

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA – PPGZOO

LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAÚJO

OVINOCULTURA LEITEIRA: CARACTERIZAÇÃO DE PROPRIEDADES E DA
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE COM FOCO EM *Staphylococcus aureus* E
IMPLICAÇÕES PARA A SAÚDE PÚBLICA

CHAPECÓ

2024

LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAÚJO

**OVINOCULTURA LEITEIRA: CARACTERIZAÇÃO DE PROPRIEDADES E DA
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE COM FOCO EM *Staphylococcus aureus* E
IMPLICAÇÕES PARA A SAÚDE PÚBLICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de mestre em Zootecnia
pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
da Universidade do Estado de Santa Catarina –
UDESC.

Orientadora: Prof. PhD. Lenita de Cássia
Moura Stefani

Coorientadora: Prof. Dra. Denise Nunes Araujo

CHAPECÓ

2024

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Araújo, Luana Caroline Souza Rosa

Ovinocultura leiteira : caracterização de propriedades e da
qualidade microbiológica do leite com foco em *Staphylococcus*
aureus e implicações para a saúde pública / Luana Caroline Souza
Rosa Araújo. -- 2024.

106 p.

Orientadora: Lenita de Cássia Moura Stefani

Coorientadora: Denise Nunes Araújo

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2024.

1. Food safety. 2. Manejo. 3. Ordenha. 4. Qualidade do leite. 5.
Resistência bacteriana. I. Stefani, Lenita de Cássia Moura. II.
Araújo, Denise Nunes. III. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAUJO

**OVINOCULTURA LEITEIRA: CARACTERIZAÇÃO DE PROPRIEDADES E DA
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE COM FOCO EM *Staphylococcus aureus* E
IMPLICAÇÕES PARA A SAÚDE PÚBLICA**


Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de mestre em Zootecnia
pelo Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa
Catarina – UDESC.

Orientadora: Prof. PhD. Lenita de Cássia
Moura Stefani


Coorientadora: Prof. Dra. Denise Nunes Araujo

BANCA EXAMINADORA


Membros:

Documento assinado digitalmente
 **LENITA DE CASSIA MOURA STEFANI**
Data: 05/08/2024 17:03:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Lenita de Cássia Moura Stefani, PhD.
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Documento assinado digitalmente
 **CASSIA REGINA NESPOLO**
Data: 05/08/2024 17:08:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Cássia Regina Nespolo, Dra.
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Documento assinado digitalmente
 **LILIAN KOLLING GIRARDINI**
Data: 07/08/2024 10:45:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Lilian Kolling Girardini, Dra.
Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC

Chapecó, 05 de agosto de 2024.

“Dedico ao Verbo, que antes de ser carne, é
Palavra a me inspirar.”

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por me permitir sonhar e almejar.

Ao meu esposo Alex, pela parceria, incentivo e amor diários.

Aos meus pais, José e Lore, que sempre estiveram ao meu lado apoiando e incentivando na busca do desenvolvimento contínuo ao longo de toda a minha trajetória, desde o jardim de infância.

A Universidade do Estado de Santa Catarina pela oportunidade concedida para a realização do mestrado. Agradeço especialmente à Professora PhD. Lenita de Cássia Moura Stefani, cuja orientação e conhecimento foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa. Sua dedicação e orientação contribuíram significativamente para o enriquecimento deste trabalho.

Expresso também minha gratidão à Dra. Denise Nunes Araujo pela coorientação e à Dra. Cássia Regina Nespolo, pela valiosa colaboração e contribuições enriquecedoras à minha pesquisa. Agradeço, ainda, a todos os professores, equipe do LABMIM especialmente ao Alexandre, Letícia e Quezia, colegas e demais membros das instituições envolvidas, que de alguma forma contribuíram para o êxito desta jornada acadêmica.

Agradeço todas as admiráveis pessoas que atuam ou atuaram no Instituto SENAI de Tecnologia em Alimentos e Bebidas, especialmente Karine Meneghetti, Maicon Zangalli, Emília Almeida, Claudiane Juriatti, Elisa Sonza, Creciana Endres, Rosana da Silva, Ana Paula Biasus, Sthéfani da Cunha, Andressa Casarin e Leandra Formentão pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos e experiências, proporcionando um ambiente de trabalho e pesquisa estimulante e colaborativo.

Este trabalho não teria sido possível sem o apoio inestimável dessas pessoas dedicadas, e por isso este agradecimento se estende a todos que, direta e indiretamente, colaboraram para a sua concretização.

E como diria Snoop Dogg: *"Last but not least, I wanna thank me."*

RESUMO

A ovinocultura leiteira no Brasil tem experimentado uma expansão nos últimos anos, refletindo um aumento tanto na produção quanto na demanda por produtos derivados do leite de ovelha. O manejo de ordenha dos animais destinados à exploração leiteira é um processo crucial, tanto do ponto de vista econômico, quanto para a obtenção de um leite íntegro. Ao adotar as práticas adequadas de higiene e profilaxia é possível minimizar os riscos e obter alimentos seguros e de qualidade. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi caracterizar as propriedades leiteiras nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo, de modo a investigar as práticas de manejo, as percepções, as necessidades e as demandas dos produtores, e determinar as condições higiênico-sanitárias dos rebanhos. Para tal, realizou-se a avaliação da qualidade microbiológica do leite cru, por meio das contagens e detecção de microrganismos, com ênfase no *Staphylococcus aureus*, com a avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos utilizados na sanidade animal: eritromicina (15µg), linezolida (10µg), oxacilina (1µg), penicilina G (10µg), cefoxitina (30µg), gentamicina (10µg), amoxicilina + ácido clavulânico (30µg) e clindamicina (2µg) e também exclusivamente na saúde pública: cloranfenicol (30µg) e vancomicina (30µg) e a expressão dos genes de resistência *mecA* e *vanA* e os genes produtores de enterotoxinas estafilocócicas *sea* e *see*. As amostras de leite foram coletadas em duas propriedades do oeste de Santa Catarina (Lageado Grande (P1) e Chapecó (P2)). Já o questionário foi aplicado para todas as propriedades envolvidas no estudo, de forma presencial ou *on-line*. Nas amostras de leite foram mensurados os valores de pH e a qualidade microbiológica, por meio da detecção de *Salmonella* sp., e *Listeria monocytogenes* e das contagens de *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, contagem bacteriana total, coliformes totais, bolores e leveduras. Nos isolados de *S. aureus* foram avaliados o perfil de resistência frente aos antimicrobianos e a amplificação dos genes associados à resistência e produção de enterotoxinas, através de PCR. Os resultados da aplicação do questionário revelaram as particularidades do setor, destacando diferenças nas práticas adotadas e principalmente nos portes em relação ao efetivo animal, além de oportunidades de melhorias no manejo higiênico-sanitário da ordenha e na adoção de acompanhamento por profissionais zootecnistas ou veterinários. Os produtores mostraram-se cientes das limitações do negócio e dispostos a aprimorar a atividade. Os resultados laboratoriais indicaram que não houve diferença significativa ($p < 0.05$) para os valores de pH, contagem bacteriana total, contagens de *S. aureus*, *B. cereus* e lácticas entre as propriedades, do mesmo modo, em ambas houve ausência de patógenos como *E. coli*, *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*. As contagens de coliformes totais, bolores e leveduras apresentaram diferença

significativa ($p < 0.05$) entre as propriedades, sendo maiores na P1. Observou-se ainda que 60% das amostras de leite apresentaram *S. aureus* e a resistência bacteriana geral encontrada através do teste de disco difusão foi de 83,3%, com 75% para vancomicina, 8,3% para penicilina G e oxacilina, e sem resistência aos demais antimicrobianos. A análise genotípica não detectou a amplificação dos genes de resistência *mecA* e *vanA* ou dos genes produtores de enterotoxinas *sea* e *see*. Assim, é essencial realizar monitoramentos contínuos e investigações detalhadas dos mecanismos genéticos de resistência antimicrobiana, além de desenvolver estratégias eficazes de prevenção e controle focadas na garantia de alimentos seguros e de qualidade.

Palavras-chave: *Food safety*; Manejo; Ordenha; Qualidade do leite; Resistência bacteriana; Sanidade.

ABSTRACT

Sheep milk production in Brazil has expanded in recent years, reflecting increased production and demand for sheep milk products. Managing dairy sheep is crucial both economically and for obtaining high-quality milk. Proper hygiene and prophylactic practices are essential to minimize risks and ensure safe, high-quality food products. In this context, the aim of this study was to characterize dairy farms in the states of Santa Catarina, Rio Grande do Sul, and São Paulo, in order to investigate management practices, perceptions, needs, and demands of producers, as well as to determine the hygienic and sanitary conditions of the herds. For this purpose, the microbiological quality of raw milk was evaluated through microbial counts and detection, with an emphasis on *Staphylococcus aureus*, and the assessment of antimicrobial susceptibility using the following antibiotics: erythromycin (15µg), linezolid (10µg), oxacillin (1µg), penicillin G (10µg), ceftiofur (30µg), gentamicin (10µg), amoxicillin + clavulanic acid (30µg), and clindamycin (2µg), as well as those exclusively related to public health: chloramphenicol (30µg) and vancomycin (30µg), and the expression of the resistance genes *mecA* and *vanA*, as well as the staphylococcal enterotoxin genes *sea* and *see*. Milk samples were collected from two farms in western Santa Catarina, Lageado Grande (P1) and Chapecó (P2), along with the application of a questionnaire. For the other farms, the questionnaire was administered online. In the milk samples, pH values and microbiological quality were measured through the detection of *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, and counts of *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, total bacterial count, total coliforms, molds, and yeasts. The *S. aureus* isolates were evaluated for antimicrobial resistance profiles and the amplification of genes associated with resistance and enterotoxin production through PCR. The results of the questionnaire revealed sector-specific characteristics, highlighting differences in the practices adopted, particularly in terms of herd size, and opportunities for improvements in the hygienic and sanitary management of milking, as well as in the adoption of oversight by animal scientists or veterinarians. Producers were aware of the limitations of their businesses and showed willingness to improve their activities. Laboratory results indicated no significant differences ($p < 0.05$) for pH values, total bacterial count, or counts of *S. aureus*, *B. cereus*, and lactic acid bacteria between the farms. Similarly, there was no presence of pathogens such as *E. coli*, *Salmonella* sp., or *L. monocytogenes* in either farm. However, there was a significant difference ($p < 0.05$) in the total coliforms, molds, and yeasts counts, which were higher in P1. *S. aureus* was detected in 60% of the milk samples. The overall bacterial resistance found through the disk diffusion test was 83.3%. The isolates showed resistance to vancomycin (75.0%),

penicillin G (8.3%), and oxacillin (8.3%), with no resistance detected to the other antimicrobials. Genotypic analysis did not detect the amplification of the *mecA* and *vanA* resistance genes or the *sea* and *see* enterotoxin-producing genes. Thus, it is essential to conduct continuous monitoring and detailed investigations of the genetic mechanisms of antimicrobial resistance, in addition to developing effective prevention and control strategies focused on ensuring safe and quality food.

Keywords: Bacterial resistance; Food safety; Health; Management; Milking; Milk quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Propagação de bactérias resistentes a antibióticos por seleção natural.....	30
Figura 2: Cronologia do desenvolvimento da resistência aos antibióticos em <i>S. aureus</i>	33
Figura 3: Contagem de coliformes totais e termotolerantes	54
Figura 4: Agár MYP para contagem de <i>B. cereus</i>	55
Figura 5: Leitura do perfil de sensibilidade antimicrobiana.....	58
Figura 6: PCR duplex genes <i>mecA</i> e <i>vanA</i>	69
Figura 7: PCR duplex genes <i>sea</i> e <i>see</i>	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização das propriedades	41
Tabela 2: Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados	58
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados no multiplex PCR	60
Tabela 4: Reações duplex	61
Tabela 5: Valores médios e desvio-padrão das análises de pH	62
Tabela 6: Valores médios e desvio-padrão das análises microbiológicas	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCOL	Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Leiteiros
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACCO	Associação Catarinense de Criadores de Ovinos
ALOA	Agar Listeria Ottaviani & Agosti
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
BPW	Buffered Peptone Water
CCS	Contagem de Células Somáticas
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
DILEI	Divisão de Inspeção de Leite e Derivados
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTA	Doença Transmitida por Alimentos
EC	Petrifilm <i>E. coli</i>
EE	Enterotoxina Estafilocócica
ELFA	Enzyme Linked Fluorescent Assay
FADOVINOS	Fundo de Apoio ao Desenvolvimento da Ovinocultura do Estado
FAESC	Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Santa Catarina
g	Força G - Rotação
g	Gramas
ha	Hectares
hVISA	Heterogeneous Vancomycin-intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
IRMA	Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos
ISO	International Organization for Standardization
IST	Instituto SENAI de Tecnologia
LABMIM	Laboratório de Biologia Molecular, Imunologia e Microbiologia
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<i>mecA</i>	Gene de resistência à meticilina

MHA	Muller-Hinton Agar
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
ml	Mililitro
mm	Milimetro
MRS	Man, Rogosa e Sharpe Agar
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
MYP	Manitol Egg Yolk Polymixine
NaCl	Cloreto de Sódio
NBR	Normas Técnicas Brasileiras
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Pares de bases
PBS	Phosphato buffered saline
PC	Parede celular
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial Hidrogeniônico
q.s.p	Quantidade suficiente para
RAM	Resistência antimicrobiana
RVS	Rappaport Vassiliadis
SE	Staphylococcal enterotoxin
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
<i>sea</i>	Enterotoxina estafilocócica A (Staphylococcal Enterotoxin A)
<i>see</i>	Enterotoxina estafilocócica E (Staphylococcal Enterotoxin E)
SENAI	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
SENAR	Serviço Nacional de Aprendizagem Rural
STX	Petrifilm Staph Express
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TSA	Tryptic Soy Agar
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UFC	Unidade Formadora de Colônias
<i>vanA</i>	Gene de resistência à vancomicina
VISA	Vancomycin-intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>

VRSA	Vancomycin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
XLD	Xylose Lysine Desoxycholate
YM	Petrifilm Yest and Mould
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivos gerais.....	16
1.1.2	Objetivos específicos	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	PANORAMA DA OVINOCULTURA DE LEITE NO BRASIL	17
2.1.1	Panorama da ovinocultura de leite em Santa Catarina	18
2.2	LEITE OVINO	20
2.2.1	Qualidade microbiológica do leite ovino.....	21
2.2.1.1	<i>Qualidade microbiológica do leite: impactos na indústria e na saúde pública....</i>	<i>22</i>
2.3	<i>S. aureus</i>	26
2.3.1	Fatores de virulência	27
2.3.2	Enterotoxinas estafilocócicas	28
2.3.3	Resistência aos antibióticos	29
2.3.4	Resistência em <i>S. aureus</i>	32
2.3.4.1	<i>MRSA</i>	34
2.3.4.1.1	Gene <i>mecA</i>	35
2.3.4.2	<i>VRSA</i>	35
2.3.4.2.1	Gene <i>vanA</i>	35
3	ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE LEITE OVINO: CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES E DO MANEJO HIGIÊNICO-SANTÁRIO DA ORDENHA	37
3.1	INTRODUÇÃO	38
3.2	REFERENCIAL TEÓRICO	39
3.3	METODOLOGIA	40
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
3.4.1	Caracterização das propriedades	40
3.4.2	Rebanhos	42
3.4.3	Manejo nutricional	43
3.4.4	Manejo sanitário	44
3.4.5	Manejo de ordenha	45
3.4.6	Leite.....	46
3.4.7	Oportunidades de melhoria na atividade	47

3.5	CONCLUSÃO.....	48
4	ARTIGO 2: QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE OVINO: AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	50
4.1	INTRODUÇÃO.....	51
4.1.1	Coleta de leite	52
4.1.2	Análises de pH.....	52
4.1.3	Análises microbiológicas	52
4.1.4	<i>S. aureus</i> em leite ovino	56
4.1.4.1	Coloração de Gram.....	56
4.1.4.2	Teste de catalase.....	56
4.1.4.3	Teste de coagulase.....	57
4.1.4.4	Perfil de sensibilidade antimicrobiana.....	57
4.1.4.5	Extração de DNA do SA	59
4.1.4.5.1	Primers utilizados na detecção dos genes codificadores.....	60
4.1.4.5.2	Preparo de solução dos <i>primers</i>	60
4.1.4.5.3	Reação de PCR.....	60
4.1.4.6	Visualização dos produtos amplificados	61
4.1.5	Análise estatística.....	61
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.2.1	Análises laboratoriais	62
4.2.1.1	Análise de pH.....	62
4.2.1.2	Análises microbiológicas.....	63
4.2.2	Isolamento de <i>S. aureus</i> em leite ovino	65
4.2.2.1	Coagulase	66
4.2.2.2	Teste de disco-difusão.....	66
4.2.3	Detecção molecular de genes de resistência.....	68
4.2.4	Detecção molecular de genes produtores de enterotoxinas.....	70
4.3	CONCLUSÃO	71
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXO A – COMPROVANTE DO CEUA	96
	ANEXO B – COMPROVANTE DO CEP.....	97
	ANEXO C – QUESTIONÁRIO – ARTIGO 1	105

1 INTRODUÇÃO

A qualidade microbiológica do leite ovino no Brasil apresenta um cenário complexo e multiforme refletindo não apenas a potencialidade expressiva da ovinocultura no país, mas também desafios significativos. O rebanho brasileiro de ovinos tem crescido de maneira consistente, especialmente na região Sul, considerada favorável para a produção de ovinos leiteiros devido às condições climáticas (Bianchi, 2017). No entanto, apesar do potencial econômico reconhecido, a produção de derivados lácteos provenientes do leite ovino ainda não atingiu plenamente uma expressão comercial significativa (Bianchi, 2018).

Ainda que o leite de ovelha seja reconhecido por suas propriedades nutricionais diferenciadas e pelo seu potencial para a fabricação de queijos de alta qualidade, a sua utilização em larga escala para o consumo humano é limitada em algumas regiões do país. A falta de especialização e tecnificação na produção é apontada como um dos fatores que impedem a plena exploração desse nicho de mercado (Bianchi, 2018). Além disso, a variabilidade nos sistemas de produção, a ausência de protocolos padronizados em criação de pequena escala aumenta o risco de contaminação, trazendo desafios significativos na garantia da qualidade microbiológica do produto.

A presença de microrganismos patogênicos e deteriorantes é uma preocupação central, uma vez que a contaminação bacteriana do leite pode ocorrer tanto de forma endógena quanto exógena (Fusco *et al.*, 2020). A higiene no manejo de ordenha e o controle das condições sanitárias são fatores cruciais que influenciam diretamente a qualidade do leite (Azara *et al.*, 2023). A presença de patógenos como *Staphylococcus aureus*, representa uma preocupação significativa para a indústria láctea e a saúde pública, dada a sua capacidade de produzir toxinas. Este microrganismo é reconhecido como um agente patogênico oportunista que pode causar uma variedade de doenças em animais e humanos, incluindo intoxicações alimentares e infecções graves (Lv *et al.*, 2021). A resistência antimicrobiana do *S. aureus* representa um desafio adicional, com implicações diretas na eficácia do tratamento e no controle de infecções. Neste contexto, torna-se imperativo investigar as medidas profiláticas adotadas no manejo dos animais, bem como a qualidade microbiológica do leite.

