



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CAROLINE ALVARES SILVA

**DIAGNÓSTICO DE PROPRIEDADES LEITEIRAS DA AGRICULTURA
FAMILIAR DA REFORMA AGRÁRIA DE SANT'ANA DO
LIVRAMENTO/RS: BOAS PRÁTICAS DE ORDENHA E
IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DE
MASTITE**

**Dom Pedrito
2014**

CAROLINE ALVARES SILVA

**DIAGNÓSTICO DE PROPRIEDADES LEITEIRAS DA AGRICULTURA
FAMILIAR DA REFORMA AGRÁRIA DE SANT'ANA DO
LIVRAMENTO/RS: BOAS PRÁTICAS DE ORDENHA E
IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DE
MASTITE**

Monografia apresentada ao Curso de Pós Graduação *Lato Sensu* em Produção Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Especialista em Produção Animal.

Orientadora: Dr^a JaquelineMallmann Haas

Co-orientadora: Dr^a Deise Dalazen Castagnara

**Dom Pedrito
2014**

SILVA, Caroline Alvares

Diagnóstico de propriedades leiteiras da agricultura familiar da reforma agrária de Sant'Ana do Livramento/RS: boas práticas de ordenha e identificação de microrganismos causadores de mastite, 27 de setembro de 2014.

Nº de folhas: 40

Monografia (Especialização) Universidade Federal do Pampa, 2014
“Orientação: Jaqueline Mallmann Haas”

1.Análise microbiológica 2.Higiene 3.Sanidade Animal.

Título: Diagnóstico de propriedades leiteiras da agricultura familiar da reforma agrária de Sant'Ana do Livramento/RS: boas práticas de ordenha e identificação de microrganismos causadores de mastite.

CAROLINE ALVARES SILVA

**DIAGNÓSTICO DE PROPRIEDADES LEITEIRAS DA AGRICULTURA
FAMILIAR DA REFORMA AGRÁRIA DE SANT'ANA DO
LIVRAMENTO/RS: BOAS PRÁTICAS DE ORDENHA E
IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DE
MASTITE**

Monografia apresentada ao Curso de Pós
Graduação Lato Sensu em Produção Animal da
Universidade Federal do Pampa, como requisito
parcial para obtenção do Título de Especialista
em Produção Animal.

Monografia defendida e aprovada em: ___/___/___
Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Jaqueline Mallmann Haas
Orientadora
UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Deise Dalazen Castagnara
Co-orientadora
UNIPAMPA

Prof. Me. Juliano Gonçalves Pereira
UNIPAMPA

Prof. Me. Marcelo Pinto Paim
UFRGS

Dedico este trabalho à minha família, mãe e irmã, à minha vó e ao meu eterno amigo vô Fagundes (in memoriam), pelo amor, confiança, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me conceder ser rodeada de pessoas queridas, do bem, e que muito me ajudaram em mais essa conquista;

À minha família, mãe, vó, tia e demais que me incentivam sempre;

Em especial meu agradecimento à minha mãe, que todos os sábados de aula, acordava cedo para preparar meu mate para a viagem, e por me aguentar em momentos tensos de trabalho e pesquisa;

Aos meus queridos e verdadeiros amigos, Nadia, Adriano, Isinha meus pequenos afilhados Arthur e Sophia;

À minha amiga/irmã Fran, pelas idas pra fora comigo, realizar as visitas às propriedades nas madrugadas, ajudar nas coletas e na companhia de sempre nas descontrações e mates;

Aos meus queridos colegas e companheiros de viagem à Dom Pedrito Laise, Candido e Leonardo Peres, pelas risadas, mates e por fazerem desse ano de aula um período maravilhoso na minha formação;

Aos professores do Curso pela paciência, pela disponibilidade e pelo conhecimento que adquiri;

Às minhas mais que orientadoras Jaqueline e Deise, pelo incentivo, pela confiança e por todo o ensinamento e conhecimento que me proporcionaram;

À Luana pela incrível ajuda no Lab e aos demais futuros médicos veterinários da Unipampa Uruguaiana pela amizade, conversas e integração;

Ao professor e orientador de graduação, por ter me incentivado em meu primeiro trabalho com bovinocultura leiteira;

Aos meus colegas de IF Farroupilha, pelo apoio e colaboração para que eu concluísse esse trabalho, em especial Pati, Rubi, Nath pelos momentos de relax e descontração;

À todos minha gratidão e que esse seja novamente o início de grandes conquistas.

“Sem riscos, não conheceríamos o sabor da derrota nem o paladar das vitórias. Não erraríamos, não choraríamos, não pediríamos desculpas, não teríamos necessidade de humildade em nosso cardápio intelectual. Sem riscos seríamos conquistados e não conquistadores”.

(Augusto Cury)

RESUMO

O presente trabalho consiste em um estudo de caso realizado em duas propriedades de Agricultura Familiar da Reforma Agrária denominadas A e B, localizadas no distrito de Palomas, município de Sant'Ana do Livramento, Rio Grande do Sul. Esta pesquisa foi desenvolvida no mês de junho de 2014, por meio de visita técnica seguida da aplicação de um questionário socioeconômico e uma lista de verificação de Conformidades e Não Conformidades (*Check list*) do manejo de ordenha, higiene e boas práticas. As propriedades foram visitadas na primeira ordenha do dia, onde primeiramente realizou-se o teste de fundo do caneco preto para diagnosticar mastite clínica, seguida do teste de *California Mastitis Test*, para a detecção da presença de mastite subclínica. Quando detectada a presença de mastite subclínica com escores acima de duas cruzes, procedeu-se a amostragem de 30 ml de leite de cada teto infectado para a identificação dos agentes causadores da mastite. Como há grande variedade de patógenos que podem causar mastite, todas as amostras submetidas aos exames laboratoriais foram coletadas assepticamente e em frascos estéreis para obter um diagnóstico seguro e correto e posteriormente transportadas em caixas de poliestireno expandido com gelo reciclado ao Laboratório de Diagnósticos de Doenças Bacterianas e Fungicas Animais da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana. Os resultados obtidos mostram que quanto aos itens que referem-se à higiene de ordenha, as propriedades atenderam a maioria dos requisitos, como frequência adequada de higienização, produtos utilizados para limpeza dos equipamentos e produtos utilizados, seguidos do atendimento às normas dos fabricantes, porém, quanto ao acondicionamento dos equipamentos e utensílios, as propriedades não atenderam ao esperado. Nas análises microbiológicas, constatou-se que em 86,6% das amostras o agente causador da mastite subclínica trava-se do *Staphylococcus spp.* No acompanhamento das ordenhas comparado aos resultados microbiológicos, a presença de *Staphylococcus spp.*, assim como *Streptococcus spp.* evidenciam ser resultados da prática de ordenha, onde os animais não recebem uma assepsia adequada antes das ordenhas individuais, o que pode ser observado nas amostras dos tetos AE (Anterior Esquerdo) dos animais 2, 4, 6, 10. A propriedade A possui dois conjuntos de ordenhadeiras, onde os animais são ordenhados em duplas. Os animais de números pares foram ordenhados nos mesmos conjuntos, portanto, há possibilidade de relação entre a desinfecção dos tetos e das teteiras com a presença de mastite no mesmo quarto mamário. Quanto a *Streptococcus spp.* foi obtido resultado de presença em 6,6% das amostras, podendo esse microrganismo possuir características tanto de contaminação contagiosa quanto ambiental. Por falta de assistência técnica e disponibilidade de informações aos produtores, nem sempre são tomadas as medidas necessárias para evitar a ocorrência de mastite, o que acarreta em sérios prejuízos na produção. As técnicas adotadas pelos produtores para realização da ordenha apresentaram serem os principais efeitos para a prevalência de mastite subclínicas no rebanho estudado, sendo que os microrganismos isolados possuem relação com mastite contagiosa ao invés de ambientais, estreitando assim as relações prática de ordenha e presença de mastite.

Palavras-chave: Análise Microbiológica. Higiene. Sanidade Animal.

