic resistance: location, location, location. *Clinical Microbiology Infection*, v.13, p.7-16, 2007.

LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIR, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic Molecular Research*, v.2, n.1, p.63-76, 2003.

LUTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.57, p.966-969, 2006.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRÍES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua Contagem de Células Somáticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.6, p.1883-1886, 2000.

MACHADO, T.R.O.; CORREA, M.G.; MARIN, J.M. Antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.1, p.278-282, 2008.

MAGALHÃES LOPES, C.A.; MORENO, G.; CURI, P.R.; GOTTSCHALK, A.F.; MODOLO, J.R.; HORACIO, A.; CORRÊA, A.; PAVAN, C. Characteristics of

Staphylococcus aureus from subclinical bovine mastitis in Brazil. *Brazilian Veterinary Journal*, v.146, p.443-448, 1990.

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

MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. *Principles and practice of infectious diseases.* 6.ed. Elsevier Churchill Livingstone: EUA, v.2, 2005. 3661p.

MARTIN, M.L.; SHIPMAN, L.D.; WELLS, G.; POTTER, M.E.; HEDBERG, K.; WACHSMUTH, I.K.; TAUXE, R.V.; DAVIS, J.P.; ARNOLDI, J.; TILLELI, J. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, v.2, p.1043, 1986.

MARTINEZ, M.B.; TRABULSI, L.R. *Enterobacteriaceae*. *In*: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia.* 5.ed. Atheneu: São Paulo, p.271-280, 2008.

MARTINS, A.; CUNHA, M.L.R.S. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* e coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiology and Immunology*, v.51, n.9, p.787-795, 2007.

MASON, W.J.; BLEVINS, J.S.; BEENKEN, K.; WIBOWO, N.; OJHA, N.; SMELTZER, M.S. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.9, p.3332-3338, 2001.

MATHEWS, K.R.; OLIVER, S.P.; KING, S.H. Comparison of Vitek gram-positive identification system with API Staph-Trac system for species identification of staphylococci of bovine origin. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, p.1649-1651, 1990.

MEAD, R.; CURNOW, R.N. *Statistical methods in agriculture and experimental biology.* 2.ed. London: Chapman e Hall, 1993. 415p.

MEDEIROS, E.S.; MOTA, R.A.; SANTOS, M.V.; FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; TELES, J.A.A. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite clínica. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.7, p.569-574, 2009.

MENDES, C.G.; SAKAMOTO, S.M.; SILVA, J.B.A.; LEITE, A.I. Pesquisa de resíduos de beta-lactâmicos no leite cru comercializado clandestinamente no município de Mossoró, RN, utilizando o Delvotest SP. *Arquivos do Instituo Biológico*, v.75, n.1, p.95-98, 2008.

MILKPOINT. Disponível em: (www.milkpoint.com.br/mercado/estatisticas/). Acesso em 30 de janeiro de 2011.

MITTIMAN, C. Orgânicos desde a semente. *Revista Frutas e Legumes*, v.2, n.13, p.8-11, 2002.

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

MOON, J.S.; LEE, A.R.; KANG, H.M.; LEE, E.S.; KIM, M.N.; PALK, Y.H.; PARK, Y.H.; JOO, Y.S.; KOO, H.C. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. *Journal of Dairy Science*, v.90, p.1176-1185, 2007a.

MOON, J.S.; LEE, A.R.; KANG, H.M.; LEE, E.S.; JOO, Y.S.; PARK, Y.H.; KIM, M.N.; KOO, H.C. Antibiogram and coagulase diversity in staphylococcal enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.90, p.1716-1724, 2007b.

MORGAN, D.; NEWMAN, C.P., HUTCHINSON, D.N.; WALKER, A.M.; ROWE, B.; MAJID, F. Verotoxin producing *E. coli* O157:H7 infections associated with the consumption of yogurth. *Epidemiology and Infections*, v.111, p.181-187, 1993.

MURAKAMI, K.; MINAMIDE, K.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, p.2240-2244, 1991.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.O.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; PFALLER, M.A. *Manual of Clinical Microbiology***.** 9.ed. ASM Press: Washington, 2v., 2007.

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

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.74, n.1, p.1-4, 2007b.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Revista de Nutrição*, v.14, n.2, p.119-129, 2001.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Review*, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NMC - NATIONAL MASTITIS COUNCIL. *Current concepts of bovine mastitis.* 4.ed. NMC: Madison, 1996. 64p.

NERO, T.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, 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*, v.27, n.2, p.391-393, 2007.

NEVES, M.C.; COSTA, J.R.V.; VIEIRA, V.C.; ABREU, I.L.; LEMOS, M.V.F. Resistência aos antimicrobianos e análise da diversidade genética de *Staphylococcus aureus* por PCR-RAPD. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.77, n.4, p.575-582, 2010.

NORMANNO, G.; CORRENTE, M.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N.C.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISETTI, E.; CELANO, G.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, v.117, p.219-222, 2007.

NUNES, S.F.; BEXIGA, R.; CAVACO, L.M.; VILELA, C.L. Technical note: Antimicrobial susceptibility of portuguese isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in subclinical bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.90, p.3242-3246, 2006.

OLIVEIRA, A.A.; MELO, C.B.; AZEVEDO, H.C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos leiteiros nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.1, p.226-230, 2009.

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

ORMOND, J.G.P.; PAULA, S.R.L.; FAVERET FILHO, P.; ROCHA, L.T. Agricultura orgânica: quando o passado é futuro. *BNDES SETORIAL*, n.15, p.3-34, 2002.

PELES, F.; WAGNER, M.; VARGA, L.; HEIN, I.; RIECK, P.; GUTSER, K.; KERESZTURI, P.; KARDOS, G.; TURC SÁNYI, I.; BÉRI, B.; SZABÓ, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *International Journal of Food Micorbiology*, v.118, p.186-193, 2007.

PEREIRA, A.R.; PRADA E SILVA, L.F.; MOLON, L.K.; MACHADO, P.F.; BARANCELLI, G. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I-gordura e proteína. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.36, n.3, p.121-124, 1999.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. *Vencendo a luta contra a mastite*. 1.ed. Milkbizz: USA, 2002. 192p.

PIVARO, J. Laticínios orgânicos: o mercado de volta às origens. *Revista Indústria de Laticínios*, v.10, n.57, 2005.

PRATIQUELEITE. *Leite na história humana.* Disponível em: (www.pratiqueleite.com.br). Acesso em 04 de janeiro de 2008.

POHL, P.; OSWALD, E.; VAN MUYLEM, K.; JACQUEMIN, E.; LINTERMANS, P.; MAINIL, J. *Escherichia coli* producing cnf1 and cnf2 cytotoxins in animal with different disorders. *Veterinary Research*, v.24, p.311-315, 1993.