Ademais, é crucial realizar uma análise aprofundada das cepas isoladas, avaliando suas expressões fenotípicas e genotípicas. Essa abordagem permite a compreensão da natureza e da extensão da resistência microbiana, essencial para o desenvolvimento de

estratégias de prevenção e controle, visando garantir a segurança dos alimentos e a proteção da saúde pública.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos gerais

Uma análise integrada que aborde tanto a caracterização das propriedades produtoras de leite ovino com ênfase na qualidade microbiológica do produto, de modo a compreender os diversos aspectos relacionados aos sistemas de produção, incluindo práticas de manejo, condições sanitárias e fatores ambientais que influenciam a microbiota presente no leite. Além de identificar potenciais riscos à saúde pública associados à presença de microrganismos patogênicos e deteriorantes.

1.1.2 Objetivos específicos

- a. Avaliar comparativamente, as características gerais e os manejos adotados nas propriedades estudadas;
- b. Verificar a ocorrência de *Salmonella* sp., *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli*, coliformes totais e outras bactérias em amostras de leite cru oriundas de propriedades produtoras de ovinos;
- c. Verificar a ocorrência da bactéria *S. aureus* em amostras de leite oriundas de propriedades produtoras de ovinos;
- d. Verificar a ocorrência fenotípica de resistência nas cepas de *S. aureus* entre as classes de antimicrobianos;
- e. Verificar genotipicamente os isolados de *S. aureus* que apresentaram resistência ou capacidade de resistência aos antimicrobianos pela presença dos genes *mecA* e *vanA* e produção de enterotoxinas pela presença dos genes *sea* e *see*.
- f. Elaborar uma bacterioteca de cepas de *S. aureus* de origem ovina para estudos futuros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PANORAMA DA OVINOCULTURA DE LEITE NO BRASIL

De acordo com os dados da Produção da Pecuária Municipal do ano de 2021, o Brasil conta com mais de 20 milhões de cabeças de ovinos (IBGE, 2022). No decorrer do tempo, a criação de ovinos desenvolveu-se de forma gradativa e pontual no território brasileiro, onde a região sul foi protagonista (Guimarães; Souza, 2014). Contudo, na atualidade o Sul do Brasil é a segunda região em número de cabeças (IBGE, 2017) e as condições climáticas favorecem a produção e adaptação dos ovinos leiteiros e consequentemente, sua produtividade de modo a apresentar elevado potencial econômico para o setor (Munieweg *et al.*, 2017). Todavia, apesar das condições favoráveis, a atividade leiteira ainda não apresenta expressão econômica, já que a potencialidade de comercialização e consumo principalmente dos derivados lácteos ainda é pouco explorada (Bianchi, 2018).

Segundo Escopelli *et al.* (2016), na Europa e Oriente Médio, o consumo de leite de ovelha e seus derivados ocorre há aproximadamente 2000 anos, mas no Brasil até então é considerada incipiente. O leite de ovelha é apontado como o melhor de todos os leites utilizados em laticínios, fator esse influenciado pela sua composição físico-química, uma vez que tem maior quantidade de sólidos totais quando comparado ao leite de vaca por exemplo, o que eleva o rendimento na fabricação de derivados como o queijo (Ribeiro *et al.*, 2007). Ainda que esse produto alimentício possua características nutricionais diferenciadas e com elevado potencial de consumo, em algumas regiões do país, grande parte desse leite não é destinado ao consumo humano, sendo utilizado principalmente para alimentação de suas crias e de outros animais, em função da baixa especialidade e tecnificação da produção (Lucena; Guimarães, 2018). Brom *et al.* (2020) evidenciam que em sistemas de produção de leite de ovelha e derivados em pequena escala, há um risco maior em relação à produção industrializada devido ao processo produtivo parcialmente protocolado e controlado, quando comparado a produção industrializada.

Embora haja heterogeneidade entre os sistemas na produção de leite ovino no Brasil, dados mostram que alguns são extremamente eficientes na produção e nos indicadores econômicos, expressando grande potencial no país (Bianchi, 2018). Sendo assim, o potencial para o mercado de lácteos funcionais, com funções probióticas e que

detenha alto valor agregado, merece destaque já que possui capacidade de substituir produtos lácteos de origem bovina, visto que esse produto derivado de ovinos é uma alternativa alimentar para pessoas com alergias ou rejeição ao leite de vaca (Lucena; Guimarães, 2018). O leite de ovelha é utilizado principalmente na produção de queijos finos e iogurtes que encontraram um mercado receptivo que ganhou espaço em nichos especiais de lácteos (Morais, 2013).

De acordo com Guimarães e Souza (2014), tendo em vista a capacidade para a geração de renda tanto para produtores quanto para os demais elos da cadeia produtiva, deve-se considerar o desenvolvimento da ovinocultura de leite uma estratégia para o desenvolvimento rural. Bianchi (2018) afirma que alguns entraves precisam ser vencidos, tais como a implementação de programas de melhoramento genético que visem maior produção de leite por ovelha; estudos sobre possíveis polos estratégicos para a produção; campanhas de promoção do leite e dos produtos enfatizando a qualidade nutricional; melhor organização do setor; gestão eficiente dos recursos envolvidos na produção e estudos sobre normativas específicas que atendam tecnicamente a produção do leite e dos derivados. Em se tratando deste último ponto, recentemente a ABCOL (Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Leiteiros) apresentou uma proposta sobre a criação de um regulamento técnico específico referente à identidade e a qualidade do leite ovino, devido as diferenças de características físico-químicas e biológicas deste em relação ao leite das espécies bovina e caprina (Nóbrega, 2023). Aliado a isso, para que haja um crescimento efetivo deste nicho de mercado é necessário a contabilização de dados estatísticos sobre a produção. Como destaca Farias (2020), no Brasil grande parte dos produtores se caracteriza como pequenos agricultores, que utilizam o produto para consumo ou venda direta aos consumidores, impossibilitando contabilizar esses valores a dados estatísticos reais. Para que o setor produtivo se expanda, uma das medidas a ser adotada é avaliar a qualidade do leite que está sendo produzido.

2.1.1 Panorama da ovinocultura de leite em Santa Catarina

Conforme as estatísticas fornecidas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) referentes ao ano de 2022, destaca-se a presença substancial de ovinos no estado de Santa Catarina, totalizando aproximadamente 350 mil cabeças, sendo que o

município de Água Doce, situado na região do meio-oeste catarinense, apresenta-se como detentor do maior rebanho (IBGE, 2022).

De modo a impulsionar efetivamente essa atividade no estado a Federação da Agricultura e Pecuária do Estado de Santa Catarina (FAESC) e a Associação dos Criadores de Ovinos do Estado de Santa Catarina (ACCO), com o apoio do Sebrae/SC, apresentaram ao governo do estado o Plano de Desenvolvimento da Ovinocultura Catarinense. O objetivo principal é atingir a autossuficiência por meio da profissionalização dos agentes da cadeia produtiva, visando alcançar a produção de 1 milhão de animais/ano com faturamento em torno de 500 milhões de reais/ano. O plano contempla a criação do Fundo de Apoio ao Desenvolvimento da Ovinocultura do Estado (FADOVINOS), vinculado à Secretaria da Agricultura, Pesca e Desenvolvimento Rural, destinado a custear ações, projetos e programas para o desenvolvimento da ovinocultura em Santa Catarina.

A legislação específica para o setor é considerada essencial, abrangendo assistência técnica, aumento da oferta de animais e produtos, estabelecimento de padrão genético, combate a doenças, pesquisa, *marketing* e imagem do produto catarinense. A FAESC destaca a criação de ovinos como beneficiadora de aspectos socioeconômicos, como a redução do êxodo rural e a oferta de matéria-prima para produtos artesanais. O plano visa também a ampliação da capacidade produtiva no campo, a oferta de alternativas estruturadas para os produtores catarinenses, a qualificação da disponibilidade de produtos no mercado e o fortalecimento das organizações de produtores e agroindústrias da cadeia da ovinocultura.

O setor de ovinocultura de leite, atualmente incipiente, destaca-se no plano com a formação de bacias leiteiras próximas aos laticínios, estímulo à produção de queijos artesanais e autorais, bem como ao mercado de leite em pó, visando um crescimento organizado e viável no longo prazo. A capacitação de técnicos especializados, adoção de rastreabilidade e incentivo a projetos de pesquisa e extensão completam as ações previstas no plano (SENAR, 2022).

2.2 LEITE OVINO

De acordo com Wendorff e Haenlein (2017) o leite de ovelha geralmente apresenta níveis elevados de sólidos, gordura, proteína, lactose e minerais em comparação com o leite de vaca. A composição bruta do leite de ovelha varia de acordo com a estação e o estágio da lactação, com níveis aumentados de gordura, proteína, sólidos e minerais observados no final da lactação. Ademais, o leite de ovelha apresenta níveis maiores de caseína como proporção de proteína verdadeira e uma maior relação caseína/gordura em contraste com o leite de vaca. As propriedades físicas do leite de ovelha, incluindo maior gravidade específica, viscosidade, índice de refração, acidez titulável e menor ponto de congelamento, diferem das do leite de vaca. Essas disparidades nas propriedades físicas exercem um impacto na produção de queijo, abrangendo o tempo de coagulação, a firmeza e as características da coalhada. Além disso, os lipídios também exibem atributos físicos aprimorados quando comparados aos do leite de vaca.

A Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Leiteiros (ABCOL), em colaboração com órgãos governamentais pertinentes, tem dedicado esforços significativos para promover o desenvolvimento e a regulamentação do setor de produção de leite ovino no Brasil (ABCOL, 2019). No entanto, até o momento presente, constata-se a ausência de uma legislação específica que aborde de maneira adequada este segmento em território nacional (Endres, 2022).

Para a avaliação da qualidade do leite ovino, é fundamental seguir os requisitos estabelecidos pelas Instruções Normativas 76/2018 e 77/2018 (Brasil, 2018), as quais aprovam o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado e Critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial, respectivamente. No entanto, é importante ressaltar que há uma legislação específica para o Leite de Cabra, a Instrução Normativa nº 37/2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), entretanto os produtos derivados do leite de ovelha são registrados pela Divisão de Inspeção de Leite e Derivados (DILEI) do MAPA, com base em literatura científica e outras publicações relevantes já que inexistente um Regulamento Técnico específico para produtos derivados do leite ovino (Merlin Junior *et al.*, 2015).

De acordo com Endres (2022) para uma compreensão abrangente das características e qualidade do leite e dos produtos derivados e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de legislações específicas, faz-se necessário investigar a composição microbiológica presente no leite ovino, pois a microbiota presente nos alimentos desempenha um papel fundamental na determinação de suas propriedades e características, além de influenciar diretamente a segurança e o bem-estar do consumidor.

2.2.1 Qualidade microbiológica do leite ovino

De acordo com Martin; Evanowski; Wiedmann (2023) o termo "alta qualidade", do ponto de vista microbiológico, é frequentemente empregado para se referir ao leite cru com baixas contagens totais de bactérias; no entanto, o termo também pode ser utilizado para descrever o leite cru com níveis reduzidos de determinados grupos de bactérias como os coliformes.

A complexa estrutura bioquímica dos constituintes do leite, aliado com a alta capacidade hídrica, tornam esse produto um excelente substrato para a multiplicação de microrganismos, sendo que a contaminação bacteriana do leite pode ocorrer por duas vias: a endógena e a exógena (Menezes *et al.*, 2014). Os elevados teores de sólidos, gorduras, proteínas e minerais presentes no leite de ovelha, em comparação com o leite de vaca, podem criar um ambiente propício para o desenvolvimento de determinados microrganismos (Wendorff e Haenlein, 2017).

O leite ovino exibe uma concentração superior de ácidos graxos poli-insaturados essenciais, suscetíveis à oxidação e à deterioração microbiana. Tal característica, por conseguinte, pode impactar a estabilidade e a qualidade microbiológica do produto. Do mesmo modo, aspectos físicos distintivos do leite de ovelha, como maior viscosidade e acidez titulável, exercem influência sobre o crescimento e a atividade de microrganismos específicos. Diferenças no teor mineral, especialmente os níveis superiores de cálcio e fósforo no leite de ovelha, têm o potencial de influenciar significativamente o crescimento e a sobrevivência de bactérias específicas, conferindo características únicas a esse substrato lácteo (Wendorff e Haenlein, 2017).

Dessa maneira, a qualidade do leite é influenciada pelos seus aspectos de composição singular e condições de higiene do manejo de ordenha. Como observado por

Endres *et al.* (2021) ao caracterizarem comunidades microbianas do leite cru de ovelhas da raça Lacaune na região Sul do Brasil, constataram variações nas populações bacterianas entre as propriedades avaliadas, sugerindo assim que a microbiota do leite pode ser influenciada por fatores como alimentação animal, doenças da glândula mamária ou práticas de ordenha.

Com relação aos aspectos de higiene, alguns requisitos são fundamentais para garantir a segurança do leite, entre os quais pode-se citar as baixas contagens bacterianas e de células somáticas, a ausência de microrganismos patogênicos e de toxinas bacterianas (Souza *et al.*, 2014). Microrganismos contaminantes podem causar deterioração de modo a comprometer a inocuidade do produto (Ferreira, 2021). Surge então a necessidade de avaliar a microbiota quanto à presença desses microrganismos deteriorantes e patogênicos. No Brasil os parâmetros de qualidade avaliados em leite estão vinculados as exigências da legislação vigente (Brasil, 2018).

A microbiota patogênica pode estar presente em decorrência da mastite que indica problemas de sanidade do rebanho, ou ainda por contaminação cruzada pós ordenha, como mostra o estudo de rotas de contaminação utilizada pela comunidade de leveduras, publicado por Quintana *et al.* (2020), onde o leite de ovelha foi afetado pelas práticas de manejo. Estes autores encontraram relações entre a presença de leveduras no tanque de leite e no ambiente da fazenda, e observaram genótipos comuns em diferentes áreas como leite, ração, ar e superfícies das instalações da sala de ordenha e do alojamento das ovelhas. Em se tratando de infecções intramamárias, Majunder *et al.* (2021) conduziram uma investigação em vacas acometidas por *E. coli* e afirmaram que, em contraste com outros patógenos, tais mastites raramente demandam intervenções antibióticas, porém acarretam possibilidade de infecções persistentes. Adicionalmente, os autores destacaram que as cepas de *E. coli* residentes em ambientes de exploração leiteira apresentam atributos virulentos e resistência à antimicrobianos, trazendo implicações para a saúde pública, dadas as perspectivas de transmissão por meio do leite e disseminação de resistência antimicrobiana em direção a outras espécies bacterianas patogênicas.

2.2.1.1 *Qualidade microbiológica do leite: impactos na indústria e na saúde pública*

A qualidade microbiológica do leite abrange dois domínios essenciais: a qualidade no contexto industrial e os potenciais riscos à saúde pública. Esta qualidade está

intrinsecamente ligada à sanidade dos animais e às práticas de manejo implementadas na propriedade (Tronco, 2008).

As características das bactérias presentes no leite devem ser analisadas sob diferentes perspectivas: deteriorantes, patogênicas, indicadoras e benéficas. As bactérias deteriorantes metabolizam a lactose, resultando na produção de ácido lático, o que causa a diminuição do pH (Ordóñez, 2005). Assim, o pH é um indicador crítico da qualidade do leite. Tais bactérias provocam transformações indesejáveis na indústria, como alterações de cor e sabor, coagulação e estabilidade das proteínas (Carvalho, 2010).

Quanto à presença de microrganismos benéficos, as bactérias ácido-láticas (BAL) presentes no leite de ovelha desempenham funções que vão além da fermentação e conservação, contribuindo para a qualidade nutricional e a segurança dos produtos lácteos derivados. BALs como *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc lactis* são utilizadas na produção de derivados como queijos e iogurtes, devido à sua capacidade de fermentar lactose, produzindo ácido lático que auxilia na coagulação do leite e na formação de sabores e texturas desejáveis (Gotteland *et al.*, 2014). Além disso, segundo Guan *et al.* (2017) a presença dessas bactérias no leite pode inibir o crescimento de patógenos por meio da produção de bacteriocinas, melhorando a segurança microbiológica dos produtos. Estudos demonstraram que cepas de *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc lactis* isoladas do leite ovino possuem características probióticas promissoras, incluindo alta sobrevivência em condições adversas como baixo pH e presença de sais biliares, além de atividade antimicrobiana (Eer *et al.*, 2020). Estas propriedades tornam o leite de ovelha uma fonte rica para a exploração de probióticos naturais.

Grace, Wu e Havelaar (2020) buscaram na literatura as doenças transmitidas por alimentos (DTA) que podem ser causadas pelo consumo de leite e produtos lácteos em países subdesenvolvidos ao redor do mundo, e concluíram que tais DTAs são um importante problema de saúde pública e correspondem a elevadas perdas econômicas nos países em desenvolvimento. Ademais destacam que estudos históricos e investigações de surtos sugerem que entre 14 e 25% de todos os casos de DTA identificados possuem relação com os laticínios. Campos, Silva e Vásquez (2023) encontraram *S. aureus*, *E. coli* e *Klebsiella* sp. em amostras coletadas em resfriadores a granel de leite bovino na Colômbia e então os autores destacaram a importância de identificar os fatores de risco presentes em países de clima tropical, bem como o tipo de sistema de ordenha adotado, tamanho do rebanho, além da rotatividade de ordenhador.

Em um estudo europeu Albenzio *et al.* (2023) relatam que na indústria de laticínios, a contagem de células somáticas é considerada o principal parâmetro indicativo de sanidade do rebanho; no entanto, faltam indicações legais sobre a contagem de células para espécies leiteiras que não sejam bovinos. Assim sendo, mais pesquisas devem ser conduzidas para aprofundar conhecimentos relevantes para um índice confiável no leite, que será capaz de garantir a qualidade e segurança do leite ovino e dos produtos lácteos. Em uma investigação realizada por Munieweg *et al.* (2017) constatou-se que a maior parte das amostras apresentaram contagem padrão em placas acima do máximo permitido pela legislação vigente, além de contagens elevadas para psicotrópicos, coliformes totais e *Staphylococcus* sp., o que salienta problemas vinculados à falhas de manejo e à saúde do rebanho, às condições sanitárias da ordenha e ao armazenamento refrigerado. Fotou *et al.* (2011) analisaram duzentas e quarenta (240) amostras de leite cru de ovelha, e detectaram a presença de microrganismos potencialmente perigosos (*S. aureus*, *Salmonella* sp., *E. coli*, *C. perfringens* e *Bacillus* sp.), e com base nisso os autores salientam o risco de produzir derivados lácteos a partir do leite cru.