ABSTRACT

The present research consists in a study accomplished in two Familial Agricultural Farms of the Agrarian Reform named A and B, placed in the Paloma's district in the city of Sant' Ana do Livramento, Rio Grande do Sul. This research was developed in June 2014, where it was accomplished a technique visit followed by a questionnaire application and a verification list of Compliance and Non-Compliance (*Check List*). The farms were visited in the first milking of the day, where it was accomplished a black cup botton test to diagnose clinical mastitis, and then the *California Mastitis Test*, evidencing the presence of subclinical mastitis. To the animals that showed the presence of mastitis and higher scores than two crosses, it was collected 30 ml of milk from each infected udder to the microbiological analysis, with the purpose to identify microorganisms that cause the mastitis. As there are many kinds of pathogen that can cause the mastitis, all the samples that were submitted to the lab exams were asepycally collected and in sterile bottles to obtain a secure and correct diagnosis. The sambles were transported in polystyrene expanded recycled in a Diagnosis of Bacterial and Fungal Diseases Laboratory Animals from the Federal University of Pampa, Uruguaiiana College, not more than 24 hours from the collect to the microbiological analysis. The obtained resuts showed that related to the milking hygiene, the farms attended the most part of the requirements, like the frequency of sanitation, products used in the equipments cleaning, used products proceeding the manufacturers, but related to the equipments and utensils packaging the farms didn't attend the expected result. In the microbiological analysis, 86,6% of the samples showed the *Staphylococcus spp.* presence. In the milking accompaniment comparing the the microbiological results, the *Staphilococcus spp.* presence and the *Streptococcus spp.* showed to be results of the milking, where the animals didn't receive correct asepsis before the individual milking, what can be observes in the left anterior udder (L A) of the 2,4,6,10 animals. The farm A has two paris of milking, and the animals are milking in couples. The even numbers were milked in the same group, so, there is a possibility of relation between the udder disinfection and the milking with the presence of mastitis in the same udder. Related to the *Streptococcus spp.* it was obtained the presence in 6,6% of the samples, and this microorganism can have contagious and ambiental characteristics. Because of the fault of assitency and information available to the farmers, not always the necessary attitudes are taken to the mastitis evidence, what causes serious damages in the milk production. The techniques adoptes by the farmers to accomplish the milking showed to be the mainly effects to happen the mastitis in the studied cows, the isolated microorganisms have a relation with the contagious mastitis instead of environmental, so it is close related the milking and the mastitis presence.

Key words: Microbiological analysis. Hygiene. Animal Health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráfico representativo dos resultados obtidos no <i>Check list</i>	24
Figura 2- Acondicionamento dos equipamentos de ordenha.....	24
Figura 3 - Curral de espera dos animais antes da ordenha.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização do sistema de produção leiteira nas propriedades.....	22
Tabela 2 - Relação dos animais e tetos infectados, resultados da Coloração de Gram e Morfologia.....	27
Tabela 3 - Relação da morfologia e arranjos dos microrganismos isolados.....	28
Tabela 4 - Resultados Provas Complementares para Identificação dos microrganismos isolados.....	28
Tabela 5 – Identificação dos microrganismos causadores de mastite isolados a partir do rebanho estudado.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Tema	12
1.2 Objetivos.....	12
1.2.1 Objetivo Geral	12
1.2.2 Objetivos Específicos.....	12
1.3 Justificativa	12
1.4 Organização do Trabalho	13
2. DESENVOLVIMENTO.....	13
2.1 Referencial Teórico	13
2.1.1 Produção Leiteira na Agricultura Familiar.....	13
2.1.2 Produtividade frente às dificuldades	14
2.1.3 Aspectos Produtivos e Sanitários	15
2.1.4 Agentes Etiológicos da Mastite Bovina.....	15
2.2. Metodologia.....	16
2.2.1 Diagnóstico das Propriedades.....	16
2.2.2 Teste com <i>California Mastitis Test</i>	17
2.2.3 Coleta de Amostras	18
2.2.4 Análises Microbiológicas	18
2.2.4.1 Meio seletivo.....	18
2.2.4.2 Isolamento	18
2.2.4.3 Provas de identificação de microrganismos	19
2.2.4.3.1 Coloração de Gram	19
2.2.4.3.2 Prova de Catalase	19
2.2.4.3.3 Prova de Coagulase em lâmina	20
2.2.4.3.4 Manitol Salgado	20
2.2.4.3.5 Ágar Bile.....	20
2.2.4.3.6 Séries Bioquímicas.....	21
2.3. Resultados e Discussões.....	21
2.3.1 Caracterização das Propriedades	21
2.3.2 Diagnóstico de Prática de Ordenha	22
2.3.3 Acompanhamento da prática de ordenha	24
2.3.4 Resultados Microbiológicos	25
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXO I – Check list de conformidade e não conformidades	36

1. INTRODUÇÃO

A atividade de produção leiteira é um segmento de grande relevância para o desenvolvimento sócio econômico e cultural de diversas regiões brasileiras, pois possibilita a permanência de muitas famílias no campo.

No Brasil, uma de cada três propriedades classificadas como sendo da agricultura familiar, desenvolvem a atividade da bovinocultura leiteira, o que demonstra sua importância para esse segmento pelos produtores (SOUZA e WAQUIL, 2008).

Da mesma forma, para o setor do comércio e varejo, o leite e seus derivados possuem importante papel na geração de renda, pois na alimentação humana, representam uma excelente opção de complementação alimentar de qualidade. Entretanto, segundo Dürr (2005), por ser um produto altamente perecível, o leite tem suas características físicas, químicas e biológicas facilmente alteradas pela ação de microrganismos e pela manipulação a que é submetido, processo que se inicia durante sua secreção na glândula mamária e durante sua obtenção por meio da ordenha.

Dentre os fatores que podem afetar as características do leite durante sua secreção destacam-se a nutrição e a sanidade dos animais, enquanto na sua obtenção, as práticas de ordenha e o acondicionamento do leite pós ordenha são fatores determinantes na sua qualidade. No que tange à sanidade animal, do ponto de vista da produtividade, do risco de doenças, do comércio internacional e do bem-estar animal, a mastite lidera o ranking dos problemas encontrados na produção leiteira (GERMANO e GERMANO, 2011).

A mastite, inflamação do úbere, é a doença mais frequente de produção e mais onerosa em rebanhos leiteiros (HALASA et al, 2007), definida como processo inflamatório complexo na glândula mamária decorrente de interação entre animais, meio ambiente e agente etiológico. Destaca-se que as perdas relativas à mastite são duas vezes mais elevadas do que as perdas relativas à infertilidade e doenças reprodutivas (OLIVEIRA et al, 2009).

Os microrganismos causadores de mastite são divididos em classes, os contagiosos e os ambientais, onde a distinção destas classes dependem de sua forma de transmissão (SANTOS e TOMAZI, 2012). Microrganismos contagiosos são tipicamente mais adaptados à vaca e causam infecções persistentes sem sintomas clínicos graves. Os agentes infecciosos mais comumente isolados da mastite são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcusagalactiae* (SANTOS e TOMAZI, 2012). O principal reservatório destes patógenos é o úbere de uma vaca infectada, e os principais são disseminados entre as vacas ou entre os quartos mamários

durante a ordenha por meio de equipamentos contaminados, mãos dos ordenadores, ou panos usados em mais de uma vaca (SILVA et al., 2011).

A aplicação de Boas Práticas de Produção (BPP) na bovinocultura de leite é uma alternativa para minimizar os riscos de contaminação nas diferentes etapas do processo de produção. Esses procedimentos são capazes de reduzir a contaminação microbiana e/ ou física do leite. BPP fundamentam-se na exclusão, remoção, eliminação, inibição da proliferação de microrganismos indesejáveis e/ou corpos estranhos e devem ser implantadas em toda cadeia produtiva.

O ponto de partida para essas adequações é a educação do produtor. No entanto, para essas mudanças, exigem-se investimentos que, necessariamente, não implicam em grandes somas de recursos, já que é possível produzir leite de qualidade com pouco recurso financeiro e tecnológico.

Esses agravos podem ter relação direta com a política de assistência técnica, extensão rural e de crédito apropriado, frente às necessidades do produtor em se adequar as exigências da Instrução Normativa nº62, de 29 de dezembro de 2011 e aumentar a produtividade, garantindo um produto seguro e de qualidade desejada pelo mercado consumidor.

Desta forma, o acompanhamento nas propriedades identificando irregularidades na prática de ordenha, serve de veículo a fim de proporcionar aos produtores maiores informações para que o índice de perdas na produtividade venha a declinar. Porém para a adoção destes treinamentos e acompanhamentos faz-se necessário estudos contemplando a identificação de microrganismos e os relacionando com a prática realizada durante as ordenhas nas propriedades.

Assim, o presente trabalho teve como problemática de pesquisa a determinação de microrganismos causadores de mastite bovina relacionando-os às práticas de manejo e ordenha, possibilitando comprovar a importância do acompanhamento *in loco* para diagnosticar as necessidades e realidades encontradas na produção de leite bovino, quanto à sanidade, bem-estar animal, manejo e higiene de ordenha, nas propriedades estudadas no município de Sant'Ana do Livramento/RS.