POLEGATO, E.P.S.; RUDGE, A.C. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília – São Paulo/Brasil. *Revista Higiene Alimentar*, v.17, n.110, p.56-63, 2003.

POLIDORO, J.C. *Orgânicos.* Reportagem do dia 28 de julho de 2006. Disponível em: (www.brasiloeste.com.br/noticia/1871/organicos). Acesso em 02 de janeiro de 2008.

PONCHIO, L.A.; GOMES, A.L.; PAZ, E. *Perspectivas de consumo do leite no Brasil.* Reportagem de julho de 2005. Disponível em: (www.cepea.esalq.usp.br). Acesso em 02 de janeiro de 2008.

PYORALA, S.; TAPONEM, S. Coagulase negative staphylococci – Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, v.134, p.3-8, 2009.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Clinical Veterinary Microbiology.* Wolfe: London, 1994. 648p.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, E.C. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.* Artmed: Porto Alegre, 2005. 512p.

QUIST, M.A.; LeBLANC, S.J.; HAND, K.J.; LAZENBY, D.; MIGLIOR, F.; KELTON, D.F. Milking-to-milking variability for milk yeld, fat and protein percentage, and somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, v.91, p.3412-3423, 2008.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. *Veterinary medicine. A textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* 10.ed. Saunders Elsevier: USA, 2007. 2156p.

REIS, G.L.; ALVES, A.A.; LANA, A.M.Q.; COELHO, S.G.; SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; PENNA, C.F.A.M.; MENDES, E.D.M. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físico-química e a contagem de células somáticas. *Ciência Rural*, v.37, n.4, p.1134-1138, 2007.

RIBEIRO, M.G.; SILVA, E.O.T.R.E.; PINTO, J.P.A.N. *Escherichia coli* O157-H7. De hambúrger, leite e outros gêneros alimentícios à colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica. *Revista Higiene Alimentar*, v.13, n.66/67, p.88-99, 1999.

RIBEIRO, M.G. *Fatores de virulência em cepas de Escherichia coli isoladas de mastite bovina clínica e subclínica.* 2001. 98p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O.; LEITE, D.S.; LANGONI, H.; GARINO JUNIOR, F.; VICTÓRIA, C.; LISTONI, F.J.P. Fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.5, p.724-731, 2006.

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

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

REINGOLD, J.; STARR, N.; MAURER, J.; LEE, M.D. Identification of a new *Escherichia coli* She haemolysin homolog in avian *E. coli*. *Veterinary Microbiology*, v.66, p.125-134, 1999.

ROESCH, M.; PERRETEN, V.; DOHERR, M.G.; SCHAREN, W.; SCHALLIBAUM, M.; BLUM, J.W. Comparison of antibiotic resistance of udder pathogens in dairy cows kept on organic and on conventional farms. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.989-997, 2006.

ROESCH, M.; DOHERR, M.G.; SCHAREN, W.; SCHALLIBAUM, M.; BLUM, J.W. Subclinical mastitis in dairy cows in Swiss organic and conventional production systems. *Journal of Dairy Research*, v.74, p.86-92, 2007.

ROZGONYI, F.; KOCSIS, E.; KRISTÓF, K.; NAGY, K. Is MRSA more virulent than MSSA? *Clinical Microbiology and Infection*, v.13, n.9, p.843-845, 2007.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A.O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de

células somáticas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.41, n.5, 320-326, 2004.

SABIONI, G.; HIROOKA, E.Y.; SOUZA, M.L.R. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. *Revista de Saúde Pública*, v.22, n.5, p.458-461, 1988.

SALVADORI, M.R.; VALADARES, G.F.; LEITE, D.S.; BLANCO, J.; YANO, T. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from calves with diarrhea in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, n.3, p.230-235, 2003.

SANDRINI, C.N.M.; PEREIRA, M.A.; BROD, C.S.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. *Escherichia coli* verotoxigênicas: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, v.37, n.1, p.175-182, 2007.

SANTANA, E.H.W.; CUNHA, M.L.R.S.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; MORAES, L.B.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; BELOTI, V. Assessment of the risk of raw milk consumption related to staphylococcal food poisoning. *Ciência Animal Brasileira*, v.11, n.3, p.643-652, 2010.

SANTOS, M.V. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das células somáticas. In: BRITO, J.R.F.; PORTUGAL, J.A.B. *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e questão dos resíduos de antibióticos*. CBQL: Juiz de Fora, v.1, p.139-149, 2003.

SANTOS, F.G.B.; OLIVEIRA, W.L.M.; GARINO JÚNIOR, F.; COSTA, E.O.; LEAL BALBINO, T.C. Investigação dos mecanismos de resistência à oxacilina em *S. aureus* isolados de casos de mastite. *Revista Napgama*, v.8, n.2, p.14-17, 2005.

SAWANT, A.A.; GILLESPIE, B.E.; OLIVER, S.P. Antimicrobial susceptibility of coagulase negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. Veterinary Microbiology, v.134, p.73-81, 2009.

SCHALM, O.W.; CARROL, E.; JAIN, N.C. *Bovine mastitis*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1971. 360 p.

SCHITO, G.C. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, v.12, p.3-8, 2006.

SCHULTZ, R.P.J.; SMITH, K.L.; HOGAN, J.S.; LOVE, B.C. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Veterinary Microbiology*, v.102, p.33-42, 2004.

SEARS, P.M.; McCARTHY, K.K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v.19, p.171-185, 2003.

SIEGEL, J.D.; RHINEHART, E.; JACKSON, M.; CHIARELLO, L. Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings, 2006. Disponível em: (http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroGuideline2006.pdf). Acesso em 29 de maio de 2011.

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

SORDILLO, L.M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, v.80, n.8, p.1851-1865, 1997.

SRINIVASAN, V.; SAWANT, A.A.; GILLESPIE, B.E.; HEADRICK, S.J.; CEASARIS, L.; OLIVER, S.P. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.3, n.3, p.274-283, 2006.

STAMFORD, T.L.M; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.1, p.41-45, 2006.

STEIN, R.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – the new zoonoses. *International Journal of Infectious Diseases*, v.13, p.299-301, 2009.

STEPHAN, R.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A.A.; LAMMLER, C. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Veterinary Microbiology*, v.78, p.373-382, 2001.

SWENSON, J.M.; TENOVER, F.C. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp.. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.8, p.3818-3823, 2005.

TAPONEM, S.; BJORKROTH, J.; PYORALA, S. Coagulase negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *Journal of Dairy Research*, v.75, p.422-429, 2008.