Na Europa, Regecová *et al.* (2021) confirmaram a presença de cepas de *S. chromogenes* resistentes e multirresistente ao antibiótico metilina em leite de ovelha e queijos produzidos com leite de ovelha não pasteurizado. Souza *et al.* (2023) forneceram o primeiro relato de enterococos resistentes em leite cru de ovelha e queijos do Sul do Brasil, evidenciando assim um problema de saúde pública na interface homem-animal-ambiente, o que corrobora com uma revisão sistemática conduzida por Herawati *et al.* (2023), que avaliou o perfil de bactérias resistentes isoladas de ovelhas e cabras em 17 países em todo o mundo. Foi constatado que a grande maioria dos isolados bacterianos manifestou resistência a antibióticos amplamente empregados na produção animal. É importante ressaltar que muitos desses antimicrobianos são categorizados como de alta importância para a saúde humana. Esse achado, portanto, intensifica a relevância da resistência antimicrobiana em pequenos ruminantes, emergindo como uma preocupação de magnitude global.

Brom *et al.* (2020) afirmam que o risco de infecções transmitidas pelo leite diminuiu após a industrialização, devido ao processamento térmico, padronização dos processos produtivos, boa fabricação e práticas de higiene ao longo da cadeia de abastecimento, entretanto, enquanto os microrganismos estão presentes no leite cru, o consumo de laticínios que não passaram por processos térmicos são uma preocupação de

saúde pública. O monitoramento da higiene em fazendas leiteiras de ovinos e a erradicação de doenças são medidas gerais de prevenção para a obtenção um leite inócuo, no entanto, se tal leite é para transformação em queijos de leite cru, medidas preventivas rigorosas são necessárias durante o processamento, como esterilização regular de equipamentos de laticínios, monitoramento e rigorosa higiene dos operadores (Gonzales-Barron *et al.*, 2017). O estudo realizado por Evanowski *et al.* (2020) mostrou que o treinamento de funcionários sobre técnicas de higiene adotadas nas atividades da sala de ordenha, levou a uma redução na presença de bactérias formadoras de esporos como o *Bacillus* sp. em leite cru. De modo semelhante, Goksoy *et al.* (2021) compararam as análises microbiológicas do leite cru, antes e após treinamentos de boas práticas na ordenha. Os autores concluíram que as contagens microbiológicas e contagem de células somáticas (CCS) após o treinamento apresentaram melhores resultados quando comparadas as realizadas antes da capacitação dos trabalhadores. Deste modo, melhorar as práticas de higiene na ordenha, assim como fornecer conhecimento aos trabalhadores envolvidos na atividade são cruciais para obtenção de um leite ovino saudável. A obtenção de um leite de melhor qualidade favorece um maior rendimento industrial juntamente com um maior *shelf life* para os produtos e uma maior oferta de alimentos seguros, do ponto de vista nutricional e sanitário, aos consumidores (Souza *et al.*, 2014).

Considerando a saúde pública, a abordagem *One Health* é um paradigma interdisciplinar que realiza uma interconexão entre a saúde humana, animal e ambiental, reconhecendo que cada uma dessas esferas está intrinsecamente ligada. Pesquisas enfatizam a necessidade de colaboração entre profissionais de saúde humana, veterinários, zootecnistas e ambientalistas para lidar com desafios emergentes de saúde, como a propagação de doenças zoonóticas e a resistência antimicrobiana. Essa abordagem destaca a importância de uma resposta coordenada e integrada para garantir a saúde global de maneira sustentável e eficaz.

Em se tratando da produção de lácteos, Garcia, Osburnb, Cullora (2019) afirmam que o conceito *One Health* aplicado aborda questões pertinentes por meio da implementação eficaz de sistemas de gestão em fazendas, a utilização criteriosa de agentes antimicrobianos e a consideração abrangente do sistema completo de produção leiteira. Tais técnicas gerenciais reiteram que os produtores de lácteos forneceram um leite seguro, nutricionalmente rico que resulta em benefícios para a saúde. Rahbarnia *et al.* (2023) procederam à coleta de *swabs* nasais de indivíduos saudáveis, bem como

amostras de queijo e de ovelhas com mastite, realizando uma comparação entre os resultados obtidos nos três grupos. Os autores concluíram que a elevada incidência de fatores de virulência nos isolados de *S. aureus* oriundos de mastite e produtos lácteos é um indicativo de alerta, uma vez que tais cepas podem representar uma fonte de disseminação do *S. aureus* para os seres humanos. Entretanto, o caminho inverso também deve ser considerado, já que o homem pode atuar como um vetor de disseminação de patógenos na cadeia produtiva. Durante a manipulação de alimentos ou o contato direto com os animais, indivíduos colonizados ou infectados por microrganismos podem transferi-los para o ambiente de produção.

Vasileiou *et al.* (2019) concluíram que a presença de material genético de bactérias resistentes a agentes antimicrobianos em produtos lácteos, adiciona outra preocupação com a saúde pública, pois o leite pasteurizado anteriormente era considerado de baixo risco para a transferência de genes de resistência, contudo novos achados indicam uma rota adicional para a disseminação desses genes. Isso ocorre porque nem todas as bactérias são igualmente suscetíveis ao calor, e algumas, podem resistir e carregar genes de resistência. Esses genes podem ser transferidos para outras bactérias no intestino humano após o consumo de produtos pasteurizados. Além disso, a pasteurização pode não inativar completamente todo o material genético bacteriano, permitindo que a transferência horizontal de genes ocorra no trato gastrointestinal. No entanto, ainda há lacunas de pesquisa sobre as taxas de sobrevivência específicas desses genes, indicando a necessidade de estudos adicionais para entender melhor as implicações (Albenzio *et al.* 2012). Tais achados destacam a necessidade do monitoramento contínuo da abordagem no contexto de *One Health* de modo a mitigar os riscos envolvidos na resistência bacteriana e minimizar as preocupações com a saúde pública.

2.3 *S. aureus*

O gênero taxonômico *Staphylococcus* abriga uma diversidade composta por 85 espécies e 30 subespécies, todas pertencentes à família *Staphylococcaceae* (Kovarovic *et al.*, 2022). No homem são habitantes usuais da pele, das membranas mucosas e dos tratos respiratório e digestivo (Germano e Germano, 2001). Dentro deste grupo, *S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva, apresentando morfologia de coco, frequentemente organizada em

aglomerados irregulares que se assemelham a cachos de uva, distribuindo-se em múltiplos planos. Estes microrganismos são anaeróbios facultativos, não possuem flagelos e são imóveis, além de não produzirem esporos (Gherardi, 2023). *S. aureus* é a mais resistente das bactérias patogênicas não formadora de esporos (Germano e Germano, 2001), e a espécie mais patogênica do gênero, com a capacidade de desenvolver uma variedade de fatores de virulência (Koneman *et al.*, 2012). Vale ressaltar que, de acordo com Amaral *et al.* (2021), no Brasil, no período de 2015 a 2019 o *S. aureus* foi classificado como o terceiro microrganismo mais associado a doenças transmitidas por alimentos (DTA).

Os animais, especialmente os de produção, têm o potencial de abrigar estirpes estafilocócicas de origem humana, como evidenciado em bovinos, nos quais as mastites estafilocócicas são frequentemente atribuídas a cepas humanas, transmitidas durante o processo de ordenha (Germano e Germano, 2001). A contaminação por *S. aureus* está relacionada com as deficiências da cadeia leiteira, compreendendo desde o manejo e higiene durante a ordenha até problemas sanitários como a mastite, além da falta de mão-de-obra treinada para a execução do processo (Belotti *et al.*, 2011). Além disso, tais bactérias podem ter acesso ao leite ainda no ambiente intramamário, tendo em vista que algumas espécies, entre delas o *S. aureus* são agentes etiológicos da mastite clínica e subclínica (Bandeira *et al.*, 2013).

2.3.1 Fatores de virulência

Determinadas espécies de *Staphylococcus* sp. são produtoras de algumas enzimas como fatores de virulência, entre estas enzimas, destacam-se a catalase e a coagulase. A catalase atua inativando o peróxido de hidrogênio e radicais livres tóxicos formados pelo sistema mieloperoxidase no interior das células fagocitárias e é utilizada para diferenciar *Staphylococcus* sp. de *Streptococcus* sp, no diagnóstico laboratorial.

Já a presença da enzima coagulase desempenha um papel fundamental na diferenciação dos estafilococos em dois grupos: estafilococos coagulase-positiva e estafilococos coagulase-negativa. Os estafilococos coagulase-positiva são caracterizados pela produção da enzima coagulase livre, que tem a capacidade de coagular o plasma sanguíneo, sendo este um importante marcador de virulência. Neste grupo, a espécie *S. aureus* é reconhecida como a principal representante. Por outro lado, os estafilococos coagulase-negativa são geralmente considerados não patogênicos e em raras vezes estes

estão associados à produção de enterotoxinas estafilocócicas (Feitosa *et al.* 2017; Gharib *et al.*, 2013; Vernozy-Rozand *et al.* 1996).

S. aureus apresenta a habilidade intrínseca de gerar uma diversidade de fatores de virulência, entendidos como moléculas ou estruturas que capacitam a bactéria a induzir patologias no hospedeiro (Markey *et al.*, 2013). A ampla gama de fatores de virulência produzidos correlaciona-se com a sua capacidade de adaptação a diferentes hospedeiros e à capacidade de colonizar distintas regiões do organismo hospedeiro (Quinn *et al.*, 2007). Essa flexibilidade adaptativa constitui um dos pilares para o sucesso patogênico do *S. aureus*, permitindo-lhe instigar uma variada casuística de infecções em animais domésticos (Marques *et al.*, 2013).

2.3.2 Enterotoxinas estafilocócicas

Enterotoxinas estafilocócicas (SE do inglês, *staphylococcal* enterotoxin) são proteínas extracelulares de baixo peso molecular hidrossolúveis e resistentes à ação das enzimas proteolíticas do sistema gastrointestinal, mantendo-se ativas após a ingestão. Possuem capacidade de resistir a tratamento térmicos, como a pasteurização devido a sua termoestabilidade (Senger e Bizani, 2011).

SE são produzidas por algumas cepas de *S. aureus* e causam uma das DTA mais comuns, a intoxicação alimentar estafilocócica, que é resultante do consumo de alimentos ou bebidas contendo a dose infectante de uma ou mais SE pré-formadas (Bastos, 2013). Após a ingestão, as toxinas produzidas por cepas de *S. aureus* podem causar uma série de sintomas gastrointestinais (Abolghait *et al.*, 2020; Le Loir e Hennekinne, 2014). Quando ingeridas em quantidades suficiente, o início dos sintomas da intoxicação estafilocócica geralmente é rápido, evoluindo de uma a sete horas, dependendo da suscetibilidade individual à toxina, da quantidade de toxina ingerida e da saúde geral do indivíduo (FDA, 2012). Os sintomas clássicos da intoxicação alimentar estafilocócica incluem náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, sudorese, dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e, em raras vezes, febre, quando a quantidade de toxina ingerida é grande (Franco e Landgraf, 2008).

A literatura descreve 26 diferentes tipos de SE (Aguiar *et al.*, 2022). Dentre elas, as mais estudadas são: *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, as quais são responsáveis por aproximadamente 95% dos casos e surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (Al-

Tarazi *et al.*, 2009; Johler e Stephan, 2010). Destas, a enterotoxina A é reconhecida como a principal causadora de intoxicação alimentar em humanos em nível mundial (Argudín *et al.*, 2010; Hu e Nakane, 2014), enquanto a *seb* é associada a sintomas mais severos quando comparadas com outras enterotoxinas. O gene *sec* é frequentemente encontrado em cepas de *S. aureus* isoladas de leite (Argudín *et al.*, 2010; Carfora *et al.*, 2015; Valihrach *et al.*, 2013). A *sed* é reconhecida como a segunda mais comumente associada a casos de intoxicação alimentar no mundo, mediante à sua elevada virulência mesmo em pequenas doses (Pinchuk *et al.*, 2010). A *see*, também está associada a casos de intoxicação alimentar, embora com menor frequência.

Em se tratando de *S. aureus* provenientes de leite e produtos lácteos, estudos demonstram uma ampla diversidade nos tipos de enterotoxinas presentes. Carfora *et al.* (2015) ao avaliarem leite das espécies bovino, ovino, caprino e bubalino, encontraram prevalência do gene da *sec* em 28,6% dos isolados, seguido pelos genes das enterotoxinas A e D em 20%. Em contraste, em estudos com isolados de leite de vacas com mastite, não foram encontrados isolados portadores dos genes das enterotoxinas A, B e C (Gómez *et al.*, 2007). Estudos adicionais mostraram que as condições ambientais favoráveis podem promover a produção de SE em alimentos contaminados (Santana *et al.*, 2010).

A incidência de intoxicação alimentar estafilocócica associada ao consumo de leite e seus derivados pode ser atribuída a fatores, que incluem a inadequada associação do tempo e temperatura, a falha na descontaminação de superfícies e utensílios, a contaminação durante o preparo dos alimentos por parte dos manipuladores e a formação de biofilmes. Os *Staphylococcus sp.* possuem capacidade de se adequar e tolerar uma variedade de condições ambientais, como temperatura e pH, promovendo a habilidade de se proliferar em múltiplos tipos de alimentos. (Bhatia e Zahoor, 2007; Pinchuk *et al.*, 2010).

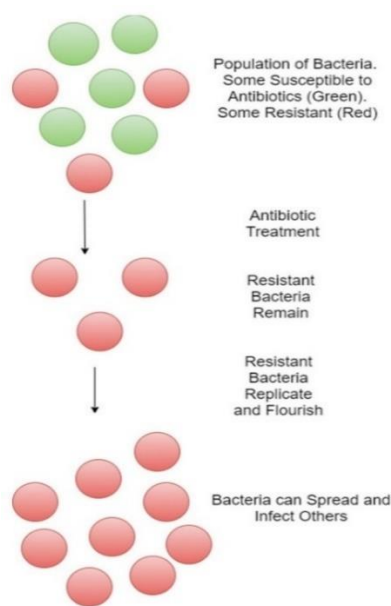
2.3.3 Resistência aos antibióticos

Conforme indicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em seu relatório de 2021, a resistência antimicrobiana emerge como um dos principais desafios globais contemporâneos à saúde pública (WHO, 2021). Uma bactéria é categorizada como resistente quando adquire a habilidade de subsistir e se multiplicar na presença de um

antibiótico que, em condições normais de concentração, seria eficaz em sua erradicação ou na inibição de seu crescimento (Guardabassi e Kruse, 2010).

Em geral, a eficácia de um agente antimicrobiano depende da expressão de genes de resistência de cepas bacterianas, podendo ser influenciada pela exposição anterior ao antimicrobiano e pela pressão seletiva que o mesmo determina. O amplo uso de antimicrobianos na produção animal e no tratamento clínico de animais e seres humanos tem contribuído para o aumento de bactérias multirresistentes, ou seja, aquelas que apresentam resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (EFSA, 2014). A pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos dá-se através do contato com os microrganismos, provocando a morte de bactérias suscetíveis e a manutenção das resistentes (Figura 1).

Figura 1: Propagação de bactérias resistentes a antibióticos por seleção natural.



Fonte: Nicolik e Mudgil (2023).

Por este motivo, em ambientes com o uso recorrente de antimicrobianos, como é o caso da produção animal quando utiliza tais drogas como uso profilático ou como promotor de crescimento a disseminação de bactérias resistentes é favorecida, fazendo com que prevaleçam na comunidade de uma forma geral, levando ao aparecimento de cepas multirresistentes (Silva de Jesus *et al.*, 2022).

Devido ao amplo número de antimicrobianos e classes de antimicrobianos, são vários mecanismos bioquímicos que podem levar uma bactéria a se tornar resistente:

produção de enzimas que modificam a molécula do antibacteriano tornando-o inativo; alteração do alvo; diminuição da permeabilidade à entrada do antibacteriano; síntese de novas enzimas que não sofrem ação do antibacteriano e expulsão do antibacteriano da célula (Trabulsi e Alterthum, 2008).

O mecanismo enzimático pode ser exemplificado pelas enzimas β -lactamases que desintegram os antimicrobianos pertencentes a classe dos β -lactâmicos, como penicilinas, e enzimas modificadoras, que podem inativar cloranfenicol, fármaco utilizado na saúde humana e aminoglicosídeos, como a gentamicina. As bombas de efluxo conferem a expulsão do antimicrobiano do meio intracelular, mediando resistência à tetraciclina, cloranfenicol e fluorquinolonas, por exemplo (Morrison e Zembower, 2020). O mecanismo de alteração do sítio de ação caracteriza-se pela redução, ou mesmo ausência de afinidade do antibiótico pelo local de ligação na bactéria, sendo este tipo de resistência observado em antimicrobianos β -lactâmicos e glicopeptídeos (Fluit; Visser; Schmitz, 2001; Rice e Bonomo, 2005). Para o último caso, um exemplo é a resistência aos β -lactâmicos em MRSA, que é mediada pelo gene *mecA* não nativo, que codifica a proteína de ligação à penicilina modificada (PBP2a), que tem uma afinidade extremamente baixa por β -lactâmicos, fazendo com que não tenham efeito bactericida (Boonsiri *et al.*, 2020).

Embora os genes responsáveis pela resistência aos antimicrobianos contidos em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, normalmente codifiquem enzimas que inativam os antimicrobianos ou reduzem a permeabilidade das células, na resistência conferida por mutações cromossômicas geralmente o mecanismo de resistência envolve a modificação do alvo, não ocorrendo a ligação do antimicrobiano com a bactéria alvo (Neidhardt, 2004). No entanto, um mesmo tipo de mecanismo de resistência pode ser identificado por muitos genes diferentes, a exemplo das bombas de efluxo, que conferem resistência às tetraciclinas, onde mais de 40 determinantes genéticos já foram descritos (Roberts e Schwarz, 2016). Além disso, mais do que um tipo de mecanismo pode proporcionar resistência ao mesmo antibiótico, sendo a resistência para tetraciclina ocorrendo tanto através de bombas de efluxo, como por proteínas de proteção ribossomal (Connell *et al.*, 2003; Guillaume *et al.*, 2004).

Dada a origem da resistência bacteriana decorrente do uso indiscriminado dos antimicrobianos e, considerando a escassez de novas moléculas no mercado, há necessidade de medidas de controle para mitigar uma crise global na área da saúde e impedir a era pós-antibiótica, como utilização racional de agentes antimicrobianos na

saúde animal e humana, rigoroso controle de higienização e prevenção de infecções bem como a intensificação da vigilância da resistência antimicrobiana (WHO, 2019).