1.1 Tema

Diagnosticar a prática da atividade leiteira em propriedades de Agricultura Familiar da Reforma Agrária, seguido da pesquisa de microrganismos causadores da mastite bovina e suas relações com as Boas Práticas de Manejo e Ordenha.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Objetivou-se com este trabalho diagnosticar quais são os principais agentes causadores de mastite bovina, através da tipificação de duas propriedades rurais de assentados da reforma agrária e possível identificação da relação microrganismo e boas práticas de manejo e ordenha.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Destacar a importância das Boas Práticas (Manejo e Ordenha) com a produtividade e qualidade do leite obtido nas propriedades rurais estudadas;
- Identificar os microrganismos presentes nas amostras de leite coletadas dos animais que apresentaram mastite subclínica, identificada através do diagnóstico com CMT (*California Mastitis Test*)
 - Confrontar os resultados laboratoriais com os dados obtidos através da lista de verificação (*Check List*) e o questionário aplicado nas propriedades.

1.3 Justificativa

A mastite bovina é considerada a principal patogenia do gado leiteiro, determinando muitas vezes os principais prejuízos econômicos para produtores e perdas significativas para os laticínios, que por sua vez dependem do setor primário para sua produtividade e qualidade aferido aos produtos beneficiados.

Desta forma, fazem-se necessários estudos que contemplem a identificação de microrganismos através do acompanhamento nas propriedades e diagnosticando irregularidades na prática de ordenha, posteriormente possibilitando a correlação dos microrganismos pesquisados com as práticas adotadas pelos produtores durante a obtenção do leite.

1.4 Organização do Trabalho

O presente trabalho encontra-se organizado em três seções:

- Referencial teórico sobre a produção leiteira na agricultura familiar e principais impactos na produção causados por mastite bovina;
- Metodologia de aplicação da pesquisa;
- Resultados obtidos ao término da pesquisa, seguido de considerações finais.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Referencial Teórico

2.1.1 Produção Leiteira na Agricultura Familiar

Os assentamentos rurais são o resgate a territorialização dos agricultores familiares excluídos pelo modelo capitalista. O retorno dessas famílias assentadas à atividade produtiva recupera sua dignidade através da produção de alimento que dá uma resposta frente à demanda devido ao crescimento populacional (MEDEIROS et al., 2012).

De acordo com Vilela et al (2002) e Dalcin et al. (2009), intrínsecos ao sistema capitalista, os processos de avanços e modernidades tecnológicas no meio rural, tornam o grupo de agricultores familiares mais vulneráveis. Frente a este paradigma, a atividade leiteira compõe uma produção atraente, pois proporciona autonomia relativa para os produtores que contam com mão de obra de cunho familiar no desempenho das práticas produtivas.

Apesar de o termo agricultura familiar ser recente, este segmento social é entendido e debatido desde os primórdios. Seu papel é relevante para o desenvolvimento do país, tanto sob o ponto de vista produtivo como para as relações políticas e sociais que se estabelecem, e na construção da cidadania (DALCIN et al., 2009).

A manutenção da agricultura familiar se dá pelo modo como ela interage com o capitalismo, e esta interação varia em formas heterogêneas e muito particulares. Assim, a agricultura familiar tem certa autonomia em relação ao capital e se reproduz nessas condições. Contudo, o desenvolvimento no setor depende das relações com o ambiente e o espaço em que estão inseridas, sendo a reprodução o resultado de um ato coletivo (SCHNEIDER et al., 2006).

Na maior parte dos assentamentos do município de Sant'Ana do Livramento/RS, as linhas de desenvolvimento apontam para a produção de pecuária (gado de leite e corte), soja, arroz, uva, pêssego entre outros produtos de subsistência (INCRA,2009).

A produção leiteira ocorre principalmente através da COOPERFORTE (Cooperativa de Assentados da Fronteira Oeste), com 525 famílias associadas. Em geral é utilizada a pastagem nativa e melhorada como fonte nutricional associada à ração balanceada. Média de produção de 6.000 Litros/família/mês. O leite é vendido *in natura*, destinado à COSULATI, localizada no município de Pelotas/RS, cerca de 300 km de distância, para o beneficiamento (AGUIAR, 2010).

2.1.2 Produtividade leiteira

O leite, além de ser um alimento fundamental para saúde humana, ele apresenta-se como uma atividade econômica de suma importância na economia do Brasil e, em especial, para um número significativo de agricultores familiares (DALCIN et al, 2009).

A segurança alimentar em relação aos produtos agropecuários é uma preocupação constante nas cadeias produtivas, nelas, produtores, processadores, distribuidores e consumidores têm a preocupação com a qualidade desses alimentos e de seus derivados (SILVA et al., 2011).

No que concerne à produção leiteira, a preocupação refere-se aos efeitos sobre a saúde humana, meio ambiente e bem estar animal, bem como a sanidade e qualidade dos produtos ofertados (MONARDES, 2008).

A mastite bovina, por sua vez, é considerada a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, pela redução da quantidade, comprometimento e qualidade do leite, e às vezes pela perda total da capacidade secretora da glândula mamária (MASSEI, 2008; NÓBREGA,2009).

Segundo Lopes (2013), o impacto negativo da mastite segue com o leite além dos portões das propriedades. Mudanças na sua composição como redução de cálcio, fósforo, proteína e gordura, e aumento do sódio e cloro reduzem a sua qualidade.

Os antibióticos usados para tratamento da mastite causam grande preocupação para a indústria e para a saúde pública, e o seu resíduo no leite interfere com o processamento de muitos produtos lácteos como a diminuição da síntese de proteínas importantes, por exemplo, da caseína e o aumento das proteínas do soro, que são indesejáveis para a produção de queijo e outros produtos fermentáveis (FONSECA e SANTOS, 2000; LOPES et al., 2013).

2.1.3 Aspectos Produtivos e Sanitários

O aumento da produtividade leiteira é de grande interesse entre produtores, técnicos e pesquisadores e está na dependência de fatores genéticos, sanitários, ambientais, nutricionais e suas interações (TEIXEIRA et al, 2010). Dessa forma, a baixa produtividade dos rebanhos leiteiros deve estar associada à qualidade genética dos animais, à alimentação e ao nível tecnológico aplicado pelos produtores em suas unidades de produção (PATÊS et al., 2012).

A saúde da glândula mamária, a higiene de ordenha, o ambiente em que a vaca fica alojada e os procedimentos de limpeza do equipamento de ordenha afetam diretamente a contaminação microbiana do leite cru (GUERREIRO et al., 2005).

No processo de obtenção do leite, a ordenha constitui a etapa de maior vulnerabilidade para a ocorrência de contaminação por sujidades, microrganismos e substâncias químicas que podem ser imediatamente incorporados ao produto *in natura* e saúde do animal (COSTA, 2006).

A desinfecção dos tetos antes e após a ordenha (pré e pós “dipping”) reduzem significativamente os valores médios de microrganismos mesófilos e psicotróficos. Porém, além da higienização dos tetos, é de suma importância que o ordenhador adote práticas higiênicas como assepsia das mãos, utensílios e equipamentos que serão utilizados à obtenção do leite (KRUTZMANN, 2008; MILLOGO et al., 2010).

Os processos de limpeza e sanitização dos utensílios de ordenha ocorrem em quatro etapas, pré lavagem com água (38-40°C), lavagem com detergente alcalino ou ácido, enxague com água (preferencialmente morna) e sanitização, sendo o cloro o agente mais indicado (CORTEZ e CORTEZ, 2008).

A qualidade da água utilizada nas propriedades também influi na qualidade do leite cru, podendo ser importante fonte de contaminação ao produto e a sanidade do animal (ELMOSLEMANY et al., 2009; GUIMARÃES e GARCIA, 2009).

2.1.4 Agentes Etiológicos da Mastite Bovina

Denominam-se mastites ou mamites os processos inflamatórios agudos ou crônicos das glândulas mamárias, caracterizados pelo aumento de leucócitos no leite proveniente da glândula afetada, geralmente superior a 200 mil células/mL (GERMANO e GERMANO, 2011).

As mastites se caracterizam por alterações físicas, químicas e bacteriológicas do leite e distúrbios patológicos do tecido glandular. As modificações mais importantes observadas no leite incluem, além do aumento do número de células leucocitárias, a alteração da cor e a presença de grumos (RIBEIRO JUNIOR, 2012; GERMANO e GERMANO, 2011).

A etiologia dessa patologia está relacionada ao manejo animal, principalmente na ordenha, onde os animais estão mais susceptíveis à exposição aos agentes bacterianos (SILVA et al., 2011). As mastites primárias apresentam uma variada gama de agentes etiológicos, porém, a maior parte dos casos é causada por bactérias (GERMANO e GERMANO, 2011).