TAPONEM, S.; PYORALA, S. Coagulase negative staphylococci as cause of bovine mastitis – Not so different from *Staphylococcus aureus*? *Veterinary Microbiology*, v.134, p.29-36, 2009.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne diseases: an envolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, p.1-13, 1997.

TEIXEIRA, N.M.; FREITAS, A.F.; BARRA, R.B. Influência dos fatores de meio ambiente na variação mensal da composição e contagem de células somáticas do leite em rebanhos do estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, n.4, p.491-499, 2003.

TEIXEIRA, L.M.; SANTOS, K.R.N.; BUERIS, V.; TRABULSI, L.R. *Staphylococcus aureus*. *In*: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia***.** 5.ed. Atheneu: São Paulo, p.175-182, 2008.

TETZNER, T.A.D.; BENEDETTI, E.; GUIMARAES, E.C.; PERES, R.F. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro*. Higiene Alimentar*, v.19, n.130, p.69-72, 2005.

THORBERG, B.M.; DANIELSSON THAM, M.R.; EMANUELSON, V.; PERSON WALLER, K. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase negative staphylococci. *Journal of Dairy Science*, v.92, p.4962-4970, 2009.

TIKOFSKY, L.L.; BARLOW, J.W.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y.H. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. *Microbial Drug Resistance*, v.9, s.1, p.39-45, 2003.

TURUTOGLU, H.; ERCELIK, S.; OZTURK, D. Antibiotic resistance in *Staphylococcus* aureus and coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v.50, p.41-45, 2006.

UDO, E.E.; AL-BUSTAN, M.A.; JACOB, L.E.; CHUGH, T.D. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kwuait city may be a potential cause of food poisoning. *Journal of Medical Microbiology*, v.48, p.819-823, 1999.

VAARST, M.; ENEVOLDSEN, C. Patterns of clinical mastitis manifestation in Danish organic dairy herds. *Journal of Dairy Research*, v.64, p.23-37, 1997.

VANLOO, I.; HUIJSDENS, X.; TIEMERSMA, E.; DE NEELING, A.; VAN DE SANDE-BRUINSMA, N.; BEAUJEAN, D.; VOSS, A.; KLUYTMANS, J. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, p.1834-1839, 2007.

VASCONCELOS, C.G.C.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A.; PEREIRA, G.T. Influência da estação do ano, do estádio de lactação e da hora da ordenha sobre o número de células somáticas do leite bovino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.49, n.4, p.483-491, 1997.

VASCONCELOS, N.G.; CUNHA, M.L.R.S. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. Journal of Public Health and Epidemiology, v.2, n.3, p.29-42, 2010.

VERONESI, R.F. *Tratado de infectologia*. 3.ed. Atheneu: São Paulo, 2005. 2167p.

WALTHER, C.; PERRETEN, V. Letter to the Editor: Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* in organic milk production. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p.5351, 2007.

WEESE, J.S.; DICK, H.; WILLEY, B.M.; McGEER, A.; KREISWIRTH, B.N.; INNIS, B.; LOW, D.E. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the house hold. *Veterinary Microbiology*, v.115, p.148-155, 2006.

WILLIAMSON, C.S. Is organic food better for our health? *Nutrition Bulletin*, v.32, p.104-108, 2007.

WINN JR., W. C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. *Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido*. 6.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008. 1565p.

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

ZAFALON, L.F.; ARCARO, J.R.P.; NADER FILHO, A.; VESCHI, J.L.A. Contagem de células somáticas no leite de vacas de diferentes raças em distintas lactações e condições climáticas. *Veterinária e Zootecnia*, v.17, n.3, p.378-385, 2010.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. *Bulletin of IDF*, v.345, p.15-18, 2000.

ZHANG, Y.; WANG, X.; LEJEUNE, J.T.; ZERVOS, M.; BHARGAVA, K. Comparison of phenotypic methods in predicting methicillin resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) from animals. *Research in Veterinary Science*, v.90, p.23-25, 2011.

ZOCCAL, R. *Base de dados: leite em números.* Juiz de Fora: EMBRAPA/CNPGL, 2004. Disponível em: (www.cnpgl.embrapa.com.br/produção). Acesso em 16 de janeiro de 2008.

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

Artigo

9. TRABALHO CIENTÍFICO

9.1 Normas da Revista Arquivos do Instituto Biológico

Revista Arquivos do Instituto Biológico

Normas Editoriais

A **Revista Arquivos do Instituto Biológico** aceita, para submissão, artigos originais de pesquisa científica em sanidade animal e vegetal voltados ao agronegócio e suas implicações no agroambiente, incluindo nesse escopo a qualidade e a segurança alimentar. Aceita, também, artigos sobre pragas sinantrópicas. Todos os trabalhos devem se enquadrar nas normas redatoriais.

Os trabalhos enviados para publicação deverão ser inéditos e destinados exclusivamente a esta Revista. A matéria publicada será de inteira responsabilidade do(s) autor(es). Os trabalhos não aceitos para publicação serão comunicados aos autores pelo Comitê Editorial.

O Comitê Editorial fará análise dos trabalhos antes de submetê-los aos Consultores Científicos.

A publicação dos trabalhos dependerá da análise efetuada pelo Corpo de Consultores Científicos e da aprovação do Comitê Editorial.

Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

Serão considerados para publicação Artigos Científicos e Comunicações Científicas. Artigos de Revisão poderão ser aceitos a critério do Comitê Editorial.

A transcrição parcial ou total de trabalhos dos "Arquivos do Instituto Biológico" para outras revistas é permitida desde que citada a origem.

O original deve ser submetido apenas na forma eletrônica através do e-mail arquivos@biologico.sp.gov.br. O arquivo não deverá exceder 2Mb. No e-mail de encaminhamento deverá constar nome por extenso, endereço completo (Instituição/Universidade, Centro/Faculdade, Laboratório/Departamento,

endereço postal), endereço eletrônico e **CPF de todos os autores.**

Eventuais dúvidas podem ser encaminhadas ao editor da Revista "Arquivos do Instituto Biológico", Dra. Silvia Regina Galleti, Instituto Biológico - Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP - Fone: (11) 5087-1749 - E-mail: arquivos@biologico.sp.gov.br.

A versão impresa da revista será publicada exclusivamente em preto e branco. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis para consulta e download gratuitos no site da revista www.biologico.sp.gov.br/arquivos.