2.3.4 Resistência em *S. aureus*

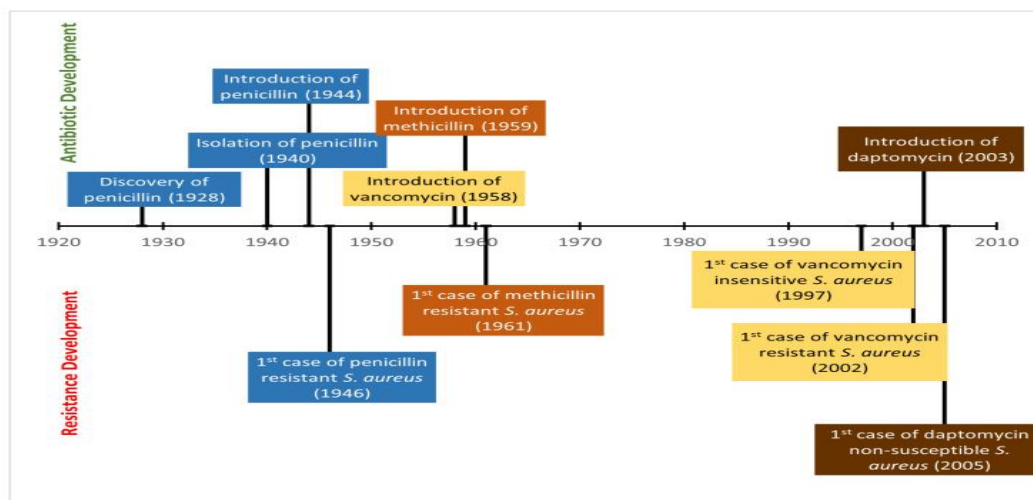
S. aureus apresenta um conjunto de genes que confere a habilidade de aumentar as perspectivas de sobrevivência diante dos potenciais locais de migração no interior do hospedeiro. A regulação da produção dos fatores de virulência, em resposta à densidade celular, disponibilidade energética e sinais ambientais, é viabilizada por meio de um intrincado sistema de regulação (Conrad, 2014).

Conforme Mediavilla *et al.* (2012), um dos principais atributos da maioria das espécies de estafilococos é a capacidade de desenvolver rapidamente resistência a agentes microbianos. McCallum *et al.* (2010) afirmam que de modo geral, os mecanismos de resistência são: alterações na permeabilidade da parede celular (PC), inativação enzimática dos agentes antimicrobianos, modificações no alvo do antibiótico e na ativação das bombas de efluxo, que atuam no mecanismo de transporte ativo nas membranas. De modo que devido a variabilidade de mecanismos utilizados pelo microrganismo, Nascimento *et al.* (2019), destacam a magnitude do problema da resistência bacteriana e enfatizam a importância de abordagens abrangentes para preservar a eficácia dos antibióticos existentes.

A descoberta da penicilina foi realizada por Alexander Fleming em 1928, porém sua introdução para uso médico ocorreu apenas em 1944, quando, permitiu o tratamento de infecções bacterianas graves que anteriormente não respondiam ao tratamento, incluindo as causadas por *Staphylococcus* sp. Dois anos após sua introdução, foi isolada a primeira cepa de *S. aureus* resistente à penicilina, tal cepa era resistente devido à aquisição do gene *blaZ*, o qual codifica a proteína β -lactamase que inibe a ação da penicilina hidrolisando a estrutura do anel β -lactâmico (Bush e Bradford, 2016).

A Figura 2 apresenta a linha do tempo do ano de introdução dos antibióticos abaixo citados na clínica e o ano do primeiro relato de cepas de *S. aureus* resistentes a tais fármacos.

Figura 2: Cronologia do desenvolvimento da resistência aos antibióticos em *S. aureus*



Fonte: Nicolik e Mudgil (2023).

A metecilina introduzida em 1959 foi uma alternativa de tratamento, após a resistência à penicilina ser identificada em SA. No entanto, assim como ocorreu com a penicilina, o uso indiscriminado deste antibiótico promoveu o desenvolvimento e a disseminação da resistência, e em apenas dois anos após sua introdução, foram relatados casos de cepas de *S. aureus* resistentes à metecilina.

O *S. aureus* desenvolveu resistência a metecilina graças à aquisição do gene *mecA*. A evolução do MRSA ainda está sendo investigada, duas hipóteses foram propostas para explicar o surgimento e a disseminação do MRSA em hospitais e na comunidade. A primeira é a teoria do clone único, que sugere que todos os clones de MRSA têm um ancestral comum sensível à metecilina, *S. aureus* (MSSA). A segunda é a teoria do multi-clone, que sugere que o SCCmec contendo o *mecA* foi introduzido várias vezes em diferentes linhagens ancestrais de MSSA, sendo esta mais bem sustentada pela literatura.

De acordo com Tsubakishita *et al.* (2010), a origem do SCCmec encontrado em MRSA é desconhecida, mas é encontrado em outras espécies de estafilococos coagulase negativos. Especula-se que o SCCmec seja capaz de ser transferido entre espécies de estafilococos, inclusive a literatura considera a origem mais provável ser de um coagulase negativo.

A vancomicina, droga utilizada na saúde humana foi considerada um dos últimos recursos para tratar MRSA, mas até mesmo ela foi tornada ineficaz contra certas linhagens de MRSA que adquiriram resistência. Inicialmente, isolados de MRSA com

susceptibilidade reduzida à vancomicina foram relatados em 1997, seja como *S. aureus* resistentes à vancomicina (VISA) ou VISA heterogêneos (hVISA). O VISA refere-se a cepas com susceptibilidade reduzida em toda a população, enquanto o hVISA refere-se a populações com MIC aceitável de vancomicina que também contêm uma pequena subpopulação que tem susceptibilidade reduzida à vancomicina. O VISA é tipicamente causado por mutações cromossômicas que conferem resistência ligeiramente aumentada à vancomicina. Além disso, existem cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA), sendo que a primeira foi relatada nos Estados Unidos da América em 2002.

Daptomicina é um antibiótico peptídico cíclico. Foi aprovado para uso contra *S. aureus* e é fundamental na terapia anti-MRSA. O modo de ação requer cálcio, formando um complexo que se comporta como um peptídeo catiônico e oligomeriza, formando micelas, as quais penetram na PC e se inserem na membrana lipídica, perturbando a membrana causando despolarização, permeabilização e vazamento de íons. Quanto à resistência a esse antimicrobiano existem várias explicações potenciais, incluindo uma membrana mais positivamente carregada, mudanças na fluidez da membrana e alanilação de ácidos teicóicos (Casanova; Ruiz e Bellido, 2017).

2.3.4.1 MRSA

O MRSA emerge como uma das principais cepas contribuintes para esse cenário preocupante, a resistência do MRSA aos antibióticos tradicionais, como meticilina e oxacilina, destaca a necessidade de estratégias inovadoras no tratamento de infecções bacterianas.

De acordo com Barberato-Filho (2020) os animais destinados à produção de alimentos, além de serem considerados a principal fonte de MRSA, estão envolvidos na transferência zoonótica dessas cepas com elevados níveis de resistência devido ao uso de antimicrobianos na promoção do crescimento, na prevenção e tratamento de doenças.

Turner *et al.* (2019) ressalta sua versatilidade e imprevisibilidade, atributos que a tornam uma ameaça à saúde humana e animal. A habilidade do MRSA em se adaptar geneticamente e o surgimento sequencial de cepas epidêmicas bem-sucedidas perpetuam sua relevância como um desafio considerável na esfera da *One Health*.

2.3.4.1.1 Gene *mecA*

O gene *mecA*, central na resistência à meticilina em SA, é de particular relevância nas discussões sobre resistência antimicrobiana no contexto da produção animal e alimentos. Recentemente, estudos têm destacado a presença e disseminação do gene *mecA* em cepas de *S. aureus* isoladas de animais de produção e produtos alimentícios (Quijada, 2019; Zhang, 2020). Tal observação é premente, pois sugere a possível transmissão de resistência ao longo da cadeia alimentar.

2.3.4.2 VRSA

O VRSA representa um desafio significativo à saúde pública devido à sua resistência completa à vancomicina, um dos antibióticos de última linha utilizados para tratar infecções graves em humanos causadas por patógenos multirresistentes. A resistência em VRSA é mediada pela aquisição do gene *vanA*, que codifica uma alteração no peptidoglicano da PC bacteriana, substituindo a terminação D-Ala-D-Ala por D-Ala-D-Lac (Perichon e Courvalin, 2012; Bugg *et al.*, 1991). Esta modificação diminui drasticamente a afinidade da vancomicina pelo seu alvo, resultando em uma eficácia terapêutica nula. A transferência horizontal do gene *vanA*, ocorre frequentemente de enterococos resistentes à vancomicina através de elementos genéticos móveis como plasmídeos, sendo o mecanismo central na disseminação dessa resistência.

A resistência à vancomicina é encontrada em cepas de MRSA devido à aquisição do operon *vanA*, que confere resistência à vancomicina alterando a síntese da PC para remover o sítio de ligação da vancomicina (McGuinness *et al.*, 2017).

2.3.4.2.1 Gene *vanA*

O gene *vanA* é responsável pela resistência à vancomicina, presente em cepas de uma variedade de microrganismos entre eles *Enterococcus* sp. e *S. aureus*. Aquib e Alsayeqh (2022), afirmam que a transferência de resistência é extensa entre animais, humanos e o meio ambiente, com pleno potencial de zoonoses, provocando prejuízos

econômicos significativos e ameaçando a sanidade animal, a segurança dos alimentos a saúde pública.

A adaptação genética é preocupante, já que a vancomicina é utilizada amplamente no tratamento de infecções por MRSA (Cong *et al.*, 2020). Existem duas formas de resistência à vancomicina em *S. aureus*: cepas de resistência intermediária à vancomicina (VISA) que tendem a surgir após tratamentos prolongados com vancomicina, e a heterorresistência, onde diferentes mutações conferem graus variados de resistência à vancomicina dentro de uma população. O tempo e a pressão seletiva, como tratamentos prolongados com vancomicina, selecionam cepas que acumulam múltiplas mutações, resultando em altas MICs, isso destaca como os diferentes componentes genômicos podem influenciar de maneira única a aquisição de resistência a antibióticos, como observado por meio do sequenciamento do genoma completo em isolados de *S. aureus*, mostrando mais de 30 mutações diferentes (Mwangi *et al.* 2007).

3 ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE LEITE OVINO: CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES E DO MANEJO HIGIÊNICO-SANTÁRIO DA ORDENHA

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo já publicado na Revista “Observatorio de la Economía Latinoamericana” sob o DOI: 10.55905/oelv22n7-084.

RESUMO

O leite de ovelha é uma fonte rica de nutrientes e serve como base para uma variedade de produtos lácteos, apesar da possibilidade de ser um produto com alto valor agregado, a produção brasileira ainda é modesta. Este trabalho teve como objetivo a caracterização das propriedades produtoras de leite ovino, de modo a investigar as práticas de manejo, as percepções, as necessidades e as demandas dos produtores. A caracterização das unidades de produção de leite foi realizada utilizando-se um questionário em sete propriedades de diferentes municípios de Santa Catarina, São Paulo e Rio Grande do Sul. Os resultados destacaram uma ampla diversidade de tamanhos de propriedades e número de animais. Além disso, percebeu-se contrastes entre tipos de mão-de-obra, sistema de produção, tendo ou não a ovinocultura como atividade principal. Entre a similaridade destaca-se a ordenha mecânica e a predominância da raça Lacaune, bem como o desejo dos produtores em melhorarem sua produção. Deste modo, este trabalho fornece insights para a compreensão do panorama da produção de leite ovino e direciona possíveis melhorias na gestão e nas práticas de manejo.

Palavras-chave: Leite de ovelha, Manejo, Produtor de leite, Sanidade.

ABSTRACT

Sheep milk is a rich source of nutrients and is used for the production of a variety of derivatives. Despite its potential as a high-value product, sheep milk production in Brazil remains modest. This study aimed to characterize sheep milk-producing properties in order to investigate management practices, perceptions, needs, and demands of producers. The characterization of milk production units was carried out using a questionnaire in seven properties located in different cities of three Brazilian states: Santa Catarina, São Paulo, and Rio Grande do Sul. The results highlighted a wide diversity of property sizes and numbers of animals. Additionally, there were contrasts between types of labor, production systems, and sheep farming as the main activity. Among the similarities, the use of mechanical milking and the predominance of the Lacaune breed were highlighted, as well as the desire of farmers to improve production and quality. Thus, this study provides important insights into the chain of production for sheep milk and directs possible improvements in management and handling practices.

Keywords: Health, Management, Milk producer, Sheep milk

RESUMEN

La leche de oveja es una fuente rica de nutrientes y sirve como base para una variedad de productos lácteos. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar las propiedades productoras de leche ovina para investigar prácticas de manejo, percepciones, necesidades y demandas de los productores. La caracterización de las unidades de producción de leche se llevó a cabo mediante un cuestionario en siete propiedades ubicadas en diferentes municipios de Santa Catarina, São Paulo y Rio Grande do Sul. Los resultados resaltaron una amplia diversidad de tamaños de propiedades y números de animales. Además, hubo contrastes entre tipos de mano de obra, sistemas de producción y la ovinocultura como actividad principal. Entre las similitudes, se destacaron el uso de ordenadoras mecánicas y la predominancia de la raza Lacaune, así como el deseo de mejorar la producción. Por lo tanto, este estudio proporciona información importante sobre el panorama de la producción de leche ovina y dirige posibles mejoras en las prácticas de gestión y manejo.

Palabras clave: Leche de oveja, Manejo, Productor de leche, Sanidade.

3.1 INTRODUÇÃO

Em âmbito mundial o leite de ovelha além de consumido diretamente é empregado na elaboração de derivados relevantes na indústria alimentícia com potencial para atender às demandas por alimentos funcionais. A produção de leite e derivados constitui uma cadeia produtiva em diferentes níveis de organização, que variam de acordo com o estágio de desenvolvimento regional, tanto em formatos formais quanto informais (Bianchi *et al.*, 2023). No Brasil, a produção possui potencial para se tornar um componente essencial da agropecuária, pela diversificação de produtos lácteos e pela possibilidade de ampliação de renda e desenvolvimento econômico em áreas rurais. A relevância do setor é evidenciada pelas mais de 20 milhões de cabeças distribuídas por todo o país (IBGE, 2022). A demanda por produtos lácteos de ovelha está aumentando diante do crescente interesse dos consumidores por alternativas aos lácteos tradicionais de origem bovina (Heidorn *et al.*, 2022). Esse interesse é alimentado pelo perfil nutricional do leite de ovelha, que possui alta concentração de proteínas, vitaminas, cálcio e outros nutrientes essenciais e por ser considerado de fácil digestibilidade para pessoas com distúrbios digestivos como a intolerância à lactose. Portanto, é indispensável compreender aspectos como a qualidade e a sustentabilidade da produção, visando promover avanços neste segmento. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo caracterizar as propriedades produtores de leite de ovelha, investigar as práticas de manejo, as percepções, as

necessidades e as demandas dos produtores, visando contribuir para o desenvolvimento do setor.

3.2 REFERENCIAL TEÓRICO

Estudos de mercado indicam um aumento na demanda por produtos como iogurtes probióticos e enriquecidos com nutrientes específicos, devido aos seus potenciais benefícios para a saúde (Bakshi *et al.*, 2020; Díaz *et al.*, 2020). O leite ovino destinado a produtos de alto valor agregado, está ganhando cada vez mais destaque devido às suas propriedades nutricionais e sensoriais diferenciadas. Entretanto, embora o setor apresente potencial para o crescimento, ainda há desafios a serem superados, como a falta de padronização nas práticas de manejo e a necessidade de maior acesso a material genético de boa qualidade (Bianchi, 2018).

Para que essa atividade atinja seu potencial é necessário abordar desafios estruturais e operacionais. Morantes *et al.* (2017) indicam que a melhoria dos processos de produção é altamente recomendável, pois permite a identificação de falhas e a implementação de ações corretivas de maneira oportuna. Esse aprimoramento pode resultar em avanços significativos tanto nos aspectos técnicos quanto econômicos. A falta de padronização nas práticas de manejo é um problema crítico que afeta diretamente a consistência da qualidade do leite ovino. Além disso, a ausência de treinamento especializado para trabalhadores rurais, bem como o acesso limitado a tecnologias modernas de ordenha e equipamentos para processamento de leite, podem dificultar a expansão do setor (Paulo e Rodrigues, 2022). Outro desafio importante está relacionado à sanidade dos rebanhos. A ausência de programas sistemáticos de vacinação e controle de doenças pode impactar negativamente a produção e aumentar os custos operacionais (Rocha, 2016).

Gelasakis, Kalogianni e Bossis (2019) enfatizam que mesmo em países onde a ovinocultura leiteira é tradicional, como na Grécia, alguns produtores não compreendem a importância econômica da implementação precoce de medidas preventivas apropriadas para o controle de doenças. Concluindo que a educação e treinamento por profissionais é fundamental para a sustentabilidade econômica das fazendas e o bem-estar dos animais. Pois a produção leiteira, o rendimento e a composição do leite são determinados

principalmente por fatores genéticos, nutricionais e condições de manejo em que os animais são submetidos (Legarra *et al.* 2014; Ogorevc *et al.*, 2009)

Todos esses fatores tornam a produção leiteira ovina desafiadora, diante da dependência de uma série de variáveis, como mão-de-obra, manejo de ordenha e nutricional, genética, sanidade e qualidade do leite. Deste modo, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que embasem a tomada de decisão precisa, fundamental para garantir a qualidade e a sustentabilidade da produção de leite ovino.

3.3 METODOLOGIA

Após a aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos da UDESC, durante o período de outubro de 2023 a março de 2024, foi aplicado um questionário em entrevistas durante visitas às propriedades ou por meio de formulário eletrônico on-line encaminhado por e-mail. Sete propriedades, distribuídas nos estados de Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e São Paulo (SP) participaram do estudo. A seleção das propriedades foi realizada a partir da identificação dos associados dos produtores das raças leiteiras Lacaune, East Friesian ou Bergamácia listados na Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO). Não foi adotado critério de seleção com base no número de animais, devido à variação existente nos rebanhos. O principal critério de participação foi a disposição do produtor em colaborar com o estudo.

A coleta de dados abarcou uma gama de informações, desde aspectos gerais sobre a propriedade até detalhes específicos, incluindo aspectos sanitários, nutricionais e práticas relacionadas à ordenha. Os dados foram submetidos ao processo de tabulação e síntese e, posteriormente, analisados por meio de estatística descritiva, visando proporcionar uma compreensão do panorama da produção no contexto investigado.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Caracterização das propriedades

A Tabela 1 mostra as sete propriedades avaliadas: 57,1% localizadas no RS, 28,6% em SC e 14,3% em SP. O tamanho das propriedades variou de 6 à 333ha. O RS

conta com a maioria das propriedades, tal fator é atribuído por seu pioneirismo na atividade desde a década de 90 (Brito *et al.*, 2006).

O sistema de produção mais utilizado foi o intensivo (57,1%). Os sistemas adotados são um fator importante na criação de ovinos, os quais podem ser classificados como intensivos, semi-intensivo e extensivo (Silva, 2018). A nível nacional, a maioria dos criadores utilizam semi-intensivo e extensivo, principalmente no semi-árido nordestino (Medeiros *et al.*, 2005). O sistema extensivo é mais simples, já que nele os animais são criados a pasto, com custo de produção baixo, e o desempenho dos animais depende das condições climáticas e da fertilidade do solo, e ainda, o emprego de tecnologias é mais baixo, o que impacta diretamente a produtividade (Monteiro *et al.*, 2021).