Os principais agentes etiológicos de mastite foram convencionalmente classificadas quanto a sua origem e o modo de transmissão em dois grupos, microrganismos contagiosos, presentes no animal com ou sem mastite; e os chamados microrganismos ambientais, ubíquos, presentes no ar, água, cama e fezes (ALMEIDA et al., 2005; GERMANO e GERMANO, 2011).

No Brasil, um estudo sobre ocorrência de infecções intramamárias no período pós-parto em primíparas indicou alta prevalência de quartos infectados (cerca de 26%) e alta incidência de mastites clínicas nos primeiros 7 dias pós-parto (20%). Entre os agentes mais frequentemente isolados encontram-se: *Staphylococcus* spp. coagulase negativo (64,2%) e coagulase-positivos (8,52%), *Streptococcus* spp. (7,96%), *Actinomyces pyogenes* (4,55%), *Mycoplasmabovigenitalium* (3,4%) e *Escherichia coli* (2,84%) (FONSECA e SANTOS, 2007).

A origem do microrganismo e a importância de cada um na patogênese da doença é de relevância para a realização da cultura e identificação da espécie, para outros, é suficiente caracterizar o gênero ou grupo a que eles pertencem. Um diagnóstico correto é imprescindível para se aplicar medidas diferenciadas de controle e sugerir alterações a respeito do manejo do rebanho (ALMEIDA et al., 2005).

2.2. Metodologia

2.2.1 Diagnóstico das Propriedades

Este trabalho consiste em um estudo de caso realizado em duas propriedades de Agricultura Familiar da Reforma Agrária denominadas A e B, localizadas no distrito de Palomas no município de Sant'Ana do Livramento, Rio Grande do Sul. Esta pesquisa foi desenvolvida no mês de junho de 2014, onde foi realizada uma visita técnica seguida da

aplicação de um questionário e uma lista de verificação de Conformidades e Não Conformidades (*Check list*).

O *check list* foi composto por 43 itens observados e indagados aos produtores das propriedades estudadas (APÊNDICE1), mediante aos Pontos de Controle: instalações do curral e sala de ordenha, estado de conservação e higiene de equipamentos e utensílios, cuidado com os animais e ordenha, descarte de resíduos sólidos, higiene e rotina dos ordenadores.

Os Pontos de Controle foram elaborados de acordo aos preceitos contidos no Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênicos-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos, aprovado pela portaria MA n° 368, de 4 de setembro de 1997, Instrução Normativa n° 62 de dezembro de 2011.

O questionário também serviu como ferramenta a fim de caracterizar o tempo em que os produtores trabalham na atividade; idade dos mesmos; animais em lactação, produção leiteira; capacitação do ordenhador; bonificação no preço do leite (Volume, CBT, CCS ou Gordura), destino do leite produzido e se a propriedade recebe assistência técnica.

2.2.2 Teste com *California Mastitis Test*

As propriedades foram visitadas na primeira ordenha do dia, onde foi realizado o teste de fundo do caneco preto para diagnosticar mastite clínica, seguida do teste de *California Mastitis Test*, evidenciando a presença de mastite subclínica.

Inicialmente os tetos dos animais foram higienizados com água corrente, posteriormente os tetos foram secados com toalha de papel na propriedade A e com toalha de pano na propriedade B, rotina normal das propriedades.

As vacas foram ordenhadas de acordo ao número de lactações, iniciando por primíparas. Subsequente à prática de higiene dos animais para a ordenha, realizou-se o teste de CMT.

O exame *California Mastitis Test* (CMT) é recomendável para detecção de mastite em nível de campo ou ao pé da vaca. Serve para detectar processo inflamatório da glândula mamária, evidenciando o aumento de células somáticas (TRONCO, 2008).

O princípio da prova baseia-se na reação de um detergente aniônico (aquil-aril-sulfonato de sódio), que atua sobre as células presentes no leite, rompendo suas membranas e liberando material nuclear, que produz viscosidade, que caracteriza uma reação cuja interpretação depende da intensidade e pode ser interpretado em termos escores: negativos, traços, cruces, uma cruz, duas cruces ou três cruces (TRONCO, 2008).

Para os animais que apresentaram presença de mastite com escores a cima de duas cruzes, foram coletados 30 ml de leite de cada quarto mamário infectado para análise microbiológica, a fim de identificar microrganismos causadores de mastite.

2.2.3 Coleta de Amostras

Antes de coletar as amostras os tetos que apresentaram presença de mastite sofreram assepsia com álcool a 70% e foram secados com toalha de papel descartável.

As amostras foram submetidas a resfriamento de 10°C em refrigerador doméstico durante 8 horas e posteriormente transportadas em caixas de poliestireno expandido com gelo reciclado ao Laboratório de Diagnósticos de Doenças Bacterianas e Fungicas Animais da Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, não ultrapassando 24 horas da coleta ao inicio das análises microbiológicas.

2.2.4 Análises Microbiológicas

2.2.4.1 Meio seletivo

Para os isolamentos de microorganismos, foram semeadas amostras em meios de cultura, como Ágar Sabouraud, para fungos, Ágar MacConkey, para crescimento de Enterobactérias, sendo esse meio próprio para crescimento de Gram negativos e o Ágar Sangue, para crescimento de diversos microrganismos, favorecendo a diferenciação de *Streptococcus*spp.e*Staphylococcus*spp.

2.2.4.2 Isolamento

Uma alçada de cada amostra foi transferida para o meio sólido em placa de pétri e estriada com alça bacteriológica sobre o meio. A inoculação foi feita em três estrias, onde estriou-se até a metade da placa, com movimento zig-zag. Ao atingir a metade, girou-se a placa a 90° e estriou-se até a metade (1/4 da placa), girou-se novamente a placa a 90° e estriou-se o meio restante. Essa técnica de esgotamento em estrias é utilizada para obtenção de colônias isoladas.

Posteriormente as placas foram incubadas em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C de 24 a 48 horas.

2.2.4.3 Provas de identificação de microrganismos

2.2.4.3.1 Coloração de Gram

Com a finalidade de identificar as colônias que cresceram em seus respectivos meios de cultura e sua morfologia, utilizou-se a técnica de coloração de Gram.

Preparou-se um esfregaço fino onde a colônia foi fixada com a solução cristal violeta (corante) durante um minuto. Após esgotou-se a lâmina e cobriu-a com lugol(mordente) durante um minuto, inclinou-se a lâmina a 45° e lavou-a com água corrente, após com álcool 95°GL (diferenciador). Posteriormente cobriu-se a preparação com uma solução fucsina de Ziehl (contracorante) durante 15 a 30 segundos. No decorrer, colocou-se uma gota de óleo de cedro no centro do esfregaço, após esse processo observou-se a morfologia e coloração dos microrganismos no microscópio óptico.

A coloração de Gram utiliza características diferenciais das células bacterianas, essas referem-se à estrutura da parede celular dos microrganismos.

Os microrganismos que contêm altos teores de ácidos teicóico em sua parede celular se coram, pela coloração de Gram, em azul intenso e são chamados de Gram positivos.

Os microrganismos que contêm lipopolissacarídeos na membrana externa somente se coram com o contracorante, mostrando-se da cor do mesmo (vermelho) e são denominados Gram negativos.

Durante o processo de coloração, o tratamento com álcool (ou álcool-cetona) extrai os lipídeos, daí resultando uma porosidade ou permeabilidade aumentada da parede celular das Gram negativas.

Assim, o complexo cristal violeta-iodo (CV-I) pode ser retirado e as Gram negativas são descoradas. A parede celular diferente torna-se desidratada durante o tratamento com álcool, a porosidade diminui, a permeabilidade é reduzida e o complexo CV-I não pode ser extraído.

2.2.4.3.2 Prova de Catalase

A confirmação bioquímica foi realizada através da prova de catalase, que baseia-se na capacidade da enzima catalase de decompor o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, o que é evidenciado por meio da formação de borbulhas.

Na prova de catalase, selecionou-se uma Unidade Formadora de Colônia (UFC) e transferiu-se para uma lâmina e gotejou-se peróxido de hidrogênio a 3%. Foi considerado positivo quando houve efervescência. A enzima catalase protege a célula bacteriana do efeito tóxico do peróxido rompendo o mesmo em H₂O.

2.2.4.3.3 Prova de Coagulase em lâmina

A maioria das cepas de *Staphylococcus aureus* possui a coagulase ligada (ou fator aglutinante) na superfície da parede celular, que reage com o fibrogênio do plasma causando a coagulação do mesmo.

Para a confirmação de *Staphylococcus aureus*, colocou-se duas gotas de salina na lâmina, emulsionou-se uma colônia isolada, após colocou-se uma gota de plasma homogeneizando com um palito de plástico e observando se houve aglutinação em 10 segundos.