A taxa para publicação na revista “Arquivos do Instituto Biológico” é de R$ 25,00 (vinte e cinco reais) por página diagramada. Após o aceite do trabalho, comunicado pelo editor responsável, os autores deverão efetuar o depósito do valor correspondente à publicação em nome da Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa do Agronegócio - FUNDEPAG (CNPJ 50.276.237/0001-78) (Banco do Brasil (001), Agência 1199-1, Conta Corrente 30.200-7 ou Banco Banespa (033), Agência 0637, Conta Corrente 13-001316-9). Enviar comprovante de depósito, via carta, fax ou e-mail, mencionando o número do trabalho, para o seguinte endereço: Revista Arquivos do Instituto Biológico. Instituto Biológico - Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP – Fone: (11) 5087-1749 / Fax: (11) 5087-1790 – E-mail:arquivos@biologico.sp.gov.br

Forma de apresentação: os trabalhos deverão ser digitados em Word 97 ou versão superior, página A4, com margens de 2,5 cm, fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço duplo e páginas numeradas em seqüência. As linhas deverão ser numeradas de forma contínua, utilizando a ferramenta Layout em Configurar Página. O máximo de páginas será 25 para artigos de revisão, 20 para artigos científicos e 10 para comunicação científica, incluindo tabelas e figuras.

Artigo de revisão: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, texto sem

subdivisões e referências.

Artigo científico: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referências.

Comunicação científica: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, texto sem subdivisões e referências.

Quando o trabalho envolver estudos em animais de experimentação e/ou organismos geneticamente modificados, incluir o número do processo no trabalho e encaminhar uma cópia da aprovação fornecida pelo respectivo Comitê responsável da Instituição de origem do primeiro autor.

Idioma: o trabalho poderá ser redigido em português, espanhol ou inglês. Quando escrito em português, o resumo deverá ter uma versão em inglês. No caso de artigo escrito em inglês ou espanhol deverá ter um resumo em inglês ou espanhol e outro em português.

Título: embora breve, deverá indicar com precisão o assunto tratado no artigo, focalizando bem a sua finalidade principal.

Endereço(s) do(s) autor(es): abaixo do(s) nome(s) do(s) autor(es), com chamada numérica. Descrever endereço postal (Instituição/Universidade, Centro/Faculdade, Laboratório/Departamento, estado, país) e eletrônico do autor principal. No rodapé da primeira lauda descrever somente a Instituição e Departamento dos demais autores.

Resumo: deverá apresentar concisamente o objetivo do trabalho, material e métodos e conclusões, em um único parágrafo. Não ultrapassar 250 palavras.

Palavras-chave: abaixo do resumo e separado por um espaço, citar no máximo

cinco palavras-chave, separadas por vírgula. Evitar termos que apareçam no título.

Abstract: apresentar uma tradução para o inglês, do título do trabalho e do resumo. A seguir, relacionar também em inglês (ou espanhol) as mesmas palavras-chave (key words, palabras-clave) já citadas. Não ultrapassar 250 palavras.

Introdução: descrever a natureza e o objetivo do trabalho, sua relação com outras pesquisas no contexto do conhecimento existente e a justificativa da pesquisa feita.

Material e Métodos: apresentar descrição breve, porém suficiente para permitir uma repetição do trabalho. Técnicas e processos já publicados, exceto quando modificados, deverão ser apenas citados. Nomes científicos de espécies, bem como drogas, deverão ser citados de acordo com regras e padrões internacionais.

Resultados: apresentá-los acompanhado de tabelas e/ou figuras, quando necessário. As tabelas e figuras devem ser inseridas após as referências.

Discussão: discutir os resultados obtidos comparando-os com os de outros trabalhos publicados (resultados e discussão poderão fazer parte de um único item).

Tabelas e Figuras: incluir título claro e conciso que possibilite o seu entendimento sem consultas ao texto. As tabelas não deverão conter linhas verticais. No texto, use a palavra abreviada (ex.: Fig. 3). As figuras devem estar no formato jpg (fotos) ou gif (gráficos e esquemas) e com tamanho inferior a 500 Kb. As figuras originais ou com maior resolução poderão ser solicitadas após o aceite. Devem ser enviadas em arquivos individuais e nomeadas de acordo com o número da figura. Exemplos: Fig1.gif, Fig2.jpg.

Conclusões: serão citadas em ordem de importância. Poderão constituir um item à parte ou serem incluídas na discussão.

Agradecimentos: poderão ser incluídos a pessoas ou instituições.

Referências e citações no texto: citações no texto e referências estão diretamente vinculadas. Todos os autores citados devem figurar nas referências, exceção para informações obtidas por canais informais que deverão ser citadas apenas no texto: (JUNQUEIRA, comunicação pessoal), (JUNQUEIRA, informação verbal). A referência no texto deve seguir o sistema sobrenome do autor e ano de publicação e deverá estar em caixa alta reduzida ou versalete, tal como: 1 autor - ALLAN (1979) ou (ALLAN, 1979); 2 autores – LOPES; MACEDO (1982) ou (LOPES;MACEDO, 1982); mais de 2 autores - BESSE *et al*. (1990) ou (BESSE et al., 1990); coincidências de autoria e ano de publicação - (CURI, 1998a), (CURI, 1998b) ou (CURI, 1998a, 1998b). Nas referências seguir as recomendações da Norma NBR 6023/2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT); as referências deverão estar em ordem alfabética de primeiro autor e serem apresentadas em folha à parte. A exatidão dos dados nas referências é da responsabilidade dos autores.

9.2 Comprovante de submissão

Prezado Autor,

Comunicamos o recebimento do trabalho "Indicadores de qualidade do leite bovino orgânico em duas propriedades leiteiras certificadas do Estado de São Paulo" de autoria de Amanda Keller Siqueira[1][*], Tatiana Salerno[*], Gustavo Henrique Batista Lara[*], Larissa Anuska Zeni Condas[2], Fernando José Paganini Listoni[3], Antonio Carlos Paes[4], Aristeu Vieira da Silva[5], Domingos da Silva Leite[6] e Márcio Garcia Ribeiro que será submetido ao Conselho Científico da revista Arquivos do Instituto Biológico.

Informamos que seu trabalho recebeu o número **Arq. 010/11**. Qualquer esclarecimento que desejar solicitar favor informar este número.

Para ciência dos autores, informamos que o trâmite (da entrada ao aceite) de um manuscrito nesta revista está demandando uma média de 12 meses.

Atenciosamente,
Silvia R. Galleti
Editor Chefe

9.3 Artigo

Indicadores de qualidade do leite bovino orgânico em duas propriedades leiteiras certificadas do Estado de São Paulo

Quality indicators of organic bovine milk in two certified dairy herds in São Paulo state, Brazil

Amanda Keller Siqueira[4*], Tatiana Salerno[*], Gustavo Henrique Batista Lara[*], Larissa Anuska Zeni Condas[2], Fernando José Paganini Listoni[3], Antonio Carlos Paes[4], Aristeu Vieira da Silva[5], Domingos da Silva Leite[6] e Márcio Garcia Ribeiro[4]

[1]Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Botucatu, SP, 18618-970, Brasil. E-mail: kellersiqueira@hotmail.com.