Por sua vez, na região Sul, há predominância do sistema intensivo, onde os animais ficam confinados em instalações que permitem maior tecnificação e controle ambiental. Levando em consideração o tamanho do país e as particularidades de cada região é fundamental reconhecer que não existe um modelo único ou ideal de produção, e sim uma variedade de abordagens que podem ser adaptadas às diferentes realidades e objetivos dos produtores.

A ovinocultura de leite era a atividade principal em 71,4% das propriedades. Criadores que possuem tal atividade como secundária muitas vezes não adotam todas as práticas de controle zootécnico e manejo, o que representa um obstáculo para a profissionalização da atividade (Aquino *et al.*, 2016). É sabido ainda que grande parte dos produtores não tem como atividade principal a caprinovinocultura, o que acaba levando a uma baixa especialização, independentemente da aptidão do rebanho (Sorio, 2017).

Tabela 1: Caracterização das propriedades

Propriedade	UF	Área (ha)	Sistema	Atividade principal	Raça	Nº de animais
1	SC	35	Intensivo	Sim	Lacaune	850
2	SC	98	Intensivo	Sim	Lacaune	726
3	SP	12	Intensivo	Sim	Lacaune	850
4	RS	6	Extensivo	Não	Lacaune	20
5	RS	11	Extensivo	Sim	Lacaune	26
6	RS	333	Extensivo	Não	Lacaune	35
7	RS	29	Intensivo	Sim	East Frisean	45

Fonte: dados da pesquisa

71,4% dos proprietários entrevistados possuíam graduação ou pós-graduação, enquanto 28,6% nível fundamental ou médio. Balsadi (2008) e Buainain; Dedecca (2010)

consideram a escolaridade dos produtores rurais como uma representação indireta da competência destes. Kruger *et al.* (2021) e Paula Junior (2019) afirmam que a produtividade tende a ser maior, quanto maior for o nível de escolaridade, mesmo que a formação acadêmica não seja na área agrária. Por outro lado, os proprietários com nível de escolaridade básico ou fundamental podem enfrentar desafios na implementação de práticas avançadas, no uso de tecnologias modernas, e compreender aspectos complexos da produção, dificultando a tomada de decisões fundamentadas e estratégicas em relação ao manejo dos rebanhos e gestão da propriedade (Figueiredo, 2014). É importante ressaltar que a experiência prática e o conhecimento adquirido ao longo do tempo são cruciais no sucesso da atividade, permitindo que produtores com níveis mais baixos de escolaridade compensem essa lacuna por meio de aprendizado prático, mentorias e participação em programas de capacitação e extensão rural. Brito (2022) ressalta a necessidade de integrar ao ambiente de conhecimento científico os saberes práticos e populares, provenientes de produtores rurais, de modo a dialogar com as práticas e tradições daqueles que compreendem a realidade do campo, sendo possível criar uma abordagem coletiva com a experiência do campesinato.

Em relação ao tipo de mão de obra, 28,6% das propriedades contavam com trabalhadores assalariados como principal recurso humano, 42,9% dependiam da mão de obra familiar, e o restante utilizava tanto familiar, quanto contratada. A eficácia da mão de obra familiar desempenha uma contribuição crucial na redução de custos operacionais e no aumento da produtividade em propriedades rurais. É importante ressaltar a redução dos custos de gerenciamento e supervisão da mão de obra familiar, bem como a diminuição dos custos operacionais associados ao uso de trabalhadores familiares, que possuem incentivos diretos para evitar o desperdício. Além disso, destaca-se a maior produtividade alcançada em tarefas delicadas de manuseio e atenção, em comparação com o trabalho assalariado e, por fim, a melhor qualidade do produto obtida quando os próprios interessados estão envolvidos (Buanain, Romeiro e Guanzirol, 2003).

3.4.2 Rebanhos

A raça Lacaune foi predominante em 85,7% das propriedades (Tabela 1), evidenciando sua relevância na produção de leite. A Lacaune, originária da França, é reconhecida por sua alta capacidade leiteira e pela qualidade do leite produzido (Barillet

et al., 2001; Figueira *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2022; Zvonko *et al.*, 2022). A Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Leiteiros (ABCOL) salienta que os ovinos Lacaune destacam-se por sua adaptação a diferentes ambientes, e apresentam rusticidade e resistência a doenças. Além disso, possuem uma média de produção anual que pode variar de 300 a 600 litros por animal. Entretanto, um dos fatores críticos da atividade está relacionado ao alto custo para aquisição desses animais e a baixa disponibilidade de raças, que se limita entre Lacaune e East Friesian (Bianchi e Moraes, 2016).

Quanto aos plantéis, 42,9% possuíam mais de 700 animais, enquanto 57,1% eram menores que 50 animais (Tabela 1). A diversidade de escalas de produção entre as propriedades participantes destaca a heterogeneidade das estruturas. Em propriedades que contam com um menor rebanho, uma alternativa para a viabilidade econômica da atividade é a criação de cordeiros e ovelhas leiteiras para reposição do rebanho, além da produção de leite em si (Bianchi *et al.*, 2023).

3.4.3 Manejo nutricional

No manejo nutricional, observou-se uma diferenciação entre as práticas adotadas. Enquanto 28,6% dos proprietários alimentavam seus animais exclusivamente com silagem e concentrados - 71,4% além do fornecimento de silagens e concentrados, permitiam aos animais o acesso a pastagens, como o campo nativo. O manejo nutricional pode influenciar significativamente o desempenho produtivo, impactando não apenas a produção de leite, mas também a saúde e o bem-estar dos animais. Ao comparar a produção de leite de ovelhas mantidas à pasto ou confinadas, Queiroz (2008) afirma que mesmo que o confinamento tenha resultado em maior produção e, consequentemente, receita mais elevada, isso não foi suficiente para gerar lucros mais significativos, considerando-se o custo da mão de obra para alimentação e limpeza das baias, o que eleva as despesas desse sistema. De todo modo, o autor ressalta que os resultados poderiam ser diferentes com um número maior de animais ou com ovelhas de maior produtividade, corroborando a ideia de que o produtor pode adotar ambas as técnicas, aproveitando as pastagens quando estão em abundância e utilizando o confinamento durante a estiagem.

3.4.4 Manejo sanitário

A utilização criteriosa de antibióticos é uma prática em 100% das propriedades, sendo estes empregados apenas quando necessário. Entre os antibióticos mais utilizados estão a penicilina, enrofloxacina e sulfas. Segundo Costa (2013), o uso de antibióticos na ovinocultura de leite faz-se necessário para o tratamento de enfermidades como a mastite. A penicilina, um antibiótico beta-lactâmico, é frequentemente empregada no tratamento de infecções bacterianas, atuando contra uma ampla variedade de patógenos. A enrofloxacina, pertencente à classe das fluoroquinolonas, apresenta eficácia contra infecções causadas por bactérias gram-negativas e algumas gram-positivas. Já as sulfas, são amplamente utilizadas no controle de infecções bacterianas, agindo como inibidoras do metabolismo bacteriano. A utilização desses antibióticos requer cautela, visando evitar a resistência bacteriana e a presença de resíduos nos produtos lácteos, que podem representar riscos à saúde pública (Wemette *et al.*, 2020).

Do mesmo modo, todas as propriedades eram adeptas ao calendário vacinal, adotando a vacinação correspondente a cada categoria. Tal prática é primordial para prevenir o surgimento de doenças no rebanho. A adoção de um calendário vacinal é crucial para determinar o momento adequado para a administração das vacinas, garantindo a eficácia da imunização e a sanidade do rebanho. Essa abordagem, não apenas protege os animais contra doenças específicas, mas também sustenta a rentabilidade e a viabilidade da atividade (Rocha, 2016).

Quanto à realização de exames laboratoriais, 42,9% realizavam exames por conta própria, sendo que 14,3% eram parceiras de universidades, onde esporadicamente acadêmicos e docentes realizavam coletas de material para pesquisa e posteriormente informavam os resultados. A ausência deste monitoramento regular pode representar um desafio para a detecção precoce de doenças e a implementação de medidas preventivas adequadas. A parceria com universidades para realização de exames laboratoriais demonstra uma iniciativa positiva, possibilitando o acesso a recursos técnicos e científicos especializados, contribuindo para a melhoria da gestão sanitária e a tomada de decisões embasadas em evidências científicas. Entre os exames realizados, estava o OPG (ovos por grama) das fezes que tem grande importância para o controle efetivo da carga parasitária nos ovinos. As endoparasitoses retardam o crescimento, prejudicando o desempenho reprodutivo e afetando a produção de leite das fêmeas durante a lactação,

além de aumentar as taxas de mortalidade, o que traz impactos econômicos para os criadores (Costa, 2009; Falasca *et al.*, 2023)

Apenas 57,1% das propriedades contavam com assistência técnica veterinária. A ausência de um acompanhamento especializado pode acarretar consequências negativas para a produção, tais como dificuldades na identificação e manejo adequado de doenças, desafios na implementação de práticas de manejo nutricional e sanitário eficazes, e até mesmo limitações na otimização do desempenho reprodutivo e produtivo do rebanho.

3.4.5 Manejo de ordenha

A ordenha mecânica adotada em todas as propriedades oferece vantagens em termos de eficiência e produtividade. (Dias, Beloti e Oliveira, 2020; Marie-Etancelin *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2020). No entanto, a fim de garantir a qualidade do leite e minimizar a contaminação microbiológica é necessária a adequada manutenção e higienização dos equipamentos (Ströher, Santos Jr. e Salazar 2023).

Em 57,1% das propriedades foi observado que as ovelhas tinham contato com o pastejo antes da ordenha. Esse contato deve ser acompanhado do monitoramento da qualidade e da lotação das pastagens de modo a garantir que o ambiente esteja livre de contaminação por parasitas intestinais que podem prejudicar a qualidade do leite (Amarante, Ragozo e Silva, 2014). Queiroz *et al.* (2012) compararam a incidência de mastite em ovelhas mantidas em pasto e confinamento e notaram que 35,3% das ovelhas mantidas em confinamento apresentaram mastite, enquanto as mantidas em pastagem apenas 28,6% foram acometidas pela infecção. Concluindo que, provavelmente, as ovelhas confinadas ficaram mais expostas aos agentes contaminantes, já que eram mantidas em baias e a cama pode favorecer a contaminação. Ao saírem da sala de ordenha, o esfíncter dos tetos encontra-se aberto, e normalmente após o manejo os animais deitam-se, o que predispõe a maior chance de infecção (Paulo e Rodrigues, 2022). Porém, as ovelhas com acesso ao pasto, ao sair da sala de ordenha, procuram imediatamente à pastagem e iniciam o pastejo (Queiroz, 2008).

Em 57,1% das propriedades apesar da realização do descarte dos primeiros três jatos de leite, não ocorria a adoção da prática do pré e pós-*dipping*. A implementação de medidas de manejo da ordenha, como o descarte dos três primeiros jatos, a lavagem dos utensílios de ordenha e o pré-*dipping*, resultou em uma redução média de 87,0% na

contagem bacteriana total e de 51,9% na contagem de células somáticas (Vallin *et al.*, 2009). A desinfecção dos tetos após a ordenha auxilia a manutenção da saúde do úbere e, por consequência, na qualidade do leite (Dias, Beloti e Oliveira, 2020; Locatelli *et al.*, 2023; Romero *et al.*, 2020). A falta de implantação de práticas como essas pode ser contornada com a introdução de boas práticas pelos produtores, derivadas de iniciativas efetivas por parte da União que promovam o desenvolvimento de ações voltadas à assistência técnica e à capacitação (Cruz *et al.*, 2019).

3.4.6 Leite

O estudo revelou que 28,6% das propriedades possuíam informações sobre a qualidade do leite, obtidas por meio de análises laboratoriais realizadas pelos laticínios. Além disso, 71,4% das propriedades relataram que a qualidade do leite nos três últimos meses estava de acordo com as Instruções Normativas nº76 e nº77 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2018).

A qualidade do leite está diretamente relacionada à segurança alimentar e a reputação do produto. No entanto, a avaliação sistemática da qualidade do leite nem sempre é realizada por todos os produtores. A qualidade do leite pode ser influenciada por fatores como saúde e nutrição do rebanho, as práticas de manejo durante a ordenha e o armazenamento adequado do leite. A realização de análises laboratoriais periódicas permite a detecção precoce de problemas de qualidade, como contaminação por microrganismos, presença de resíduos medicamentosos e teores de gordura e proteína. De acordo com Vieira *et al.* (2021), por vezes a adoção de simples práticas, corretamente aplicadas na rotina da propriedade, são capazes de trazer melhorias à qualidade do leite.

No Brasil, as Instruções Normativas nº76 e nº77 do MAPA (Brasil, 2018) estabelecem diretrizes regulatórias visando garantir a qualidade e segurança do leite. Todavia, é importante destacar que não existem regulamentações específicas para o leite ovino, sendo uma lacuna a ser considerada, já que pode resultar em uma falta de padrões para esse produto. Portanto, é crucial que sejam desenvolvidas regulamentações específicas para o leite ovino, garantindo qualidade e segurança, e promovendo o desenvolvimento da atividade com um produto competitivo e confiável no setor lácteo.

Entretanto, a falta de monitoramento regular da qualidade do leite, mesmo que seguindo a legislação específica para bovinos ou a Instrução Normativa nº 37, que aprova

o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite de Cabra (Brasil, 2000), pode mascarar problemas subjacentes que, se não forem identificados e corrigidos a tempo, afetarão negativamente a saúde pública e a viabilidade econômica. Nesse sentido, é indispensável que os produtores de leite ovino adotem práticas de monitoramento da qualidade, incluindo análises laboratoriais regulares, conforme recomendado pelas autoridades sanitárias e órgãos reguladores.

A ausência de pasteurização em 42,9% das propriedades pode expor os consumidores a riscos desnecessários, considerando que o leite cru pode ser veículo de patógenos (Alegbeleye *et al.*, 2018; Nespolo, Taffarel, Brandelli, 2009). Tais resultados evidenciam a importância do manejo higiênico-sanitário da ordenha na produção de leite ovino. A diversidade de práticas sugere oportunidades de melhorias e colaborações para impulsionar o desenvolvimento sustentável da indústria.

3.4.7 Oportunidades de melhoria na atividade

Quando indagados se possuíam convicção quanto à possibilidade de melhorias da produção de modo geral, a resposta dos produtores foi unânime (100%). Entre as demandas citadas pelos produtores a necessidade de uma melhor genética disponível, para que seja possível a seleção de animais com características produtivas desejáveis.

Quanto a preocupação com a opinião e o conhecimento dos envolvidos na rotina diária da atividade no processo de formulação de normativas e legislações destacada por 14,6%, revela a importância da participação ativa dos produtores na tomada de decisões que impactam diretamente o setor. Belanche (2021) corrobora afirmando que na produção de ovinos as visões e percepções dos atores relevantes precisam ser consideradas para alcançar resultados significativos por meio da interação multidirecional de conhecimento entre pesquisadores, tomadores de decisão e outros beneficiários da ciência.

57,1% das propriedades recebiam assessoria de veterinários ou zootecnistas, enquanto as demais não contavam com esse suporte técnico. A falta de assessoria técnica é um ponto crítico, que evidencia a necessidade de suporte profissional para aprimorar a gestão e a eficiência da produção. De acordo com Pacheco *et al.* (2023) a presença da assistência técnica nas propriedades leiteiras permite a evolução do desempenho econômico da propriedade e da cadeia produtiva. Já as parcerias com instituições acadêmicas, como universidades é enriquecedora para ambos os lados como visto em um

estudo conduzido por Savi *et al.* (2022), com propriedades produtoras de leite bovino onde foi observado que a colaboração entre produtores e acadêmicos é considerada benéfica para a produção, uma vez que a parceria propicia discussões técnicas que podem resultar em melhorias nos índices de produtividade e renda. Ademais, essa sinergia reflete no bem-estar e na saúde dos animais, uma vez que as práticas e técnicas aprimoradas resultam em melhores condições da produção. Silva *et al.* (2020) afirmam que quando os produtores recebem orientações técnicas e informações práticas de manejo, eles obtêm o suporte necessário para desenvolver suas atividades de maneira eficaz e produtiva. Isso resulta em rebanhos com potencial competitivo no mercado.

Considerando a necessidade destacada pelos produtores (28,6%), as otimizações nos manejos nutricionais, englobam a expansão da capacidade de armazenamento de forragens e aprimoramento do uso das pastagens. Essas medidas visam potencializar a utilização dos recursos disponíveis, garantindo um fornecimento contínuo e de alta qualidade ao longo do ano, com o intuito de reduzir a dependência de fontes externas e os custos correlatos. As intervenções nutricionais em pequenos ruminantes desempenham um papel essencial na produção de laticínios, pois possibilitam modificações na composição de gordura, perfil de ácidos graxos e características sensoriais do leite (Ponnampalam *et al.*, 2023).

Sendo assim, as considerações dos produtores destacam a complexidade e a interdependência de diversos fatores que influenciam a produção de leite ovino. A busca por melhorias genéticas e sanitárias, aliada à participação ativa dos produtores na formulação de políticas e à disponibilidade de assessoria técnica especializada, são elementos-chave para impulsionar o setor e promover um crescimento sustentável e qualitativo na produção de leite ovino. Essas questões devem ser consideradas no desenvolvimento de estratégias e políticas que visam fortalecer e otimizar a atividade.

3.5 CONCLUSÃO

Em suma, este estudo oferece percepções sobre a produção de leite ovino e suas particularidades; destacando áreas de oportunidade para aprimoramentos nas práticas de manejo higiênico-sanitário na ordenha, como a adoção da prática do descarte dos três jatos de leite, e do pré e pós-*dipping*, bem como melhorias na sanidade do rebanho, com

a realização de exames laboratoriais e o acompanhamento das atividades por profissionais médico-veterinários ou zootecnistas. Os produtores expressaram sua aspiração de aprazar a atividade, seja por meio do acesso a material genético, implementação de manejo nutricional mais eficiente e orientação profissional. Estes dados ressaltam a necessidade de uma abordagem integrada e participativa, envolvendo produtores, profissionais, extensionistas, pesquisadores e autoridades para fomentar práticas sustentáveis na ovinocultura de leite.

4 ARTIGO 2: QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE OVINO: AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Staphylococcus aureus*

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo a ser submetido à Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.