2.2.4.3.4 Manitol Salgado

Meio de cultura usado pra isolamento de *Staphylococcus aureus* de amostras biológicas como urina, secreções, feridas e exsudatos, podendo ser usado na indústria alimentícia.

O procedimento baseia-se na inoculação da amostra por estrias de esgotamento da alça de platina. Após inoculada a placa foi incubada à 35°C por 24 horas.

Não havendo crescimento bacteriano, constata-se amostra isenta de bactérias. *Staphylococcus aureus* fermentadores de manitol produzem colônias grandes e rodeadas de uma zona amarela.

2.2.4.3.5 Ágar Bile

O Bile Esculina Ágar é um meio indicado para isolamento e diferenciação de Enterococos e Estreptococos. A presença de bile no meio permite o crescimento de microrganismos Gram positivo e Estreptococos à excessão dos Enterococos e Estreptococos do grupo D. A hidrólise da esculina garante a diferenciação entre os dois gêneros.

Para o isolamento, colocou-se os tubos contendo Bile Esculina Ágar na estufa bacteriológica em temperatura de 35-37°C, quando o tubo atingiu essa temperatura, espalhou-

se a amostra sobre a superfície inclinada do tubo e incubou-se a temperatura entre 35-37°C por 18-24 horas.

Havendo crescimento com o desenvolvimento de uma coloração marrom-negra difusa pelo meio considera-se a esculina hidrolisada pela bactéria em análise.

2.2.4.3.6 Séries Bioquímicas

Para a identificação das Enterobactérias, foi realizado uma série bioquímica com Three Sugar Iron (TSI), Citrato, Uréia, Vermelho Metila(V.M) e Voges Proskauer (V.P).

2.3. Resultados e Discussões

Os resultados são apresentados para as três fases distintas da pesquisa: caracterização das propriedades estudadas; acompanhamento da prática de ordenha, com respectivas etapas do processo, manejo, higiene e obtenção do leite e por conseguinte as análises microbiológicas realizadas com o intuito de identificar os microrganismos causadores de mastite bovina e sua relação com as práticas adotadas pelos produtores.

2.3.1 Caracterização das Propriedades

Não houve diferença da estrutura, nem etapas realizadas nas propriedades, sua caracterização pode ser acompanhada na Tabela 1, onde observa-se que além do espaço territorial ser o mesmo a produtividade e estratégias assemelham-se.

Tabela 1 - Caracterização do sistema de produção leiteira nas propriedades.

Propriedade	Produção média (litros/vaca/dia)	Animais em lactação	Nutrição Animal	Área de produção	Predominância de atividade
A	15L a 21L	10	Pastagem melhorada	20 hectares	Produção leiteira
B	10L a 18L	8	Pastagem Melhorada	20 hectares	Produção leiteira

Fonte: As autoras, 2014.

A produção leiteira é uma atividade recente para os produtores da propriedade A, correspondendo a três anos, desde que receberam a área para iniciarem alguma atividade de produção, a prática é realizada pelo casal de produtores, sendo essa a primeira experiência com produção leiteira.

A propriedade B desenvolve a atividade à aproximadamente dez anos, porém as dificuldades enfrentadas entre as propriedades estudadas são as mesmas, principalmente quanto à assistência técnica, capacitação e treinamento. Os benefícios encontrados para produção leiteira dão-se pela oportunidade de emprego, otimização e maior aproveitamento da área territorial.

Outro item proposto no questionário apontava se as propriedades recebiam algum incentivo ou bonificação a fim de produzirem mais ou até mesmo buscarem melhorias para suas respectivas propriedades. O leite produzido é destinado a um laticínio localizado no município de Pelotas/RS, por intermédio da COOPERFORTE (Cooperativa de Assentados da Fronteira Oeste) e a bonificação é atribuída apenas pela quantidade do produto, fazendo com que os produtores não busquem alternativas para melhorarem a qualidade do leite produzido.

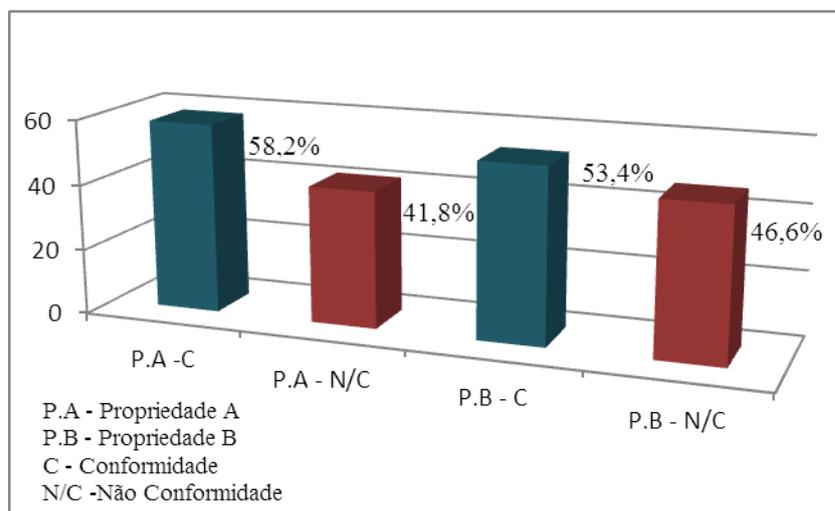
A bonificação pela qualidade do leite estimularia o produtor a se preocupar e buscar produzir leite com baixa Contagem Bacteriana Total e baixa Contagem de Células Somáticas. Pois a propriedade pode ter equipamentos de ponta, materiais e utensílios de ótima qualidade, ter boa estrutura e animais excelentes, mas se o ordenhador ou produtor não estiver consciente da importância de seu trabalho em relação à qualidade, os resultados poderão ser ainda negativos.

2.3.2 Diagnóstico de Prática de Ordenha

Quanto ao diagnóstico de prática de ordenha e manejo, a aplicação do *check list* serviu como ferramenta importante para a coleta de dados para que posteriormente fosse possível confrontar com os resultados obtidos nas análises microbiológicas.

De acordo com o apresentado na Figura 1, as propriedades precisam adequar-se para que a dicotomia produtividade e qualidade possam avançar. Quanto às instalações as propriedades não utilizam o espaço apenas para a prática de ordenha, mas também como depósito de materiais e rações.

Figura 1 – Gráfico representativo dos resultados obtidos no *Check list*



Fonte: As Autoras, 2014.

Quanto aos itens que referem-se à higiene de ordenha, observou-se que as propriedades atenderam a maioria dos itens, como frequência adequada de higienização, produtos utilizados para limpeza dos equipamentos, produtos utilizados seguidos do atendimento às normas dos fabricantes, porém quanto ao acondicionamento dos equipamentos e utensílios as propriedades não atenderam ao esperado (Figura 2).

Figura 2- Acondicionamento dos equipamentos de ordenha



Fonte: Arquivos das Autoras, 2014.

As ordenhas foram acompanhadas nas duas propriedades, e referente à higiene e limpeza dos animais, a propriedade A, higieniza os tetos das vacas com água corrente, seguida da secagem com papel toalha, se diferenciando da propriedade B que utiliza toalha de tecido para secagem dos tetos e posterior colocação das teteiras.

De acordo com Germano e Germano (2011), o leite secretado por vacas infectadas contém uma quantidade variável de microrganismos patogênicos. A prática de ordenha do rebanho propicia condições de transmissão dessas bactérias entre quartos mamários e entre vacas, seja por meio da ordenhadeira mecânica, das mãos do ordenhador ou de toalhas de tecido utilizadas na secagem do teto.

Andrews et al. (2008), aponta que várias técnicas podem ser empregadas no momento da ordenha com o intuito de minimizar o risco de transmissão, sendo elas, uso de água com desinfetante na lavagem do teto, emprego de toalhas de papel individual para a secagem do teto, uso de luvas de borrachas limpas, desinfecção do teto antes da ordenha e a desinfecção ou tratamento térmico dos copos da ordenhadeira após cada vaca ordenhada. Algumas das práticas citadas eram adotadas nas propriedades, porém, o último item não era aplicado em nenhuma das propriedades diagnosticadas.

Outro fator que favorece a infecção dos animais e subsequente a queda de produtividade é o curral de espera dos animais antes da ordenha. Um ambiente limpo (1) e acomodação ideal para os animais (2) servem como alternativa de controle para a prevalência de mastite em rebanhos leiteiros (ANDREWS et al., 2008), sendo esses fatores observados nas propriedades e encontram-se desconformes, podendo servir de veículo para a infecção dos animais (Figura 3).

Figura 3 - Curral de espera dos animais antes da ordenha.



Fonte: Arquivos das autoras, 2014.