RESUMO

O presente estudo avaliou a composição química, a contagem bacteriana total, o nível de celularidade e presença de resíduos no leite de duas pequenas propriedades em sistema orgânico de produção do interior do estado São Paulo com base na IN 051-

[*] Doutorandos do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP.
[2] Mestranda do Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP.
[3] Técnico do Laboratório de Microbiologia do Serviço de Diagnóstico Microbiológico, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP.
[4] Professores da Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ/UNESP, Botucatu, SP.
[5] Professor do Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, Brasil.
[6] Professor do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, IB-UNICAMP / Campinas, SP, Brasil.

MAPA. As amostras de leite foram obtidas mensalmente, por 12 meses, entre setembro de 2008 e agosto de 2009. O leite da Propriedade I apresentou média de CCS de 7,13x10^5 céls/mL e o da Propriedade II 3,27x10^5 céls/mL. As médias das CBTs foram, respectivamente, 7,80x10^5 céls/mL na Propriedade I e 6,15x10^5 cells/mL na Propriedade II. A propriedade I apresentou como média de gordura 3,10% nos 12 meses avaliados, enquanto a Propriedade II apresentou 3,44%. Em um ano de avaliação, a Propriedade I apresentou 3,26% de média de proteína e a Propriedade II 3,39%. O leite orgânico revelou 4,54% de média de lactose na Propriedade I e 4,50% na Propriedade II. A presença de resíduos foi detectada em seis amostras (6,97%) da Propriedade I e em 16 (9,24%) da Propriedade II. O presente estudo mostrou boa qualidade do leite orgânico produzido nas duas pequenas propriedades rurais avaliadas.

Palavras chave: Leite orgânico, qualidade do leite, rebanhos leiteiros, mastite, resíduos de antimicrobianos.

ABSTRACT

This study evaluated the chemical composition, total bacterial count, the degree of cellularity and presence of residues in milk from two small farms in organic production system in the state of São Paulo based in NI 051-MAPA. Milk samples were obtained monthly for 12 months, between September 2008 and August of 2009. The milk of the Property I had the mean of CCS 7.13x10^5 cells/mL and the Property II had 3.27x10^5 cells/mL. The average of CBT were, respectively, 7.80x10^5 cells/mL in the Property I and 6.15x10^5 cells/mL in Property II. The Property I presented as an average of 3.10% fat in 12 months, while the Property II was 3.44%. In a year of assessment, the Property I had 3.26% of average protein and Property II 3.39%. Organic milk revealed a

mean of 4.54% of lactose in the Property I and 4.50% in the Property II. The residues were detected in six samples (6.97%) of the Property I and 16 (9.24%) of Property II. The present study showed good quality of organic milk produced in two small rural properties evaluated.

Key words: Organic milk, milk quality, dairy herds, mastitis, drug residues.

INTRODUÇÃO

A produção e o consumo de leite e derivados vêm crescendo exponencialmente no Brasil. Desde 2004 o país assumiu a posição de exportador de leite (PONCHIO et al., 2005). Simultaneamente aumenta a necessidade de maior rendimento industrial e, principalmente, aumentam as exigências dos consumidores em relação à segurança e qualidade do leite e seus derivados.

A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) registrou que em 2006 o Brasil ocupava a sexta posição mundial na produção leiteira, superado somente pelos EUA, Índia, China, Rússia e Alemanha. No ano de 2004, o mundo produziu 515,8 bilhões de litros de leite, dos quais 70% foram produzidos na Europa e Américas (ZOCCAL, 2004). Em 2005 foram produzidos cerca de 25 bilhões de litros de leite no Brasil. A região Sudeste ocupou o primeiro lugar, o que correspondeu a 9,7 bilhões de litros de leite, aproximadamente 38% da produção nacional (IBGE, 2006). Em 2009, aproximadamente 28,8 bilhões de litros de leite foram produzidos no país e as estimativas apontam para a produção de 30,2 bilhões de litros para 2010 (USDA, 2009). Nos últimos 25 anos, a produção nacional de leite aumentou 119%, passando de 10,2 bilhões de litros em 1979 para 22,3 bilhões em 2003 (BRASIL, 2005).

Neste contexto tem-se notado incremento significativo na procura por produtos e subprodutos de origem animal produzidos no sistema orgânico. Acredita-se que o Brasil pode se tornar o maior exportador de produtos orgânicos do mundo (CAMPIOLO; SILVA, 2006; POLIDORO, 2006), pois existem cerca de 90 milhões de hectares agriculturáveis no país, além de propriedades convencionais que migram para orgânicas de maneira acentuada (FONSECA, 2008).

A Federação Internacional dos Movimentos de Agricultura Orgânica (IFOAM) descreveu que em 2006 o Brasil possuía 887.637 hectares destinados à produção de orgânicos (IFOAM, 2006). Em 2007, as terras destinadas a agricultura orgânica praticamente dobraram, passando para mais de 1,7 milhões de hectares (IFOAM, 2009). Os principais estados detentores de propriedades orgânicas são Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo, com cerca de 15.000 produtores certificados, 90% dos quais considerados de pequeno porte ou de exploração familiar (BRASIL, 2007). Dados divulgados no relatório da IFOAM em 2009, revelaram que a América Latina aumentou de 4.986.751 hectares sob manejo orgânico para 6.402.875 em 2007, principalmente devido ao aumento da exploração brasileira.

Apesar de possuir a segunda maior extensão de terras reservadas para a agricultura orgânica, a produção de leite orgânico no Brasil é irrisória, não atingindo 0,1% da produção nacional (WILLER; YUSSEFI, 2003). Estima-se que o Brasil produza somente cerca de seis milhões de litros/ano. Assume–se que para atender à demanda brasileira seria necessária a produção de 600 milhões de litros/ano. Em contraste, na Dinamarca, o leite orgânico representa cerca de 20% do consumo nacional (ARVE, 1999).

Em 18 de dezembro de 2008, o MAPA sancionou a IN 064 e aprovou o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, além

das Listas de Substâncias Permitidas para Uso nos Sistemas Orgânicos e o Regulamento Técnico sobre o Extrativismo Sustentável Orgânico. Desta forma, a produção orgânica nacional passa a ter critérios para a exploração da propriedade rural desde a produção até a comercialização, dando grande impulso ao setor, visto que a regulamentação e a criação de sistema de avaliação propiciam maior garantia aos consumidores e aumenta a credibilidade do produto (BRASIL, 2008).