RESUMO: A produção de leite ovino apresenta crescente demanda no Brasil, sendo que a região sul se destaca na exploração da atividade e produção de derivados. Este estudo investigou a qualidade microbiológica do leite ovino, focando na expressão fenotípica de resistência a antimicrobianos e detecção de genes relacionados a produção de enterotoxina e resistência a antibióticos em amostras de leite cru coletadas de duas propriedades nos municípios de Lageado Grande (P1) e Chapecó (P2), no oeste de Santa Catarina. As amostras (n=20) foram submetidas a análises de pH, contagem de bactérias totais, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, coliformes totais, bolores, leveduras, além da detecção de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. Os isolados de *S. aureus* obtidos foram analisados quanto a sua sensibilidade frente a dez antimicrobianos: cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), linezolida (10µg), oxacilina (1µg), vancomicina (30µg), penicilina G (10µg), cefoxitina (30µg), gentamicina (10µg), amoxicilina + ácido clavulânico (30µg) e clindamicina (2µg). Paralelamente, avaliou-se a amplificação de dois genes de resistência aos antimicrobianos (*mecA* e *vanA*) e dois genes de produção de enterotoxinas estafilocócicas (*sea* e *see*). Os resultados laboratoriais indicaram que não houve diferença significativa ($p<0.05$) para os valores de pH, contagem bacteriana total, contagens de *S. aureus*, *B. cereus* e lácticas entre as propriedades, do mesmo modo, em ambas houve ausência de patógenos como *E. coli*, *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*. As contagens de coliformes totais, bolores e leveduras apresentaram diferença significativa ($p<0.05$) entre as propriedades, sendo maiores na P1. Um total de 60,0% das amostras de leite apresentou contagem de *S. aureus*. A resistência bacteriana geral encontrada através do teste de disco difusão foi de 83,3%, com 75% para vancomicina, 8,3% para penicilina G e oxacilina, e sem resistência aos demais antimicrobianos. A análise genotípica não detectou a amplificação dos genes de resistência *mecA* e *vanA* ou dos genes produtores de enterotoxinas *sea* e *see*. A variabilidade nas contagens bacterianas sugere que as práticas de manejo adotadas interferem na qualidade microbiológica do leite. A ausência de genes de resistência, combinada com os resultados fenotípicos, sugere que a resistência pode estar relacionada a outros mecanismos genéticos. Sendo assim, o estudo destaca a importância de práticas rigorosas de higiene e monitoramento contínuo para garantir a segurança do leite ovino e a saúde pública.

Palavras-chave: Leite de ovelha; Resistência bacteriana; Qualidade do leite; Vancomicina.

4.1 INTRODUÇÃO

A produção de leite ovino no Brasil desponta como uma atividade com potencial econômico significativo, impulsionada pelo crescimento consistente do rebanho, especialmente na região Sul do país, onde as condições climáticas favorecem a criação de ovinos leiteiros (Munieweg *et al.*, 2017). Embora reconhecido pelas suas propriedades nutricionais diferenciadas e pelo potencial na produção de queijos de alta qualidade, o leite de ovelha ainda enfrenta limitações no seu consumo em larga escala em algumas regiões do Brasil. A falta de especialização e tecnificação na produção, aliada à ausência de protocolos padronizados em sistemas de pequena escala, representa obstáculos para a plena exploração desse nicho de mercado (Bianchi, 2018). Essa falta de padronização aumenta o risco de contaminação microbiológica, destacando a necessidade premente de regulamentações e práticas mais rigorosas para garantir a segurança e a qualidade do leite ovino. A contaminação bacteriana do leite, tanto de forma endógena quanto exógena, é uma preocupação central (Fusco *et al.*, 2020). Nesse contexto, a higiene no manejo de ordenha e o controle das condições sanitárias emergem como fatores cruciais que influenciam diretamente a qualidade do produto.

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, afirma que alimentos manuseados após o cozimento, representam um maior risco de causar intoxicação alimentar, pois esses alimentos podem conter enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus* sp., sem apresentar qualquer alteração perceptível no sabor ou na aparência, o que torna os consumidores mais suscetíveis à contaminação (CDC, 2023). Além do potencial de causar intoxicação alimentar, há uma preocupação crescente com a presença de cepas de *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRSA), comumente encontradas em animais de produção e, conseqüentemente, nos alimentos. Essa situação pode agravar os casos de intoxicação alimentar e contribuir para a disseminação da resistência aos antimicrobianos (EFSA, 2009).

A detecção de microrganismos patogênicos e resistentes a antimicrobianos e produtores de enterotoxinas estafilocócicas em produtos lácteos reforça a importância da implementação de medidas rigorosas de prevenção em toda a cadeia produtiva, visando à segurança alimentar e à proteção da saúde pública.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica do leite ovino cru, com foco na quantificação, isolamento e caracterização fenotípica e

genotípica de *S. aureus*, a partir de amostras coletadas em duas propriedades rurais com produção de ovinos leiteiros na região Oeste de Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas no mês de outubro de 2023 em duas propriedades do Oeste catarinense, localizadas nos municípios de Chapecó e Lageado Grande, ambas com sistema de ordenha mecânica.

4.1.1 Coleta de leite

No dia da coleta realizou-se a aferição da temperatura ambiente, bem como umidade relativa, com auxílio de termohigrômetro. Na propriedade 1, a temperatura era de 20,3°C e a umidade relativa em torno de 81%. Já na propriedade 2 os valores eram de 13,3°C e 77%, respectivamente. A coleta do leite cru foi realizada diretamente na tubulação antes da chegada ao tanque de refrigeração, com aproximadamente 80 mL de leite coletados em frascos estéreis, sendo que cada amostra representava a ordenha coletiva dos animais alojados em uma mesma baia, com número variando entre 12 a 24 ovelhas. Os frascos devidamente identificados foram armazenados sob refrigeração em caixas isotérmicas e transportadas ao Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Imunologia (LABMIM) da UDESC, onde foram avaliados os parâmetros microbiológicos.

4.1.2 Análises de pH

No laboratório, após a homogeneização, realizou-se a análise de pH das amostras de leite ovino com pHmetro marca Alfakit, modelo AT-315, calibrado previamente. Os resultados foram expressos em média.

4.1.3 Análises microbiológicas

As avaliações laboratoriais do leite cru foram conduzidas no dia da coleta, seguindo uma abordagem metódica para minimizar fatores que poderiam influenciar o

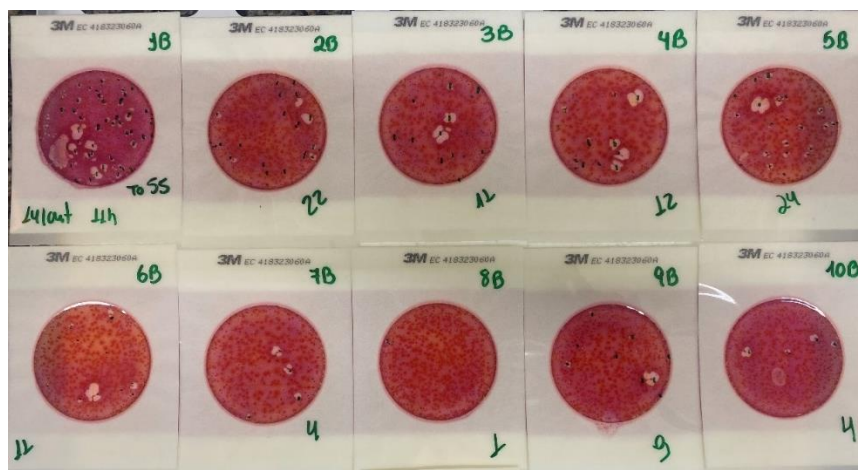
processo. No laboratório os frascos contendo as amostras foram higienizados com solução de álcool 70% e homogeneizadas anteriormente a realização das análises.

Em cada amostra de leite cru foram avaliadas a contagem bacteriana total pela metodologia tradicional e as contagens de *S. aureus*, bolores e leveduras, coliformes totais e termotolerantes, utilizando a metodologia comercial Petrifilm™. As análises de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. seguiram a metodologia padrão-ouro conforme a ISO 6579 e ISO 11290, respectivamente. Para as contagens de *B. cereus*, conforme preconizado nos “Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal” (BRASIL, 2022), seguiu-se a metodologia da ISO 7932:2004.

Na avaliação da Contagem Bacteriana Total empregando o meio de cultura PCA (Plate Count Agar), de acordo com a metodologia ISO 4833-1:2015. O procedimento de diluição do leite cru em BPW (água peptonada tamponada). As diluições de 1:10 e 1:100 foram realizadas, e posteriormente, 1000 µL de cada diluição foram distribuídos em placas, utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade (*pour plate*). As placas foram incubadas de forma invertida em estufa a 37°C por um período de 48 horas. Após o ciclo de incubação, procedeu-se à contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) presentes nas placas de ambas as diluições, de acordo com a ISO 14661:2005 e o resultado expresso em UFC/mL.

Para as análises de Coliformes Totais e coliformes termotolerantes (EC) (Figura 3), *S. aureus* (STX) e Bolores e leveduras (YM), utilizou-se a técnica de análise microbiológica utilizando Petrifilm™ consiste na utilização de filmes plásticos de ágar prontos para o uso, revestidos com um meio de cultura seletivo e indicador de colônias microbianas. Inicialmente, as amostras foram homogeneizadas, em seguida, 1 mL de leite cru foi inoculado à superfície do filme Petrifilm™, que foi então selado e incubado em condições recomendadas pelo fabricante, permitindo o crescimento microbiano. As colônias resultantes foram contadas e interpretadas de acordo com as características específicas do meio seletivo, facilitando a identificação e enumeração de diferentes tipos de microrganismos presentes na amostra. Para a análise de *S. aureus* após o período de incubação foi adicionado o Disco STX e realizada incubação por mais três horas. Após o período em questão as colônias que apresentaram o desenvolvimento de uma zona de coloração rosada foram contadas.

Figura 3: Contagem de coliformes totais e termotolerantes



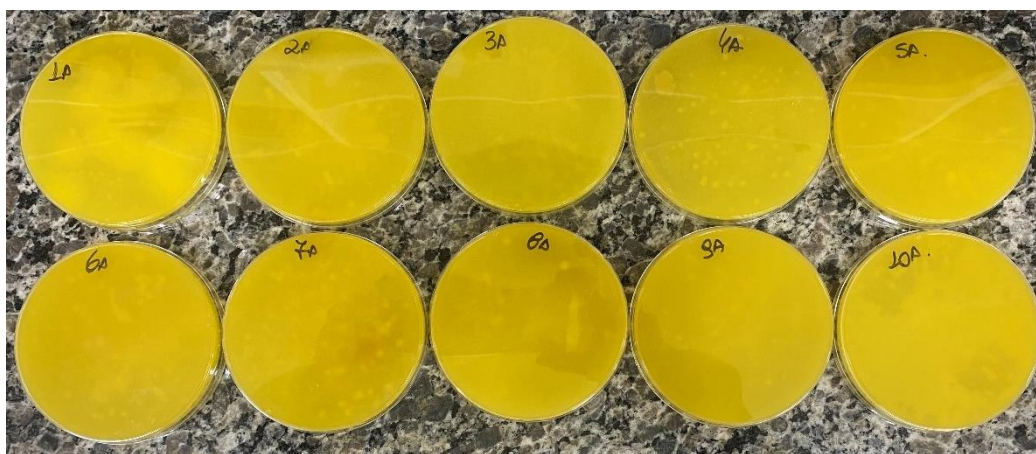
Fonte: da autora

A metodologia adaptada da norma ISO 6579 para detecção de *Salmonella* envolveu etapas subsequentes. Após a incubação em BPW por 18-24 horas à 37°C, as amostras foram submetidas a um enriquecimento em meio seletivo, Caldo Rappaport-Vassiliadis (RVS), sendo incubadas a 42°C por 18-24 horas, permitindo o crescimento seletivo de *Salmonella* sp. Após o enriquecimento, as culturas foram transferidas para o meio de isolamento Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), e incubadas a 37°C por 24 horas para a diferenciação e seleção de colônias suspeitas. As colônias suspeitas foram posteriormente submetidas a testes bioquímicos e sorológicos para confirmação da presença de *Salmonella* sp., com o uso de meios como Ágar Triptofano Lisina e testes de aglutinação. O procedimento segue critérios estritos para confirmação, baseando-se na morfologia das colônias, reações bioquímicas e características sorológicas, garantindo a precisão e confiabilidade na detecção do patógeno.

A metodologia de detecção de *L. monocytogenes*, conforme a norma ISO 11290, também segue um protocolo específico. Inicialmente, a amostra foi submetida a um enriquecimento em meios seletivos, como o Caldo Half Fraser e Caldo Fraser, e incubada a 30°C por 24 horas, possibilitando o crescimento seletivo do patógeno. Após esse período, a cultura foi transferida para meios de isolamento, como Ágar ALOA (Agar *Listeria* Ottaviani Agosti) e Ágar Palcam, sendo incubada a 37°C por 48 horas, permitindo a diferenciação e seleção de colônias suspeitas. Estas colônias suspeitas passaram por testes bioquímicos e sorológicos para confirmação de *L. monocytogenes*, incluindo testes de hemólise, catalase, entre outros.

Para a contagem de *B. cereus* seguiu-se a ISO 7932:2014, onde 0,1 mL de leite cru de cada uma das amostras foi inoculada na superfície do meio seletivo Ágar de Manitol Yolk Polimixina (MYP), conforme Figura 4 e espalhadas uniformemente com uso de uma alça de *Drigalski*. As placas foram incubadas a uma temperatura de 30°C por um período de 48 horas. Após o período de incubação, as colônias típicas de *B. cereus* foram contadas e seguiram para a etapa de confirmação em ágar Sangue, incubado por 24 horas a 30°C. Com base na contagem de colônias e nas diluições utilizadas foram calculadas as concentrações de *B. cereus* nas amostras, expressas em UFC/mL.

Figura 4: Agár MYP para contagem de *B. cereus*



Fonte: da autora

Em uma placa de Ágar Sangue foram adicionados 100µl de leite cru, e com auxílio de uma alça de *Drigalski* a amostra foi espalhada sobre a placa. O ágar sangue foi incubado a 37°C por 24 horas, posterior foi realizado a contagem e a caracterização quanto coloração, morfologia, aspecto e tamanho das colônias crescidas, além da presença ou ausência de hemólise. As colônias suspeitas de lactobacilos isoladas em Ágar Sangue, foram repicadas para BHI que foi incubado por 24 horas a 37°C, posteriormente 1 mL desse caldo foi inoculado em uma placa com adição por *pour plate* de ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS). As placas foram então incubadas em jarras de anaerobiose por 48 horas a 37°C. Após a incubação, as colônias foram contadas e submetidas às provas de catalase e coloração de Gram.

4.1.4 *S. aureus* em leite ovino

Os isolados bacterianos previamente identificados como *S. aureus* no *Petrifilm* STX, foram armazenados com o uso da técnica de congelamento convencional. Essa técnica consiste na preservação dos agentes microbiológicos em ágar triptona de soja (TSA) adicionado de glicerol, por meio do congelamento a -20°C. Posteriormente, as cepas preservadas foram reativadas e submetidas à confirmação microscópica por meio da coloração de Gram, testes de catalase e coagulase.

4.1.4.1 *Coloração de Gram*

A coloração de Gram, desenvolvida por Christian Gram em 1884, é um método de coloração diferencial fundamental para a microbiologia, permitindo a distinção entre os dois principais grupos de bactérias: Gram-positivas e Gram-negativas. Essa diferenciação baseia-se nas propriedades físico-químicas da PC bacteriana, que impactam na retenção do corante cristal violeta durante o processo de coloração (Prescott *et al.*, 2018).

As bactérias Gram-positivas, como os estafilococos apresentam uma estrutura complexa em sua PC, que é composta por peptidoglicano, ácidos teicóicos e outros componentes. O peptidoglicano é um polímero rígido e poroso que permite a retenção do cristal violeta durante a coloração (Jawetz; Melnick e Adelberg, 2022). Essa retenção resulta na cor violeta característica das células Gram-positivas após a aplicação de lugol como mordente e a subsequente descoloração com álcool-acetona (Tortora *et al.*, 2019).

4.1.4.2 *Teste de catalase*

Para conduzir o teste de catalase, uma alíquota proveniente do TSA com adição de glicerol foi transferida para uma placa de TSA e incubada *overnight* a temperatura de 37°C. Posteriormente, uma pequena quantidade de colônia bacteriana foi transferida para uma lâmina de vidro. A seguir, uma gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% foi adicionada à colônia na lâmina, e a reação observada (Zurita; Mejía e Guzmán-Blanco, 2010). A interpretação dos resultados baseou-se na presença ou ausência de efervescência. Cepas catalase-positiva apresentaram efervescência resultante da liberação de oxigênio, indicando a atividade da enzima catalase.

4.1.4.3 Teste de coagulase

Para confirmação adicional dos isolados do Petrifilm STX, realizou-se o teste de coagulase, onde uma alíquota proveniente do meio de cultura TSA com adição de glicerol foi transferida para o caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubada *overnight* a temperatura de 37°C. Em seguida, foram adicionados 0,1 mL da suspensão bacteriana ao tubo de ensaio, juntamente com 0,3 mL de plasma de coelho reidratado (Laborclin). Procedeu-se a uma nova incubação *overnight* a 37°C, durante a qual a formação de coágulos foi observada como indicativo da presença da enzima coagulase produzida por *S. aureus* (Zurita; Mejía e Guzmán-Blanco, 2010). Como controle positivo utilizou-se a cepa padrão ATCC 25923. A ausência de coágulos foi interpretada como um resultado negativo para o teste, sugerindo a inexistência da enzima coagulase no isolado em análise. Esse resultado contribui para a caracterização fenotípica da cepa.

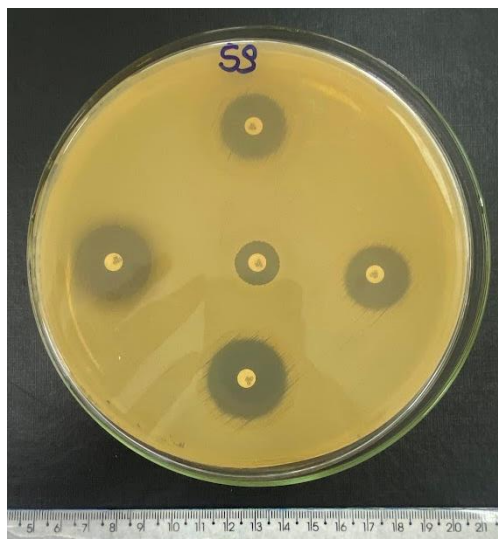
4.1.4.4 Perfil de sensibilidade antimicrobiana

O teste foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Instituto SENAI de Alimentos e Bebidas em Chapecó-SC. O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de *S. aureus* isoladas foi determinada por meio da metodologia aprovada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003) que consta na IN M-2 A-8 de Padronização dos Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos por Disco-difusão.

Foram testados 27 isolados de *S. aureus* provenientes de 12 amostras (P1= 4, P2=8), frente a dez antibióticos com diferentes mecanismos de ação, sendo eles: cloranfenicol (30µg), eritromicina (15µg), linezolida (10µg), oxacilina (1µg), vancomicina (30µg), penicilina G (10µg) e cefoxitina (30µg) (Laborclin), gentamicina (10µg) (Cecon), amoxicilina + ácido clavulânico (30µg) e clindamicina (2µg) (Sensifar). Uma suspensão bacteriana foi diluída para padrões de turbidez de MacFarland de 0,5 e inoculadas, com auxílio de *swab*, na superfície de MHA (Kasvi) Após 20 horas de incubação à 35±2°C as placas MHA (ágar Muller-Hinton) foram submetidas a leitura do teste quanto a presença de um halo de inibição de crescimento bacteriano com o auxílio de uma régua (Figura 5) e foram classificados de acordo com padrões descritos pelo CLSI (2020), de acordo com a Tabela 2, classificando os isolados de *S. aureus* em sensíveis ou resistentes, sendo que as amostras que apresentaram perfil intermediário foram

consideradas sensíveis (ANVISA, 2003). Para a detecção fenotípica do MRSA, utilizou-se a mesma metodologia com adição de 4% de NaCl no MHA, conforme recomendado pelo guia. Utilizou-se uma cepa *S. aureus* ATCC® 25923 como controle.