2.3.3 Acompanhamento da prática de ordenha

Após o preenchimento do *check list* e a entrevista com os produtores através da aplicação do questionário, acompanhou-se a rotina de ordenha, ponto principal da presente

pesquisa. Como abordado na parte introdutória da mesma, a mastite bovina é uma das principais causas da queda de produtividade frente ao sistema de produção leiteira. A fim de identificar e quantificar a presença de mastite foram realizados dois testes de diagnósticos de mastite.

Foram ordenhados na propriedade A dez animais, onde 60% das vacas apresentaram mastite subclínica cujo teste CMT foi positivo em duas cruces, sendo que nenhum desses animais apresentou mastite clínica ao ser utilizado o método do caneco de fundo escuro.

Na propriedade B foram ordenhados oito animais, sendo que 87,5% dos animais apresentaram resultado positivo para o diagnóstico de mastite subclínica e 25% dos animais apresentaram mastite clínica.

Ambas as propriedades, após ordenha realizam *pós dipping*. Esse procedimento utilizado consiste na imersão dos tetos em um desinfetante adequado, no caso das propriedades estudadas iodóforo, logo após os conjuntos das ordenhadeiras serem removidas dos animais.

Esses desinfetantes destroem rapidamente as bactérias presentes na superfície do teto por ocasião da ordenha e impedem a colonização do canal do teto, bem como a contaminação de lesões do teto (SILVA et al., 2011).

2.3.4 Resultados Microbiológicos

Foram encaminhadas para o Laboratório de Doenças Bacterianas e Fungicas Animais, 30 amostras coletadas individualmente dos tetos infectados que apresentaram presença de mastite subclínica.

Foram considerados *Staphylococcus spp.* os isolados que apresentaram morfologia típica de cocos Gram positivos, agrupados em cachos e produção de enzima catalase. *Streptococcus spp.*, os de morfologia cocos Gram negativos e catalase negativa. Considerados como pertencentes à família *Enterobacteriaceae* as espécies com morfologia de bacilos Gram negativos e fermentadores. Os resultados da presença de mastite nos quartos mamários assim como a coloração de Gram, podem ser observado na Tabela 2, o crescimento de fungos foi inexistente nas amostras.

Tabela 2 - Relação dos animais e tetos infectados e resultados da Coloração de Gram.

Animais e propriedades	Teto Infectado	Coloração de Gram
2A	AE	Positivo
4A	AD, AE, PD	Positivo
6A	AD,AE, PD	Positivo
7A	PE	Positivo
8A	PD, PE	Positivo
10A	AD, AE, PE	Positivo
11B	AD, AE, PD e PE	Positivo
13B	AD, AE, PD	Negativo (AD) e Positivo (AE e PD)
14B	PE	Positivo
15B	PD, PE	Positivo (PD) e Negativo (PE)
16B	AD, AE, PD, PE	Positivo
17B	PE	Positivo
18B	AD, AE	Positivo

AE – Anterior Esquerdo; AD – Anterior Direito; PE – Posterior Esquerdo; PD – Posterior Direito
 Fonte: As Autoras, 2014

Vangroenweghe et al. (2001) comparou a contaminação de amostras de leite coletadas manualmente, assim como a metodologia adotada pela autora da presente pesquisa, com cuidados de assepsia, comparando com amostras coletadas através de cânula intramamária, que permitiu a coleta estéril do leite. Porém não houve diferença significativa entre a coleta manual e a coleta estéril com respeito à contaminação bacteriana das amostras.

A análise de somente uma amostra de leite não descarta as chances de isolamento do microrganismo presente. Sears (1990) em sua pesquisa mostrou que glândulas mamárias infectadas com *S. aureus* apresentam um padrão cíclico de eliminação da bactéria no leite, em que altos e baixos números se alteram. A probabilidade de uma única amostra permitir o isolamento de *S. aureus* foi de 74,5%. O exame de duas a três amostras consecutivas aumenta essa probabilidade para 94% e 98%, respectivamente.

Para a identificação dos microrganismos presentes nas amostras referentes às infecções os mesmos foram determinados por sua morfologia e provas complementar, onde os resultados podem ser acompanhados na Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente.

Tabela 3 - Relação da morfologia e arranjos dos microrganismos isolados

Animais e propriedades	Teto Infectado	Morfologia	Arranjo
2A	AE	Coco	Estafilococos
4A	AD, AE, PD	Coco	Estreptococos (AD), estafilococos (AE, PD)
6A	AD,AE, PD	Coco	Estreptococos (AD), estafilococos (AE, PD)
7A	PE	Coco	Estafilococos
8A	PD, PE	Coco	Estafilococos
10A	AD, AE, PE	Coco	Estafilococos
11B	AD, AE, PD e PE	Coco	Estafilococos
13B	AD, AE, PD	Bacilo, Coco	Diplobacilo, estafilococos
14B	PE	Coco	Estafilococos
15B	PD, PE	Coco, Bacilo	Estafilococos e diplobacilo
16B	AD, AE, PD, PE	Coco	Estafilococos
17B	PE	Coco	Estafilococos
18B	AD, AE	Coco	Estafilococos

AE – Anterior Esquerdo; AD – Anterior Direito; PE – Posterior Esquerdo; PD – Posterior Direito
 Fonte: As Autoras, 2014

Tabela 4 – Resultados Provas Complementares para Identificação dos microrganismos isolados.

Animais e Propriedades	Tetos Infectados	Catalase	Coagulase	Manitol Salgado	Ágar Bile Esculina
2^a	AE	Positiva	Positiva	Positivo	
4^a	AD, AE, PD	Negativa/Positiva	Negativa	- no AE e PD	+ no AD
6^a	AD,AE, PD	Negativa/Positiva	Positiva	-no AD e + no AE, PD	+ AD
7^a	PE	Positiva	Negativa	Negativo	
8^a	PD, PE	Positiva	Positiva	Positivo	
10^a	AD, AE, PE	Positiva	Negativo	Negativo	
11B	AD, AE, PD e PE	Positiva	Positivo	Positivo nos 4 membros	
13B	AD, AE, PD	Negativa/Positiva	Negativa (AE, PD)	Negativo (AE, PD)	
14B	PE	Positiva	Positiva	Positiva	
15B	PD, PE	Positiva/Negativa	Negativa (PD)	Negativo (PD)	
16B	AD, AE, PD, PE	Positiva	Positivo	Positivo	
17B	PE	Positiva	Negativo	Negativo	
18B	AD, AE	Positiva	Positivo	Positivo	

AE – Anterior Esquerdo; AD – Anterior Direito; PE – Posterior Esquerdo; PD – Posterior Direito
 Fonte: As Autoras, 2014

Como mencionado anteriormente, a mastite é a consequência da infecção intramamária por um ou mais microrganismos de vários gêneros. Observando os resultados obtidos nas análises microbiológicas, 86,6% das amostras apresentaram a presença de *Staphylococcus spp.* De acordo com Andrews et al. (2008), em muitos países, essa bactéria é a principal causa de mastite subclínica, mas também é isolada em casos clínicos.

Após a bateria de testes a fim de identificar os microrganismos responsáveis ou influentes da mastite bovina nos animais estudados, os resultados podem ser acompanhados na Tabela 5. Para a identificação das Enterobactérias, foi realizado uma série bioquímica como Three Sugar Iron (TSI), Citrato, Uréia, Vermelho Metila(V.M) e Voges Proskauer (V.P).

Tabela 5 – Identificação dos microrganismos causadores de mastite isolados a partir do rebanho estudado

Animais Propriedades	Teto Infectado	Microrganismo
2A	AE	<i>Staphylococcus aureus</i>
4A	AD, AE, PD	AD (<i>Streptococcus sp</i>) e no AE e PD (<i>Staphylococcus não-aureus</i>)
6A	AD,AE, PD	AD (<i>Streptococcus sp</i>) e no AE e PD (<i>Staphylococcus não-aureus</i>)
7A	PE	<i>Staphylococcus não-aureus</i>
8A	PD, PE	<i>Staphylococcus aureus</i>
10A	AD, AE, PE	<i>Staphylococcus não-aureus</i>
11B	AD, AE, PD e PE	<i>Staphylococcus aureus</i>
13B	AD, AE, PD	<i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Staphylococcus não-aureus</i> (AE e PD)
14B	PE	<i>Staphylococcus -aureus</i>
15B	PD, PE	PD (<i>staphylococcus não-aureus</i>) e <i>Klebsiella pneumoniae</i>
16B	AD, AE, PD, PE	<i>Staphylococcus aureus</i>
17B	PE	<i>Staphylococcus não-aureus</i>
18B	AD, AE	<i>Staphylococcus- aureus</i>

AE – Anterior Esquerdo; AD – Anterior Direito; PE – Posterior Esquerdo; PD – Posterior Direito
Fonte: As Autoras, 2014

A presença de *Staphylococcus aureus*. nas amostras, pode estar relacionada a ineficiência de processos higiênicos na ordenha. As bactérias presentes em quartos infectados podem ser transferidas para os quartos sadios através de impactos de gotículas de leite geradas pelo deslizamento das teteiras ou por flutuações do vácuo (PHILPOT, 2002), podendo ainda

ser transmitidas no momento da preparação do úbere com as mãos do ordenhador, toalhas de tecido e copos das teteiras (ANDREWS et al., 2008).