Em anos recentes, diversas razões são apontadas para o aumento da procura de produtos orgânicos, incluindo a preocupação com o meio ambiente, com o uso de pesticidas e com sistemas de criação que atendam às exigências de bem-estar animal, ou a percepção de que os alimentos orgânicos são seguros e mais nutritivos quando comparados com alimentos produzidos no sistema convencional. Muitos segmentos da população têm despertado maior interesse na saúde, o que aumenta a demanda por alimentos mais “naturais” e com menor intervenção dos humanos na cadeia produtiva (ORMOND et al., 2002; CASTRO et al., 2008). Assim, a agropecuária orgânica se apresenta como um novo modelo de produção de leite e derivados, alicerçada na sustentabilidade das propriedades rurais (FELICONIO, 2008).

Em virtude do aumento da procura por alimentos orgânicos, do conseqüente acréscimo na produção de leite orgânico no país e da escassez de estudos voltados à qualidade do produto comercializado, o presente estudo pretende avaliar a composição química, a celularidade e a presença de resíduos de antimicrobianos de leite bovino produzido em propriedades certificadas como orgânicas localizadas no interior do estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido ao longo de 12 meses (12 colheitas) em duas propriedades de exploração leiteira, certificadas como orgânicas, localizadas no interior do estado de São Paulo. As propriedades possuíam entre 10 e 45 animais em lactação, em regime de duas ordenhas mecânicas diárias do tipo “balde ao pé”, com utilização de mão de obra familiar.

Foram colhidas amostras de leite de 178 animais (259 tetos), após antissepsia dos tetos com álcool 70%. Destes, 127 tetos com mastite subclínica ou clínica e 132 negativos, além de 63 amostras dos latões. O diagnóstico da mastite clínica foi baseado em alterações macroscópicas do leite (sangue, grumos, pus) na prova da caneca telada de fundo escuro e na presença de inflamação na glândula mamária (RADOSTITS et al., 2007). A mastite subclínica foi diagnosticada utilizando o teste clássico de California Masitis Test (CMT) (SCHALM et al., 1971). Os quartos mamários que apresentaram escores 2+ ou 3+ no CMT foram considerados com mastite subclínica.

As amostras para CCS e composição química do leite foram colhidas em frascos contendo o conservante celular bronopol. As amostras para CBT receberam em adição ao leite, quatro gotas do conservante azidiol. Adicionalmente foram colhidas amostras de leite de todos os animais e latões, em tubos de 15 mL, para a pesquisa de resíduos de antimicrobianos.

O Laboratório de Controle da Qualidade do Leite, ESALQ-USP/Piracicaba, SP, realizou a avaliação da composição química (gordura, proteína, lactose, extrato seco total e extrato seco desengordurado), quantificação da CCS e CBT das amostras de leite colhidas.

A detecção de resíduos foi realizada com o *kit* comercial Delvotest™ (DSM Food Specialties Dairy Ingredients, The Netherlands), conforme as recomendações do

fabricante, no Serviço de Diagnóstico de Mastite em Animais, FMVZ-UNESP/Botucatu, SP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A mastite clínica foi observada em apenas dois animais (um de cada propriedade) correspondendo a aproximadamente 1,1% dos 178 animais avaliados. Já a forma subclínica foi diagnosticada em 34,8% dos animais. De maneira similar, RIBEIRO et al. (2009) encontraram ao redor de 1,3% de animais avaliados provenientes de quatro propriedades leiteiras certificadas como orgânicas do interior do estado de São Paulo, apresentando mastite clínica e 49,3% com mastite subclínica. ELLIS et al. (2007) também observaram baixas taxas de mastite clínica nos rebanhos orgânicos na Inglaterra, aproximadamente 3,5% das vacas. Em contraste, WELLER; BOWLING (2000), também na Inglaterra, ao avaliarem 10 rebanhos orgânicos encontraram 34,7% de prevalência da mastite clínica. Os achados do presente estudo revelaram maior ocorrência da mastite subclínica, de maneira similar às propriedades convencionais, fato que pode ser justificado pelo predomínio de micro-organismos contagiosos nas infecções mamárias em vacas nos sistemas de criação orgânico e convencional, intimamente relacionados ao estabelecimento de infecções subclínicas (RIBEIRO et al., 2009).

Segundo a Normativa 051 (BRASIL, 2002) o leite de qualidade para o consumidor deve conter no mínimo 3% de gordura, 8,4% de sólidos desengordurados e 2,9% de proteína. CCS e CBT não podem ultrapassar 7,5 x 10^5 células/mL. Os resultados de CCS, composição e CBT dos latões estão apresentados na Tab. 1.

FERNANDEZ et al. (2009) avaliaram o leite ecológico produzido em unidade de produção do Rio Grande do Sul e verificaram 3,14% de gordura, 9,3% de sólidos

desengordurados e 3,19% de proteína, valores muito semelhantes aos encontrados nas duas propriedades amostradas do interior do estado de São Paulo. As pequenas variações na composição podem ser reflexo de diferenças raciais, fase de lactação dos animais, idade, além de condições de manejo, principalmente nutricional (COMERON et al., 2005). Porém, no mesmo estudo os pesquisadores encontraram média de CCS acima de 1,2 x 10^6 células/mL, valor superior aos 7,13 x 10^5 obtidos na Propriedade I e 3,2 x 10^5 células/mL da Propriedade II amostradas no presente estudo.

RIBEIRO et al. (2009) e LANGONI et al. (2009) investigaram as contagens celulares de leite proveniente de propriedades orgânicas no Brasil e observaram valores inferiores a 4,0 x 10^5 células/mL em animais com ou sem mastite. Estes achados estão em consonância com o observado na Propriedade II desta pesquisa. No intuito de mensurar parâmetros de qualidade do leite orgânico e convencional produzidos no interior de São Paulo, CAMPOS (2004) encontrou, respectivamente, 1,7 x 10^6 células/mL e 3,4 x 10^5 células/mL. De acordo com os parâmetros estabelecidos na IN 051 (Brasil 2002), que atualmente aceita na plataforma o leite com até 7,5 x 10^5 células/mL, o leite orgânico avaliado no presente estudo seria considerado impróprio para o consumo.

Na Suiça, ROESCH et al. (2007) encontraram média de 4,0 x 10^4 células/mL de CCS em propriedades de leite orgânico. ELLIS et al. (2007) encontraram aproximadamente 2,0 x 10^5 células/mL em fazendas orgânicas da Inglaterra. No entanto, na Suécia, HAMILTON et al. (2006) constataram valores de CCS variando entre 8,3 x 10^4 células/mL e 2,8 x 10^5 células/mL. Ao compararem a composição de leite cru de propriedades orgânicas certificadas e convencionais da Suécia TOLEDO et al. (2002) demonstraram não haver diferenças estatísticas entre a qualidade do leite produzido nos dois sistemas. Observaram médias de 3,37% de proteína, 4,34% de

gordura, 4,80% de lactose e CCS de $2,3x10^5$ células/mL para ambos os tipos de leite “in natura”.