Figura 5: Leitura do perfil de sensibilidade antimicrobiana



Fonte: da autora

Tabela 2: Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro dos antimicrobianos utilizados

Classe	Antimicrobiano	Zona de Inibição (mm)		
		Resistente	Intermediário	Sensível
Penicilinas	Amoxicilina + clavulonato	≥ 29	-	≤ 28
	Penicilina G	≥ 28	-	≤ 29
	Oxacilina	≥ 17	-	≤ 18
Oxazolidinonas	Linezolida	≥ 20	-	≤ 21
Glicosídeos	Vancomicina	≥ 21	-	≤ 17
Aminoglicosídeo	Gentamicina	≥ 12	13-14	≤ 15
Fenicóis	Cloranfenicol	≥ 12	13-17	≤ 18
Macrolídeos	Eritromicina	≥ 13	14-22	≤ 23
Lincosamidas	Clindamicina	≥ 14	15-20	≤ 21
Cefalosporinas	Cefoxitina	≥ 22	-	≤ 21

Fonte: CLSI (2020).

4.1.4.5 Extração de DNA do *S. aureus*

As colônias de *S. aureus* obtidas em BP foram suspensas em 200 µL de PBS (Phosphate-Buffered Saline) 1X e homogeneizadas em um vórtex até a diluição completa. A extração do DNA foi realizada utilizando o kit DNeasy Powersoil Pro (Qiagen, Hilden, Alemanha). De acordo com as instruções do fabricante, as colônias de *S. aureus* foram lisadas em 180 µL de tampão de lise composto por lisozima 20 mg/mL por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5000g por 10 minutos para concentrar as bactérias. O pellet obtido foi suspenso em 180 µL de lisozima (20 mg/mL) e incubado a 37°C por 30 minutos. Em seguida, 20 µL de proteinase K e 800 µL da solução CD1 foram adicionados. As amostras foram agitadas em vórtex horizontal por 7 minutos. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas a 15000g por 1 minuto para separar o sobrenadante. Aproximadamente 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo de 2 mL e incubados a 56°C por 30 minutos, seguido de uma incubação a 95°C por 15 minutos. Depois, as amostras foram novamente centrifugadas por 30 segundos a 15000g. Para a purificação do DNA, foram adicionados 200 µL de CD2 às amostras, seguidos de uma agitação rápida em vórtex por 5 segundos. As amostras foram centrifugadas a 15000g por 1 minuto, e o sobrenadante (aproximadamente 700 µL) foi transferido para um novo microtubo. Para precipitar o DNA, foram adicionados 600 µL de CD3, seguidos de agitação em vórtex por 5 segundos. Em seguida, 650 µL do lisado foram transferidos para uma coluna MB Spin, onde ocorreu a separação do DNA por centrifugação. Após a centrifugação por 1 minuto a 15000g, o fluxo foi descartado e o restante do lisado foi transferido para a coluna MB Spin para uma segunda centrifugação. A coluna foi então colocada em um novo tubo de coleta de 2 ml e lavada com 500 µL de EA, seguida de centrifugação por 1 minuto a 15000g. Outra lavagem foi realizada com 500 µL de C5, seguida de centrifugação por 1 minuto a 15000g. Uma centrifugação final de 2 minutos a 16000G foi realizada para secar a coluna. Finalmente, a coluna foi transferida para um tubo de eluição de 1,5 mL e 50 µL de C6 foram adicionados ao centro da membrana do filtro. Após centrifugação por 1 minuto a 15000g, finalmente, a concentração de DNA da amostra foi medida utilizando plataformas de medição de micro-volume NanoDrop (Thermo Scientific) e armazenada a -20°C.

4.1.4.5.1 Primers utilizados na detecção dos genes codificadores

Foram utilizados quatro pares de *primers* específicos para os alvos desejados, obtidos comercialmente. As sequências dos *primers* são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados no multiplex PCR

Gene	Primer	Sequência (5'-3')	Tamanho (bp)	Referência
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> f	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533	Murakami <i>et al.</i> (1991)
	<i>mecA</i> r	AGTTCTGGCACTACCGGATTTTGC		
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> f	CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA	1030	Clark <i>et al.</i> (1993)
	<i>vanA</i> r	CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA		
<i>Sea</i>	<i>sea</i> f	GGAGTTGGATCTTCAAGCAAGAC	86	Karimzadeh e Ghassab (2022)
	<i>sea</i> r	CCCTCTGAACCTTCCCATCAA		
<i>See</i>	<i>see</i> f	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC	209	Mehrotra <i>et al.</i> (2000)
	<i>see</i> r	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC		

4.1.4.5.2 Preparo de solução dos *primers*

Posterior ao recebimento dos *primers* conforme orientação do fabricante, em uma cabine de fluxo laminar, adicionou-se 430 µL água ultrapura diretamente ao tubo contendo os *primers* liofilizados, seguido de agitação com vórtex e hidratação por 10 minutos até a completa dissolução. A solução de estoque, preparada a uma concentração de 100 µM foi então aliqüotada em volume de 20 µL e adicionada de 180 µL de água ultrapura, para formar então a solução de trabalho. Essas alíquotas foram armazenadas a -20°C para preservação a longo prazo.

4.1.4.5.3 Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada de acordo com as instruções do fabricante em um volume final de 25 µL contendo 4,85 µL de 1X Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase, 0,2 µM de cada *primer*, 4 µL de DNA template, e água ultrapura q.s.p (Invitrogen, 2015). As amostras foram agrupadas em *pool* de três isolados.

As condições térmicas da PCR levaram em consideração a literatura citada na Tabela 4, as condições foram otimizadas e realizadas em termociclador QIAamplifier 96 (Quiagen), seguindo os protocolos abaixo:

Tabela 4: Reações duplex

Ciclagem dos genes PCR duplex					
Ciclos	Etapa	<i>sea e see</i>		<i>mecA e vanA</i>	
		Temp. (°C)	Tempo	Temp. (°C)	Tempo
1 x	Desnaturação Inicial	94	120 s	94	2 min
	Desnaturação	94	30 s	94	40 s
35 x	Anelamento	60	40 s	58	40 s
	Extensão	72	20 s	72	90 s
1 x	Extensão final	72	120 s	72	5 min
-	Hold	8	∞	8	∞

4.1.4.6 Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em gel de agarose 1% (genes *sea* e *see*) e 2% (genes *mecA* e *vanA*). Preparou-se o gel utilizando agarose (LW Biotec) dissolvida em tampão TAE 1X, aquecido e resfriado até aproximadamente 50°C, seguido da adição de 20 µL do corante GelRed®. Foram carregados 10 µL do produto PCR misturado com 5 µL de tampão de carga (Ludwig) em cada poço do gel. Em um poço separado, foram carregados 10 µL do marcador ladder (Ludwig) misturado a 5 µL de tampão de carga. A corrida deu-se por 120 minutos. E a visualização em um transluminador de luz ultravioleta (Loccus).

4.1.5 Análise estatística

Os dados foram avaliados por meio do teste Shapiro-Wilk. Em seguida, para comparar as médias das duas propriedades, utilizou-se o teste T de Student para amostras independentes. Foram considerados significativos os valores de p menores que 0.05 ($p < 0.05$). Utilizou-se o instrumento computacional do *Software Excel*.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Análises laboratoriais

4.2.1.1 Análise de pH

Na análise de pH não houve diferença significativa para os valores médios das duas propriedades (Tabela 5), contrapondo com Nespolo. *et al.* (2024) que ao avaliar diferentes propriedades encontrou valores heterogêneos.

Tabela 5: Valores médios e desvio-padrão das análises de pH

Parâmetros físico-químicos	
	pH
P1 (n=10)	6,56±0,05 ^a
P2 (n=10)	6,52±0,13 ^a

*Os valores são médias de pH ± DP. a,b Médias dentro de uma coluna com diferentes sobrescritos minúsculos diferem (p < 0,05).

O pH do leite ovino é um parâmetro fundamental na avaliação da sua qualidade e estabilidade, influenciando diretamente os processos como a coagulação e a produção de derivados lácteos, em termos industriais (Fava *et al.*, 2014).

Em geral, o pH do leite de ovelha varia entre 6,4 e 6,8, sendo ligeiramente mais ácido do que o leite de vaca (Papa *et al.*, 2021). Esta ligeira acidez pode ser atribuída à composição específica do leite ovino, que possui uma maior concentração de ácidos graxos de cadeia curta e média, além de uma elevada quantidade de proteínas, especialmente a caseína. A monitoração constante do pH é essencial, pois variações significativas podem indicar contaminação microbiana ou alterações fisiológicas no animal, afetando a qualidade do leite e seus derivados)

4.2.1.2 Análises microbiológicas

Os resultados revelaram ausência dos patógenos *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. nas amostras avaliadas, assim como *E. coli* não foi detectada (Tabela 6). A ausência destes é um resultado positivo em termos de segurança alimentar e saúde pública. Entre os fatores que podem ter contribuído para a ausência, pode-se citar as boas práticas de higiene durante a ordenha e manipulação do leite, a sanitização dos equipamentos, o uso de água potável e a correta refrigeração das amostras. No entanto, é importante destacar que, apesar da refrigeração ser eficaz contra *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* é capaz de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, o que representa um desafio adicional para a segurança microbiológica do leite (Kasalica *et al.* 2011).

O controle eficaz de doenças em ovinos, como a listeriose e a salmonelose, desempenha um papel importante na redução da contaminação do leite por esses patógenos. Gonzales-Barron *et al.* (2017), ao conduzirem um estudo de metanálise para avaliar a microbiologia do leite de ovelha e de cabra, observaram que entre os patógenos encontrados, *Salmonella* sp. apresentou a menor incidência geral, tanto no leite cru de ovelha (1,37%) quanto no leite cru de cabra (2,36%). Este achado corrobora com a afirmação de Klinger e Rosenthal (1997) de que o maior teor de gordura no leite de ovelha, em comparação com o leite de vaca e de cabra, pode conferir um efeito protetor contra bactérias Gram-negativas.

Em um nível significativamente mais alto de contaminação, está a bactéria Gram positiva *L. monocytogenes* no leite cru tanto de origem ovina (3,56%) quanto caprina (2,92%). Presume-se que a contaminação do leite de cabra e de ovelha com *Listeria* sp. ocorre pelas mesmas rotas de contaminação do leite de vaca, ou seja, através de alimentos como a silagem, contaminação cruzada de alimentos por material fecal, cama de má qualidade, equipamentos de ordenha contaminados ou infecção por mastite por *Listeria* sp. (Klinger e Rosenthal, 1997). A infecção da glândula mamária por *L. monocytogenes* é mais prevalente em ovelhas do que em vacas e ovelhas que sofrem de mastite listeriana podem contaminar o leite por longos períodos, mesmo sem apresentar sinais clínicos, resultando na contaminação de toda a cadeia de produção de leite e do ambiente de processamento (Osman *et al.* 2014).

Tabela 6: Valores médios e desvio-padrão das análises microbiológicas

	Parâmetros microbiológicos								
	LMO	SLM	SA	EC	TOT	MES	BCR	BOL	LAT
P1 (n=10)	ND	ND	1,1±14,0 ^a	ND	70,9±64,0 ^a	38620±74709,0 ^a	ND	30,3±11,9 ^a	362 ±232,1 ^a
P2 (n=10)	ND	ND	7,4±10,0 ^a	ND	15,3±15,0 ^b	3540±1480,4 ^a	ND	14,9±03,7 ^b	213±194,8 ^a

*Os valores são médias log₁₀ UFC/cm² ± DP. ^{a,b} Médias dentro de uma coluna com diferentes sobrescritos minúsculos diferem (p < 0,05). SLM: detecção de *Salmonella* sp. LMO: detecção de *L. monocytogenes*. SA: contagem de *S. aureus*. EC: Contagem de *E. coli*. TOT: contagem de coliformes totais. MES: contagem de bactérias mesófilas. BCR: contagem de *B. cereus*. BOL: Contagem de bolores e leveduras. LAT. Contagem de bactérias lácticas. ND: não detectado.

Apesar de haver contagem de *B. cereus* em ambas as propriedades, estas foram mínimas, abaixo do nível de confiança do método, de acordo com a ISO 6278:2019. Ao estudarem a multiplicação de *B. cereus* e a produção de enterotoxinas em leite de diferentes espécies submetidas a diferentes temperaturas, Necidová *et al.* (2014) constataram que, em contraste com o leite de vaca cru, *B. cereus* se multiplicou no leite cru de ovelha e cabra a 8 °C dentro das primeiras 24 horas, com sua contagem mostrando apenas uma leve tendência de queda durante todo o período de armazenamento; neste caso, a produção de toxinas não foi detectada. No leite de cabra cru em temperaturas mais altas, a microbiota competitiva natural e a diminuição do pH inibiram rapidamente o crescimento de *B. cereus*. O aumento inicial acentuado das contagens de *B. cereus* a 22°C foi alto o suficiente para produzir enterotoxinas. O aumento na contagem de *B. cereus* no leite de ovelha foi consideravelmente maior a 22°C do que a 15°C, mas o oposto foi verdadeiro tanto para o leite de cabra quanto para o de vaca. Uma possível explicação para esse fenômeno poderia ser uma composição diferente da microbiota natural do leite de ovelha e uma queda de pH mais lenta que pode ter sido influenciada pela atividade proteolítica de *B. cereus*. Os resultados indicaram que, entre as espécies avaliadas, o leite de ovelha é o melhor substrato para a multiplicação de *B. cereus*, onde toxinas podem ser produzidas se a temperatura de armazenamento for mais alta.

Em relação a contagem de mesófilos, que pode ser considerada a Contagem Padrão em Placas, ambas as propriedades estão de acordo com as diretrizes da IN 76 (Brasil, 2018) e não há diferença significativa entre as propriedades, o que provavelmente está ligado as boas condições de manejo e manipulação.

No que diz respeito à microbiota láctica Medina *et al.* (2011), ao analisarem BAL presentes no leite cru de ovelhas, observaram a predominância do gênero *Enterococcus*, representando 48% das espécies identificadas, seguido por *Lactocaseibacillus casei* e

Lactiplantibacillus plantarum, cada um com 30%, e *Lactococcus* sp. (14%) e *Leuconostoc* sp. (8%). Essas bactérias podem ter origens diversas, incluindo o próprio leite. Acurcio (2011), em Minas Gerais, também detectou a presença do gênero *Enterococcus* no leite de ovelhas das raças Lacaune, Santa Inês e mestiças, com predominância de *E. faecium*, *E. durans* e *E. casseliflavus*, e ausência de desenvolvimento dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* ou *Streptococcus*. Meira *et al.* (2012), em estudo realizado no Sul do Brasil, relataram a atividade inibitória de bactérias ácido-láticas isoladas de leite e queijo de ovelha contra patógenos como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *Salmonella* sp., associando esse efeito à produção de ácidos orgânicos por essas bactérias.

As diferenças significativas para as contagens de coliformes totais, bolores e leveduras corroboram com os achados de Endres *et al.* (2021), que ao avaliar amostras de leite cru de três rebanhos Lacaune no sul do Brasil, identificaram uma grande diversidade microbiana. Os autores sugerem que essa diversidade pode estar associada às condições ambientais, dieta e genética dos animais. Além disso, gêneros como *Staphylococcus* sp. podem estar relacionados ao processo de resfriamento ineficiente ou contaminação. Deste modo, as variações na diversidade das amostras de leite de diferentes propriedades podem refletir as diferenças encontrada na aplicação do questionário que evidenciou a adoção de diferentes práticas na condução da atividade (Araújo *et al.*, 2024).

4.2.2 Isolamento de *S. aureus* em leite ovino

Das 12 amostras (P1=4; P2=8) que apresentaram crescimento de *S. aureus*, foram selecionados 27 isolados para testes posteriores. Este é um patógeno importante em pequenos ruminantes leiteiros, sendo responsável pela maioria dos casos de infecção intramamária clínica em ovelhas (Marogna *et al.*, 2010; Dore *et al.*, 2016). Em rebanhos de ovelhas leiteiras, infecções mamárias têm uma clara importância financeira (Selvaggi, D'Alessandro e Dario, 2017), devido à redução na produção de leite, à degradação da qualidade do leite e ao descarte do leite consequente à administração de antibióticos.

Pesquisas esclareceram várias facetas de sua patogenicidade para a glândula mamária das ovelhas. Parte desse conhecimento tem se baseado em trabalhos realizados em bovinos. No entanto, a situação entre bovinos e ovinos difere significativamente, não apenas em termos de diferenças entre as espécies animais, mas em relação às práticas de

manejo nas respectivas indústrias. No contexto da mastite ovina, ainda existem áreas que não foram totalmente esclarecidas, enquanto novas perguntas surgem a partir dos achados de trabalhos recentes (Vasileiou *et al.*, 2019).

Estudos, como o realizado por Vasileiou *et al.* (2019), evidenciam a prevalência e o impacto negativo de *S. aureus* em rebanhos ovinos, destacando sua associação com casos crônicos de mastite e a redução na qualidade e quantidade do leite produzido. Estratégias de manejo e controle eficazes demandam uma compreensão aprofundada da epidemiologia e dos fatores de virulência do *S. aureus* em rebanhos ovinos, ressaltando a importância de práticas preventivas para preservar a saúde mamária e a produtividade desses animais.

Para prevenir a mastite e a mitigação de sua disseminação, é essencial garantir condições adequadas de criação e saúde animal, por meio da implementação de boas práticas de manejo na fazenda e da aplicação de medidas de biossegurança apropriadas (Azara *et al.*, 2023).

4.2.2.1 Coagulase

Das 12 amostras testadas para coagulase todas (100%) apresentaram positividade, confirmando o correto isolamento no Petrifilm. A coagulase positiva é frequentemente associada a cepas patogênicas de estafilococos, implicando em uma maior propensão para causar infecções invasivas (Silva, 2021). Por essa razão, o teste de coagulase é um método crucial no diagnóstico laboratorial para identificar *S. aureus* em amostras clínicas e distinguir entre cepas patogênicas e não patogênicas.

4.2.2.2 Teste de disco-difusão

A análise de 27 isolados bacterianos (provenientes de 12 amostras) em relação a distintos antibióticos proporcionou uma visão da suscetibilidade desses microrganismos a uma ampla gama de agentes antimicrobianos.