No acompanhamento das ordenhas comparado aos resultados microbiológicos, a presença de *Staphylococcus spp.* assim com *Streptococcus spp.*, evidenciam ser resultados da prática de ordenha, onde os animais não recebem uma assepsia adequada antes das ordenhas individuais, o que pode ser observado nas amostras dos tetos AE (Anterior esquerdo) dos animais 2, 4, 6, 10. A propriedade A possui dois conjuntos de ordenhadeiras, onde os animais são ordenhados em duplas, como observado os animais de números pares foram ordenhados nos mesmos conjuntos, portanto há possibilidade de relação entre a desinfecção dos tetos e das teteiras com a presença de mastite no mesmo quarto mamário.

Quanto a *Streptococcus spp.* foi obtido resultado de presença em 6,6% das amostras, podendo esse microrganismo possuir características tanto de contaminação contagiosa quanto ambiental.

Andrews et al. (2008) relata que as fontes de contaminação de *Streptococcus spp.* são semelhantes às de *Staphylococcus spp.*, ou seja os tetos e a glândula mamária. Consequentemente, a higiene no momento da ordenha é um meio efetivo de evitar infecções durante a lactação.

A presença de *Streptococcus spp.* em um rebanho sugere que há problemas nas condições de higiene de ordenha, na desinfecção dos tetos após a ordenha e/ou terapia da vaca seca. Muitas pesquisas apontam que *Streptococcus spp.* pode ser facilmente eliminado pela antibioterapia intramamária, além de desinfecção dos tetos de forma efetiva e rotineira.

Há evidências inequívocas de que os eventos envolvidos nos processos de ordenha influenciam a prevalência de mastite, porém as influências podem estar relacionadas às medidas de higiene praticadas por ocasião da ordenha ou ao efeito da ordenha mecânica propriamente dita.

O produtor/ordenhador, antes e após a ordenha, tem que verificar a temperatura da água para higienização dos equipamentos, assim como conferir a quantidade correta de produto a ser usado na limpeza e sanitização, observar o vencimento dos mesmos, o funcionamento dos equipamentos, como os animais chegam à sala de ordenha (higiene e comportamento) e vários outros itens.

Sendo que um acompanhamento técnico favoreceria verificar as razões da baixa produtividade e prevalência de mastite, sugerindo correções durante a prática de ordenha.

Por falta de assistência técnica e disponibilidade de informações aos produtores, nem sempre são tomadas as medida necessária para evitar a prevalência da mastite, o que acarreta em sérios prejuízos na produção.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

São inúmeros os desafios de adequações nas propriedades estudadas quanto às metodologias de práticas de manejo e ordenha, a fim de aumentar a produtividade, evitando contaminações aos animais e ao leite, que após o beneficiamento estará disponível ao consumo, com o intuito de ofertar um alimento seguro à população.

Os resultados encontrados na pesquisa permitiram compreender que a avaliação individual das práticas de ordenhas adotadas nas propriedades, seguido das informações disponibilizadas pelos produtores no que refere-se aos conhecimentos adquiridos para realização da atividade leiteira, trazem um enfoque à importância de capacitação quanto aos cuidados higiênicos no manejo, ordenha, controle e prevenção de mastite, seguido de acompanhamento técnico para a produção de leite.

As técnicas adotadas pelos produtores para realização da ordenha apresentaram ser os principais efeitos para a prevalência de mastite subclínicas no rebanho estudado, sendo que os microrganismos isolados possuem relação com mastite contagiosa ao invés de ambientais, estreitando assim as relações prática de ordenha e presença de mastite.

Embora com a metodologia de trabalho previamente estabelecida, a realidade encontrada nas duas propriedades onde realizou-se o estudo em Sant'Ana do Livramento se revelou muito mais complexa, no entanto é imprescindível compreender a realidade do pequeno produtor para assim, buscar alternativas que revertam esses resultados, auxiliando-os em busca do desenvolvimento da atividade leiteira, aumentando a produtividade e qualidade do leite.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, J.S.; **Reforma agrária em Santana do Livramento/RS:Técnicas, Território e o Registro Audiovisual.** VIII Congresso Latinoamericano de Sociologia Rural, Porto de Galinhas, 2010.

ALMEIDA, A.C; FONSECA, Y.M.; SOARES, T.M.P. *et al.* **Tratamento de mastite subclínica em bovinos utilizando bioterapia.** Revista da Universidade de Alfenas, 1999.

ALMEIDA, L.A.B.; BRITO, M.A.V.P; *et al.* Tratamento de mastite clínica experimental por meio de ordenhas múltiplas em vacas leiteiras inoculadas com *Staphylococcus aureus*. Arquivos do Instituto biológico, v.72, n.1, 2005.

ALVARES, C.; PAIM, M.P. **Prática de obtenção do leite segundo requisitos exigidos na legislação vigente em propriedades Agro familiares de assentados da Reforma Agrária.** Anais do I Seminário Internacional I Fórum de Educação do Campo: Campo e cidade em busca de caminhos comuns.UFPEL. Pelotas, 2012.

ANDREWS, A.H.; BLOWEY, H.; BOYD, H.; *et al.* **Medicina Bovina: Doenças e Criação de Bovinos.** 2ª Edição. Ed. Roca. São Paulo. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011.**Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006.** Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, p. 8, 14 dez. 2006. Seção I.

BRITO, M.A.V.P. **Diagnóstico Microbiológico da Mastite Bovina.** Embrapa Gado de Leite. 2012.

CORTEZ, M.A.S; CORTEZ, N.M.S. **Qualidade do Leite: Boas Práticas Agropecuárias e Ordenha Higiênica.** Ed. UFF, Niterói. 2008.

COSTA, F.F. **Interferência de Práticas de Manejo na Qualidade Microbiológica do Leite Produzido em Propriedades Rurais Familiares.** Jaboticabal. 2006. Dissertação de Mestrado em Produção Animal, Faculdade de Ciências Agrárias, UEP Julio de Mesquita Filho. 2006.

DALCIN, D.; TROIAN, A. NEUMAN P.S. **A Atividade Leiteira no Contexto da Agricultura Familiar: Um Estudo de Caso.** In: Sober 47º Congresso. Porto Alegre, RS. 2009.

DÜRR, J.W. **Como produzir leite de alta qualidade.** Brasília: SENAR, 2005.

ELMOSLEMANY, A.M.; KEEFE, G.P.; *et al.* **Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part.2.** Journal of Dairy Science.v.92, n.1. 2009.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle da Mastite**. São Paulo. 2000.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. Ed. Manole. São Paulo. 2007.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S.G. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 4ª Edição. Ed.Manole, 2011.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G. C. *et al.* **Qualidade Microbiológica de Leite em Função de Técnicas profiláticas no Manejo de Produção**. Revista Ciência e Agrotecnologia. v.29. 2005.

GUIMARÃES, J.C.; GARCIA, L.O. **Importância dos recursos hídricos em assentamentos com base na agricultura familiar: Estudo de caso do assentamento Rio Claro**. In: EREGEO – Simpósio Regional de Geografia – A Geografia no Centro-Oeste Brasileiro – Passado, Presente e Futuro, 11., 2009, Jataí. *Anais eletrônicos...* Jataí: UFG. Disponível em: <www.eregeo.agbjatai.org/anais/textos/79.pdf> Acesso em: 11 julho, 2014.

HALASA, T; HUIJPS, K. OSTERAS, O. *et al.* **Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review**. Veterinary Quarterly. v. 29, 2007.

KRUTZMANN, A. **Aspectos qualitativos do leite produzido em propriedades rurais do município de Nova Santa Rosa – PR**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA - ZOOTEC, 2008, João Pessoa. *Anais eletrônicos...* João Pessoa: UFPB/ABZ. Disponível em: <http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anaiszootec%20/artigos-cientificos/tecnologia-produtos-origemanimal/5367-Aspectos-qualitativos-leit%20e-produzido-propriedades-rurais-municpio-Nova-Santa-Rosa>. Acesso em: 11 de julho de 2014.