MACHADO et al. (2000) pesquisaram a composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros convencionais a partir de amostras recebidas entre 1996 e 1998 no Laboratório de Fisiologia da Lactação da ESALQ-USP. As médias de gordura, proteína e lactose foram, respectivamente, 3,61%, 3,20% e 4,51%. As contagens celulares revelaram média de $5,0 \times 10^5$ células/mL. Estes achados mostraram que, orgânica ou convencional, a composição química do leite bovino e as médias da CCS são semelhantes em diversos países, incluindo o Brasil.

A ocorrência de mastite também pode ser verificada pela CBT, parâmetro utilizado para mensurar a contagem de unidades formadoras de colônias de patógenos no leite. De acordo com a IN 051, aceitam-se atualmente até $7,5 \times 10^5$ UFC/mL (BRASIL, 2002). O presente estudo encontrou média acima do permitido na Propriedade I ($7,8 \times 10^5$ UFC/mL), assim como valores acima do permitido em diferentes meses do ano, principalmente setembro, outubro e novembro de 2008 e abril de 2009, acima de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. A Propriedade II manteve-se com médias e valores individuais mensais dentro dos parâmetros de qualidade. LANGONI et al. (2009), em duas dentre três propriedades orgânicas avaliadas no interior do estado de São Paulo, encontraram $8,5 \times 10^5$ UFC/mL e $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, valores semelhantes aos evidenciados no presente estudo e também acima do permitido pela IN 051. Este achado indica que há a necessidade das propriedades que produzem leite orgânico investirem em ações que reduzam a CBT, geralmente alcançada com investimento no controle da mastite e, principalmente, em boas práticas na ordenha higiênica do leite.

A partir das amostras de leite de animais e de latões das Propriedades I e II foi investigada a presença de resíduos de antimicrobianos. Foram detectados resíduos em

6,97% amostras de leite da Propriedade I e em 9,24% da Propriedade II. Destas, 3,48% da Propriedade I e 7,51% da Propriedade II foram provenientes de animais e o restante de latões. No Brasil, RIBEIRO et al. (2009) encontraram somente quatro (2,7%) amostras de leite com resíduos, provenientes de leite de bovinos criados em sistema orgânico no interior do estado de São Paulo.

NASCIMENTO et al. (2001) encontraram resíduos de antimicrobianos em 50% dentre 96 amostras de leite convencional comercializado em Piracicaba, SP, das quais 34,8% positivas para β-lactâmicos. Em Salvador, BARROS et al. (2001) encontraram 38,5% das amostras de leite pasteurizado convencional tipo C contendo resíduos de antimicrobianos. No entanto, ALMEIDA et al. (2003) ao investigarem o leite de 158 propriedades rurais convencionais de Uberlândia, MG, detectaram resíduos de β-lactâmicos em somente 1,89% das amostras. TETZNER et al. (2005) no Triângulo Mineiro, detectaram resíduos em 33,3% das amostras de leite convencional. NERO et al. (2007) observaram resíduos em 11,4% das amostras de leite colhidas em quatro regiões leiteiras do Brasil.

A detecção de resíduos está em desacordo com as normas instituídas pelas IN 051 e IN 064 do MAPA (BRASIL 2002, 2008) que proíbem a presença de qualquer resíduo de antimicrobiano em leite produzido em sistema convencional ou orgânico.

CONCLUSÕES

A composição e os níveis celulares dentro dos limites estabelecidos no Brasil revelaram boa qualidade do leite orgânico produzido nas propriedades amostradas. Em contraste, a presença de amostras positivas para resíduos na linha de ordenha indica falha nos preceitos de produção orgânica e revela riscos para a saúde pública.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de Bolsa de Doutorado (Projeto 08/51040-4).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L.P.; VIEIRA, R.L.; ROSSI, D.A.; CARNEIRO, A.L.; ROCHA, M.L. Resíduos de antibióticos no leite de propriedades rurais da região de Uberlândia-MG. *Bioscience Journal*, v.19, p.83-87, 2003.

ARVE, A.M. Organic ways in Denmark. *Scandinavian Dairy Information*, v.4, p.12-15, 1999.

BARROS, G.M.S.; JESUS, M.M.; SILVA, M.H. Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade de Salvador. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.2, p.69-73, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa n.051 de 18 de setembro 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel.* Brasília. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/Instrução Normativa 51> Acesso em: 8 jan. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Estatísticas agropecuárias, 2005.* Brasília. Disponível em <www.mapa.gov.br> Acesso em: 15 fev. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura. *Decreto 6.323. Regulamentação da Lei dos Orgânicos 10.831/2003.* Brasília, 2007. Disponível em <http://www.planetaorganico.com.br/decreto6323.htm> Acesso em 02 de janeiro de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa n.064 de 18 de dezembro de 2008. Regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal.* Brasília. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/Instrução Normativa 64> Acesso em: 18 fev. 2010.

CAMPIOLO F.A.; SILVA F.F. Orgânicos: garantia de saúde e possibilidade de sucesso econômico para o Brasil. *Revista Cesumar*, v.11, p.145-165, 2006.

CAMPOS, E.P. *Qualidade microbiológica, físico-química e pesquisa de resíduos de antibióticos e pesticidas no leite bovino produzido pelo sistema convencional e pelo sistema orgânico.* 2004. 58p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

CASTRO, C.R.T.; PIRES, M.F.A.; AROEIRA, L.J. *Produção de leite orgânico.* Disponível em <http://www.planetaorganico.com.br/trab-leiteorganico.htm> Acesso em 8 jan. 2008.

COMERON, E.; ROMERO, L.; CUATRIN, A.; MACIEL, M. *El efecto racial e genético*. In: TAVERNA, M. *Manual de referencias técnicas para el logro de leche de calidad*. Rafaela: INTA, 2005. p.119-134.

ELLIS, K.A.; INNOCENT, G.T.; MIHM, M.; CRIPPS, P.; McLEAN, W.G.; HOWARD, C.V.; GROVE-WHITE, D. Dairy cow clean lines and milk quality on organic and conventional farms in the UK. *Journal of Dairy Research*, v.74, p.302-310, 2007.

FELICONIO, A.E. *Leite e laticínios orgânicos: resultados de uma nova agropecuária*. Disponível em <http://www.sitiodomoinho.com.br> Acesso em 2 jan. 2008.

FERNANDEZ, V.N.V.; ZANELA, M.B.; PINTO, A.T.; RIBEIRO, M.E.R. Qualidade do leite ecológico produzido em uma unidade de produção do Rio Grande do Sul. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.37, p.45-48, 2009.

FONSECA, M.F. *Mercado de produtos orgânicos.* Disponível em <http://www.planetaorganico.com.br/trab-leiteorganico.htm> Acesso em 2 jan. 2008.

HAMILTON, C.; EMANUELSON, U.; FORSLUND, K.; HANSSON, I.; EKMAN, T. Mastitis and related management factors in certified organic dairy herds in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.48, p.1-7, 2006.

IBGE. *Produção Pecuária Municipal. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*, Rio de Janeiro, v.34, p.1-62, 2006.

IFOAM. *The World of Organic Agriculture. International Federation of Organic Agriculture Moviments*, Germany, 2006. 175p.

IFOAM. *The World of Organic Agriculture. International Federation of Organic Agriculture Moviments*, Germany, 2009. 299p.

LANGONI, H.; SAKIYAMA, D.T.P.; GUIMARÃES, F.F.; MENOZZI, B.D.; SILVA, R.C. Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, p.881-886, 2009.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRÍES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua Contagem de Células Somáticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, p.1883-1886, 2000.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Revista de Nutrição*, v.14, p.119-129, 2001.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, 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*, v.27, p.391-393, 2007.

ORMOND, J.G.P.; PAULA, S.R.L.; FAVERET FILHO, P.; ROCHA, L.T. *Agricultura orgânica: quando o passado é futuro*. BNDES Setorial, n.15, p.3-34, 2002.

POLIDORO, J.C. *Orgânicos.* Reportagem do dia 28 de julho de 2006. Disponível em <http://www.brasiloeste.com.br/noticia/1871/organicos> Acesso em 2 jan. 2008.

PONCHIO, L.A.; GOMES, A.L.; PAZ, E. *Perspectivas de consumo do leite no Brasil.* Reportagem de julho de 2005. Disponível em <http://www.cepea.esalq.usp.br> Acesso em 2 jan. 2008.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. *Veterinary Medicine: A textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* USA : Saunders Elsevier, 2007. 2156p.

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

ROESCH, M.; DOHERR, M.G.; SCHAREN, W.; SCHALLIBAUM, M.; BLUM, J.W. Subclinical mastitis in dairy cows in Swiss organic and conventional production systems. *Journal of Dairy Research*, v.74, p.86-92, 2007.

SCHALM, O.W.; CARROL, E.J.; JAIN, N.C. *Bovine Mastitis*. Philadelphia : Lea and Febiger, 1971. 360p.

TETZNER, T.A.D.; BENEDETTI, E.; GUIMARAES, E.C.; PERES, R.F. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região do Triângulo Mineiro. *Higiene Alimentar*, v.19, n.130, p.69-72, 2005.

TOLEDO, P.; ANDRÉN, A.; BJORCK, L. Composition of raw milk from sustainable production systems. *International Dairy Journal*, v.12, p.75-80, 2002.

USDA. Dairy: World Markets and Trade, 2009. *United States Department of Agriculture*. Disponível em <http://www.milkpoint.com.br> Acesso em 29 set. 2010.

WELLER, R.F.; BOWLING, P.J. Health status of dairy herds in organic farming. *Veterinary Record*, v.146, p.80-81, 2000.

WILLER, H.; YUSSEFI, M. *The World of Organic Agriculture: Statistics and emerging trends*, 2003. Disponível em <http://www.ifoam.org> Acesso em 12 nov. 2009.

ZOCCAL, R. *Base de Dados: leite em números.* Embrapa/CNPGL, Juiz de Fora, 2004. Disponível em <http://www.cnpgl.embrapa.com.br/produção> Acesso em 16 jan. 2008.

Tabela 1. Resultado mensal dos valores de CCS, CBT e composição química de amostras de leite orgânico bovino colhidas dos latões de duas propriedades rurais do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011

	MÊS	CCS	CBT	Gordura (% m/m)	Proteína (% m/m)	Lactose (% m/m)	ST (% m/m)	ESD (% m/m)
Propriedade I	Set/08	399,66	1033,00	3,36	3,08	4,65	12,03	8,66
	Out/08	670,00	2727,50	3,13	3,18	4,47	11,74	8,60
	Nov/08	352,00	1665,00	3,48	2,90	4,56	11,97	8,49
	Dez/08	693,00	47,00	3,85	2,98	4,52	12,29	8,44
	Jan/09	227,00	348,00	2,85	3,08	4,53	11,46	8,61
	Fev/09	1203,00	182,50	2,39	3,35	4,58	11,31	8,92
	Mar/09	938,00	333,00	3,30	3,47	4,52	12,26	8,96
	Abr/09	2472,00	2579,00	3,41	3,93	4,37	12,70	9,29
	Mai/09	538,00	373,00	2,09	3,4	4,56	11,00	8,91
	Jun/09	209,00	25,70	3,18	3,27	4,56	11,90	8,73
	Jul/09	441,00	24,30	3,52	3,22	4,61	12,34	8,82
	Ago/09	420,70	25,30	2,70	3,32	4,61	11,65	8,95
Média	-	713,61	780,27	3,10	3,26	4,54	11,88	8,78
Mediana	-	538,00	348,00	3,30	3,22	4,56	11,97	8,73
	MÊS	CCS	CBT	Gordura (% m/m)	Proteína (% m/m)	Lactose (% m/m)	ST (% m/m)	ESD (% m/m)
Propriedade II	Set/08	284,75	47,25	3,38	3,36	4,52	12,26	8,88
	Out/08	250,33	199,66	3,38	3,45	4,52	12,32	8,94
	Nov/08	271,33	31,33	3,26	3,41	4,57	12,22	8,96
	Dez/08	232,75	51,75	3,56	3,46	4,55	12,52	8,96
	Jan/09	273,00	53,00	3,51	3,46	4,48	12,39	8,88
	Fev/09	613,66	93,66	2,98	3,33	4,45	11,70	8,71
	Mar/09	282,00	100,75	3,85	3,43	4,43	12,67	8,82
	Abr/09	291,00	26,70	3,66	3,48	4,47	12,55	8,89
	Mai/09	562,50	14,50	3,28	3,27	4,44	11,92	8,64
	Jun/09	205,67	69,70	3,90	3,23	4,53	12,64	8,74
	Jul/09	397,00	25,50	3,48	3,56	4,49	12,51	9,03
	Ago/09	271,00	25,25	3,08	3,35	4,56	12,00	8,90
Média	-	327,91	61,58	3,44	3,39	4,50	12,30	8,86
Mediana	-	282,00	51,75	3,48	3,43	4,49	12,39	8,88

---

* CCS = Contagem de Células Somáticas x 10^3 céls/mL; CBT = Contagem Bacteriana Total x 10^3 UFC/mL; ST = Teor de Sólidos Totais; ESD = Teor de Extrato Seco Desengordurado.