INCRA/RS. **Relatórios ambientais dos Projetos de Assentamento de Santana do Livramento/RS**. Porto Alegre, 2004-2009.

LOPES, L.O.; LACERDA, M.S. *et al.*, **Uso de Antibióticos na Cura e Controle de Mastite Clínica e Subclínica Causada por Principais Microorganismos contagiosos em Bovinos Leiteiros: Revisão de Literatura**. Revista científica Eletrônica de Medicina Veterinária. Ano XI, n.21. 2013.

MASSEI, R.A.; SANTOS, W.R.M., *et al.* **Mastite – Diagnóstico, tratamento e prevenção: Revisão de Literatura**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. v.6, n.10. 2008.

MEDEIROS, R.M.V; MONTEBLANCO, F. *et al.*, **Agricultores assentados: atores sociais reconstruindo seu novo território a partir da interação entre práticas e formas de organização com o ambiente**. In: XXI Encontro Nacional de Geografia Agrária. Uberlândia-MG, 2012.

MENGIERE JUNIOR, R.; SOUTO, L.I.M; *et al.* **Avaliação de tratamento homeopático na mastite bovina subclínica**. Revista Veterinária e Zootecnia, v.14, n.1, 2007.

MILLOGO, V.; SJAUNJA, K.S.; QUÉADRAOGO, G.A.; et al. **Raw milk hygiene at farms, processing units and local markets in Burkina Faso.** *FoodControl*, v. 21, 2010.

MONARDES, H. **Controle Leiteiro e qualidade do leite.** In: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2008.

NÓBREGA, D.B.; LANGONI, H.; et al. **Utilização de composto em homeopático no tratamento da mastite bovina.** *Arq. Inst. Biol.*, v.76, n.4, São Paulo, 2009.

OLIVEIRA, J.P.F; RANGEL, A.H.N.; et al. **Influência do período de lactação sobre a CCS, proteína, gordura e sólidos totais em leite de búfalas.** In: Congresso Nordeste de Produção Animal, 6. Mossoró. 2010.

PATÊS, N.M.S; FIGUEIREDO, M.P. et al. **Aspectos produtivos e sanitários do rebanho leiteiro nas propriedades do sudoeste da Bahia.** *Ver. Bras. Saúde Prod.Anim.*, Salvador, v.13, 2012.

PHILPOT, W.N., NICKERSON, C.S. **Vencendo a Luta Contra a Mastite.** Westfalia, 2002.

SANTOS, J.S.; GRIEBELER, S.A. **Tratamento Homeopático da Mastite Do Gado Leiteiro.** *Cultura Homeopática*. N.14, 2006. Disponível em: <http://www.feg.unesp.br/~ojs/index.php/ijhdr/article/viewFile/151/154> Acesso em: 20 de julho de 2014.

SANTOS, M.V; TOMAZI, T. **Mastite Contagiosa ou Ambiental: Um diagnóstico em nível de rebanho.** *Revista Técnica da Bovinocultura de Leite*. Nº 44 – Ano 6, 2012.

SCHNEIDER, S. **Agricultura Familiar e Desenvolvimento Rural Endógeno: Elementos Teóricos e um Estudo de Caso.** In: *Desenvolvimento Rural – Tendencias e Debates Contemporâneos*. Ed. Unijui, Ijuí. 2006.

SILVA, P.D.L.; PAIVA, A.D.; RANGEL, A.H.N. et al., **Influência das Boas Práticas de Ordenha e da Ordem de Parto sobre a Composição e Contagem de Células Somáticas (CCS) do Leite Bovino.** *Revista Verde*. v.6, n.3. Mossoró, RN. 2011.

SOUZA, F.R.S, **A Homeopatia: uma visão histórica e de saúde pública.** Dissertação. Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2012. Disponível em: <http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3740/1/Monografia%202012.pdf> Acesso em 20 de julho de 2014.

SOUZA, R.P; WAQUIL, P.D. **A viabilidade da Agricultura familiar produtora de leite: o caso do sistema Coorlac (RS).** XLVI Sober. Acre, 2008.

TEIXEIRA, S.R.; RIBEIRO, M.T. **Transporte do leite a granel.** *Instrução técnica*, Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, n. 22, 2006.

TEIXEIRA, R.M.A.; LANA, R.P.; FERNANDE, L.O. et al. **Desempenho produtivo de vacas da raça Gir Leiteira em Confinamento Alimentadas com Níveis de Concentrado e Proteína Bruta nas Dietas.** *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.39, n.11. 2010.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2008.

VANGROENWEGHE, F.; DOSOGNE, H.; MEHRZAD, J. *et al.* **Effect sampling techniques on milk composition, bacterial contamination, viability and functions of resident cell in milk**. *Veterinary Research*. v.32. 2001.

VILELA, D. BRESSAN, M.; FERNANDES, E.N. *et al.*, **O Agronegócio do leite e políticas públicas para o desenvolvimento sustentável**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2002.

ANEXO I – Check list de conformidade e não conformidades

PROPRIEDADE: _____ LOCALIDADE: _____ PROPRIETÁRIO: _____ PRODUÇÃO DE LEITE(Kg/dia): _____ N° de ani mais - _____				
PONTOS DE CONTROLE	SIM	NÃO	ESTADO DE CONSERVAÇÃO	
			Regular	Bom Ótimo
1-INSTALAÇÕES (Currais, Salas de Ordenha/Tanque)				
1.1 Bem localizadas				
1.2 Condições de utilização para a finalidade				
1.3 Curraiss: Condições gerais da área coberta, pisos, paredes.				
1.4 Salas de ordenha: Condições gerais da área coberta, pisos, paredes.				
2 – LIMPEZA DO AMBIENTE				
2.1 Condições de limpeza do curral				
2.2 Condições de limpeza da sala/instalações da ordenha e sala do tanque				
2.3 Frequências de Limpeza e Desinfecção das Instalações Animais – Diária				
2.4 Frequências de Limpeza e Desinfecção dos Locais de Ordenha e Tanque				
2.5 Produtos utilizados na limpeza e desinfecção ambiental				
3 – CONTROLE DE PRAGAS				
3.1 Há presença de pragas?				
3.2 Roedores são pragas mais frequentes				

3.3 Insetos são pragas mais frequentes (presença de moscas)				
3.4 Utiliza agrotóxicos / Inseticida?				
3.5 Na inspeção há vestígios de pragas encontrados				
PONTOS DE CONTROLE	SIM	NÃO	ESTADO DE CONSERVAÇÃO	
			C	N/C
4- AGUA DE ABASTECIMENTO				
4.1 Existem fontes de abastecimento de agua? - POÇO – Fonte de Agua				
4.2 Possui caixa d'água?				
4.3 Condições gerais dos tanques, reservatórios e caixas d'água				
4.4 Utilizam produtos? – CLORO				
4.5 Frequencia de limpeza destas instalações – SEMESTRAL				
5 – RESIDUOS ORGANICOS (ESTERCOS,LIXOS,RESTOS DE RAÇÕES)				
5.1 Destino dos resíduos orgânicos – Fossa Asséptica				
5.2 Há local para destino de resíduo químico?				
6 – EQUIPAMENTOS / UTENSÍLIOS				
6.1 Equipamentos de ordenha, estado de conservação e higiene				
6.1.1 Frequência de higienização				
6.1.2 Produtos utilizados				
6.1.3 Normas de fabricantes seguidas				
6.1.4 Frequencia da ordenha diária – 2 ordenhas (pela manhã e a tarde)				
6.1.5 Tipo de ordenha – MECÂNICA				

6.2 Vasilhames e demais utensílios				
6.2.1 Estado de conservação e higiene dos baldes, tarros e ordenhadeiras				
6.2.2 Tipo de coador e seu estado de conservação				
6.2.3 Armazenamento dos utensílios em local apropriado.				
PONTOS DE CONTROLE	SIM	NÃO	ESTADO DE CONSERVAÇÃO	
			C	N/C
7. ANIMAIS/ CUIDADOS COM A ORDENHA				
7.1 Estado físico e comportamental dos animais				
7.2 Propriedades com acompanhamento Veterinário				
7.3 Vermífugos utilizados				
7.4 Alimentação animal (Ração Comercial/Cevada/Farelos)				
7.5 Processos de higiene utilizados antes e após ordenha (lavagem dos tetos com agua)				
7.6 Produtos utilizados – IODO				
7.7 A propriedade possui histórico de mastite no rebanho?				
7.8 Outras doenças no rebanho				
7.9 Realização Teste Mastite Clinica (caneca fundo preto)				
8 - FUNCIONÁRIOS				
8.1 Uniformizados				
8.2 Hábitos de higiene				
8.3 Funcionários treinados para o exercício da função				