A partir do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, realizado com os 27 isolados bacterianos provenientes de 12 amostras, observou-se resistência geral de 83,3% para os antimicrobianos testados (10/12), ou seja, todos os isolados apresentaram-se

resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos. Os resultados revelaram que 75% das amostras (9/12) apresentaram resistência à vancomicina. Além disso, foi observada resistência à penicilina em uma das amostras (8,3%), outro isolado demonstrou resistência à oxacilina (8,3%), sendo que o isolado resistente à oxacilina também exibiu resistência à penicilina., o que pode ser justificado por esta ser preditor de resistência aos betalactâmicos.

Embora os isolados tenham sido suscetíveis a maioria dos fármacos testados é importante ressaltar que a ausência da expressão fenotípica de resistência em relação aos antibióticos não deve ser subestimada, já que de acordo com Pelisser *et al.* (2009) a presença do gene não implica, necessariamente, na sua expressão. Esses resultados podem sugerir tanto a eficácia dos antibióticos testados quanto a necessidade de continuar monitorando e avaliando a resistência bacteriana em diferentes contextos ambientais. Pois a resistência do *S. aureus* pode ser mediada por uma variedade de mecanismos genéticos, incluindo a presença de genes de resistência que podem não ser expressos ou detectados em testes fenotípicos (Dumitrescu *et al.*, 2010). Portanto, embora os resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana fenotípica sejam fundamentais, eles devem ser complementados por análises genotípicas para uma avaliação completa da RAM.

Os isolados apresentaram resistência significativa frente à vancomicina (75,0%) em termos de resistência. A ANVISA (2022), em seu último Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade dos Serviços de Saúde do Brasil, indicou uma incidência alarmante de MRSA em circulação em UTIs adultas, pediátricas e neonatais. Os dados de Santa Catarina revelaram que no ano em questão, nas UTIs adultas, 53,7% das cepas eram resistentes à oxacilina, enquanto 6,5% apresentavam resistência à vancomicina.

Estes números refletem um preocupante cenário de saúde pública, com implicações para os tratamentos de infecções nosocomiais. A alta prevalência de cepas resistentes à oxacilina e à vancomicina em ambientes hospitalares sugere uma pressão seletiva intensa. Pacientes internados em UTIs geralmente possuem condições imunológicas comprometidas devido a condições subjacentes e comorbidades. Essas condições não apenas aumentam a susceptibilidade às infecções, mas também dificultam a resposta imunológica adequada, exacerbando a propagação de patógenos resistentes (Santos *et al.*, 2021).

A resistência à oxacilina, observada em mais da metade das cepas em Santa Catarina, restringe as opções de tratamento, obrigando o uso de antibióticos de última

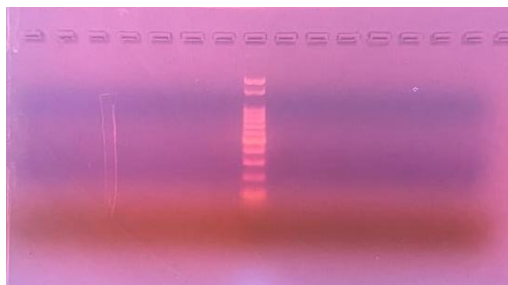
linha, como a vancomicina. No entanto, a resistência à vancomicina, embora menor, ainda é preocupante (6,5%) (ANVISA, 2022), pois indica a possibilidade de surgimento de cepas multirresistentes contra as quais poucas ou nenhuma alternativa terapêutica eficaz está disponível. O nível de resistência à vancomicina (75,0%) encontrados neste estudo nos faz refletir sobre a produção animal e a saúde pública sob a perspectiva do conceito *One Health*, que reconhece a interconexão entre a saúde humana, animal e ambiental. A necessidade de políticas rigorosas de controle de infecções, uso racional de antibióticos é evidente, assim como a importância de programas de vigilância e educação para produtores e profissionais envolvidos na produção animal. Investir em acesso à informação e capacitação desses profissionais é crucial para garantir a sanidade dos rebanhos e a qualidade microbiológica do leite obtido, contribuindo para a redução da resistência antimicrobiana e a promoção de uma saúde pública sustentável.

4.2.3 Detecção molecular de genes de resistência

Os genes *mecA* e *vanA* não foram identificados nas amostras analisadas (Figura 6). Embora o gene *mecA* seja o mais comum para a codificação de proteínas de ligação à penicilina, a detecção de um novo gene *mec* foi recentemente relatada. O gene *mecC* foi identificado tanto em *S. aureus* quanto em estafilococos coagulase-negativos em amostras de origem animal e ambiental. Além disso, dois genes *mec* menos frequentes, *mecB* e *mecD*, foram descritos, ambos inicialmente detectados em *Macrococcus caseolyticus*, sendo que o gene *mecB* foi recentemente identificado também em *S. aureus* (Silva *et al.*, 2023).

Quanto ao gene de resistência à vancomicina, é importante considerar que a resistência a tal antibiótico pode ser mediada por outros genes além do *vanA*, incluindo *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanF* e *vanG*, ainda que entre estes, destacam-se as estirpes portadoras dos genes *vanA* e *vanB*, que têm a mais alta prevalência clínica (Ahmed e Baptiste, 2018).

Figura 6: PCR duplex genes *mecA* e *vanA*



Fonte: da autora

Akgül *et al.* (2021) testaram a presença de *vanA* em 78 cepas de *S. aureus* isoladas de cuidadores de ovelhas e dos animais, não encontrando em nenhuma amostra. A resistência à vancomicina parece ser multifatorial, de modo que a ausência dos genes *vanA* e *vanB* indica que a resistência pode ser resultado do espessamento da PC, esse mecanismo permite que uma subpopulação de células sobreviva na presença do antibiótico, levando ao desenvolvimento de resistência intermediária dos isolados (Shariati *et al.* 2020). Yilmaz e Seker (2002), ao avaliarem isolados de *S. aureus* provenientes de leite bovino de 40 propriedades na Turquia, não detectaram os genes *mecA* e *vanA*, resultado semelhante ao de Saidi *et al.* (2022) na Argélia, onde a investigação via PCR também não detectou o gene *vanA* em isolados de mastite bovina. Entretanto, Rahmdel *et al.* (2018) encontraram o gene *mecA* em 86% dos isolados de leite de cabra e ovelha, mas não detectaram o gene *vanA*.

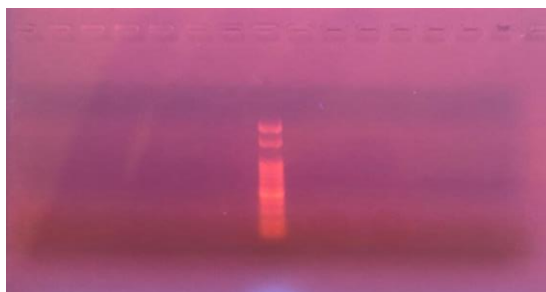
Em um estudo realizado na região central da Itália, a presença do gene *mecA* foi detectada em 4 amostras, revelando que apenas um isolado era coagulase-positivo e pertencente à espécie *S. aureus*, enquanto os outros eram coagulase-negativos e pertenciam ao *S. fleurettii*, com prevalência de MRSA de 1%. A ocorrência do gene *mecA* em estafilococos coagulase-negativos destaca a importância de monitorar essas bactérias que podem atuar como reservatórios de resistência e contribuir para a disseminação de genes de resistência a antibióticos (Turchi, 2024). Em contrapartida, Basanisi *et al.* (2016) não detectaram o gene *mecA* em sua investigação de genes de resistência em leite ovino e caprino. Vale citar que no Iraque, Fajer (2023) conduziu um estudo sobre a prevalência e caracterização de *S. aureus* isolados de lesões cutâneas em criadores de ovelhas, encontrando uma prevalência de 34,1%, de *mecA* identificado em 40% dos isolados de MRSA. Esses achados reforçam a necessidade de monitoramento contínuo e a

implementação de estratégias de manejo para prevenir a disseminação de cepas resistentes de *S. aureus* em ambientes agropecuários.

4.2.4 Detecção molecular de genes produtores de enterotoxinas

Um dos fatores importantes que determinam a patogenicidade do *S. aureus* é sua capacidade de produzir enterotoxinas (Pashangeh *et al.* 2022). No presente estudo, as amostras testadas para os genes de enterotoxinas "a" e "e" não apresentaram amplificação (Figura 7). Diferentemente, em investigação de genes de SE em leite ovino e caprino conduzida por Basanisi *et al.* (2016) no sul da Itália, foram detectadas uma amostra positiva para *see* (14,3%) e uma amostra positiva para *sea* (14,3%). De modo semelhante, no oeste de Santa Catarina, Endres *et al.* (2023) ao avaliarem amostras de leite ovino cru, detectaram a presença de SE em uma amostra, os autores utilizaram uma metodologia baseada na técnica de Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA), que emprega anticorpos anti-SEs e permite a detecção simultânea de sete sorotipos de SEs (A, B, C1, C2, C3, D e E). Contudo, tal metodologia não permite a identificação individual de qual enterotoxina foi detectada, nem qual a espécie de *Staphylococcus* envolvida. Estudos anteriores indicam que várias cepas de *S. aureus* produzem enterotoxinas, contaminando o leite e seus derivados (Saadat *et al.*, 2014). No entanto, de acordo com Sezer *et al.* (2015), a ausência de amplificação dos genes nas amostras é um achado significativo, considerando a alta prevalência e resistência ambiental das SE, que são conhecidas por resistirem a congelamento, desidratação, cocção e baixos níveis de pH.

Figura 7: PCR duplex – genes *sea* e *see*



Fonte: da autora

Como salientado por Freitas (2022), é importante destacar que a pesquisa por um gene produtor de enterotoxina não confirma necessariamente a ausência da toxina nas

amostras, já que a metodologia utilizada pode não detectar outros tipos de enterotoxinas que não estejam incluídas no escopo do teste. Este cenário foi exemplificado por Asao *et al.*, (2003) que inicialmente detectou *sea* em um surto causado por leite em pó, enquanto em um estudo subsequente realizado por Ikeda *et al.* (2005), utilizando as mesmas amostras, foi identificada também a presença de *seh*.

Conforme Murray; Rosenthal e Pfaller (2020), de 30% a 50% das cepas de *S. aureus* são produtoras de enterotoxinas, de modo que a síntese depende diretamente da expressão de genes codificadores presentes em elementos genéticos móveis, tais como ilhas de patogenicidade, profagos e plasmídeos, além de uma rede de interação de reguladores.

Portanto, a ausência de resultados positivos para as SE testadas nas amostras sugere que, apesar da prevalência de *S. aureus* em ambientes agropecuários, nem todas as cepas possuem potencial associado à produção de SE ou ainda atribuída às limitações metodológicas, como à possibilidade de existência de outras enterotoxinas não incluídas nos testes. Outro ponto a ser considerado é a acentuada variação geográfica na distribuição de cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* em diferentes países, o que sugere que especificidades na epidemiologia de uma cepa podem impedir sua detecção (Larsen *et al.*, 2000; Morandi *et al.*, 2007).

4.3 CONCLUSÃO

As amostras de leite ovino analisadas mostraram ausência de *E.coli*, *B. cereus*, *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*, e estão de acordo com a IN 76 para a contagem padrão em placas, tais resultados são positivos para a segurança dos alimentos e destaca a eficácia das boas práticas implementadas nas propriedades estudadas. Entretanto a presença de *S. aureus* em 60,0%, amostras confirma a necessidade de monitoramento constante do leite ovino. A presença deste patógeno, representa um risco potencial à sanidade do rebanho e à qualidade do leite.

Quanto a resistência fenotípica à vancomicina encontrada nas cepas de *S. aureus* isoladas, esta é preocupante, uma vez que este antibiótico é frequentemente utilizado para tratar infecções por MRSA. A ausência de genes enterotoxinas ou de resistência avaliados sugere que outros mecanismos genéticos podem estar envolvidos na resistência. Isso

ressalta a importância de análises fenotípicas e genotípicas combinadas e mais amplas para uma compreensão adequada da resistência antimicrobiana. Deste modo, recomenda-se a realização de estudos futuros para identificar os mecanismos genéticos subjacentes e desenvolver novas abordagens para monitoramento e controle da resistência antimicrobiana em leite ovino.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado apresentou uma análise sobre a produção de leite ovino em três estados, destacando a diversidade e complexidade da ovinocultura leiteira. As propriedades estudadas exibiram contrastes significativos em termos de tamanho, número de animais, sistemas de produção e tipos de mão de obra empregados, evidenciando uma diversidade de práticas de manejo e níveis de tecnificação.

No que concerne às práticas de manejo higiênico-sanitário e a qualidade microbiológica do leite produzido, os resultados revelaram ausência de patógenos como *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* nas amostras de leite, indicando boas práticas de higiene durante a ordenha e o manuseio do leite. No entanto, a detecção de *S. aureus* em 60,0% das amostras evidencia a necessidade de monitoramento contínuo, dada a potencial ameaça à saúde pública e à qualidade do leite. Já a resistência fenotípica à vancomicina em cepas de *S. aureus* é particularmente preocupante, sugerindo que os mecanismos genéticos de resistência devem ser investigados mais profundamente, uma vez que pode ser causada por diferentes genes.

Deste modo, para estudos futuros, é essencial explorar os mecanismos genéticos subjacentes à resistência antimicrobiana em maior detalhe. Além disso, é recomendável desenvolver e implementar estratégias eficazes de prevenção e controle que integrem abordagens multidisciplinares, envolvendo produtores, pesquisadores e autoridades sanitárias. A adoção da abordagem *One Health* pode ser particularmente benéfica para enfrentar esses desafios, promovendo a saúde humana, animal e ambiental de maneira sustentável e coordenada.

REFERÊNCIAS

- ABCOL (Brasil). **Regulamento técnico de produção identidade e qualidade de leite de ovelha cru**. 2019. Apresentado pela Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Leiteiros, na Reunião da Câmara Técnica Setorial da Ovinocaprinocultura, dia 29 de agosto de 2019, Esteio RS. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/caprilinos-e-ovinos/2019/57a-ro/pedido-de-validacao-rtiq-leite-ovino.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2023.
- ABOLGHAIT, S. K.; FATHI, A. G.; YOUSSEF, F. M.; ALGAMMAL, A. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from chicken meat and giblets often produces staphylococcal enterotoxin B (SEB) in non-refrigerated raw chicken livers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 328, 2020. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108669
- ACURCIO, L. B. **Isolamento, enumeração, identificação molecular e avaliação de propriedades probióticas de bactérias ácido-láticas isoladas de leite de ovelha**. (Dissertação de Mestrado), Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. 2011.
- AHMED, M. O.; BAPTISTE, K. E. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. **Microbial Drug Resistance**, 2018, 24.5: 590-606. doi: 10.1089/mdr.2017.0147
- AKGUL, O.; BORA, G.; GUDUCUOĞLU, H. Investigation of the gene carriage rates for *Staphylococcus aureus*, *mecA*, *vanA* and *nuc* genes in the nasal and milk specimens from the sheep caretakers with sheep. **Large Animal Review**, v. 27, n. 5, p. 259-268, 2021.
- ALBENZIO, M.; FIGLIOLA, L.; CAROPRESE, M.; MARINO, R.; SEVI, A.; SANTILLO, A. Somatic cell count in sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 176, p. 24-30, 2019. doi: 10.1016/j.smallrumres.2019.05.013
- ALBENZIO, M., SANTILLO, A., CAROPRESE, M., RUGGIERI, D., CILIBERTI, M.; SEVI, A. Immune competence of the mammary gland as affected by somatic cell and pathogenic bacteria in ewes with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3877-3887, 2012.
- ALEGBELEYE, O. O.; GUIMARÃES, J. T.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A. S. Hazards of a 'healthy'trend? An appraisal of the risks of raw milk consumption and the potential of novel treatment technologies to serve as alternatives to pasteurization. **Trends in Food Science Technology**, v. 82, p. 148-166, 2018. doi: 10.1016/j.tifs.2018.10.007.
- AMARAL, S. M. B.; ALMEIDA, A. P. F. de; SILVA, F. S. da; SILVA, Y. Y. V.; DAMACENO, M. N. Panorama dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil no período de 2009 a 2019. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar** - ISSN 2675-6218, 2(11), 2021. doi:10.47820/recima21.v2i11.935

AMARANTE, A. F. T. do; RAGOZO, A. M.; DA SILVA, B. F. **Os Parasitas de Ovinos**. Fundação Editora da UNESP, 264 p. 2014. doi: 10.7476/9788568334423

ANVISA. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Difusão**: Norma Aprovada – Oitava Edição, Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. 2003.

ANVISA. **Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde: Avaliação Nacional dos indicadores de IRAS e RM**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/boletins-e-relatorios-das-notificacoes-de-iras-e-outros-eventos-adversos-1/boletins-e-relatorios-das-notificacoes-de-iras-e-outros-eventos-adversos>. Acesso em: 11 jul. 2024.

ANTUNOVIĆ, Z.; MIOČ, B.; KLIR ŠALAVARDIĆ, Ž.; ŠIRIĆ, I.; DRŽAIĆ, V.; ĐIDARA, M.; NOVOSELEC, J. Influence of lactation stages on haematological and biochemical parameters in blood of Lacaune dairy sheep. **Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka**, v. 72, n. 4, p. 261-269, 2022. doi:10.15567/mljekarstvo.2022.0407

AQIB, A. I.; ALSAYEQH, A. F. Vancomycin drug resistance, an emerging threat to animal and public health. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1010728, 2022. doi: 10.3389/fvets.2022.1010728

AQUINO, R. S.; LEMOS, C. G.; ALENCAR, C. A.; SILVA, E. G.; LIMA, R. S.; GOMES, J. A. F.; SILVA, A. F. A realidade da caprinocultura e ovinocultura no semiárido brasileiro: um retrato do sertão do Araripe, Pernambuco. **PubVet**, v. 10, n. 4, p. 271-281, 2016. doi: 10.22256/pubvet.v10n4.271-281

ARAÚJO, L. C. S. R.; MACHADO, Q. L.; MARCELINO, A. H.; LEMES, L. P.; VIDOR, E.; SÁ, R. S. de; NESPOLO, C. R.; ARAUJO, D. N.; STEFANI, L. de C. M. Produção de leite ovino: caracterização das propriedades e do manejo higiênico-sanitário da ordenha. **Observatório de la Economía Latinoamericana**, v. 22, n. 7, p. e5679-e5679, 2024. doi: 10.55905/oelv22n7-084

ARGUDÍN, M. A; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M.R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 1751-1773, 2010. doi: 10.3390/toxins2071751

ASAO, T; KUMEDA Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HAKURI K. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: Estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**. 2003;130: 33–40. doi:10.1017/S0950268802007951

AZARA, E.; FODDAI, A. C.; LONGHEU, C. M.; ADDIS, M. F.; TOLA, S.; Production of recombinant proteins including the B-cell epitopes of autolysin A of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical sheep mastitis and their potential for vaccine development. **Veterinary Research Communications**, p. 1-10, 2023. doi: 10.1007/s11259-023-10121-1

BAKSHI, A.; CHHABRA, S.; KAUR, R. Consumers' Attitudes Toward Functional Foods: A Review. **Current Topics Nutraceutical Research**, v. 18, n. 4, p. 343-348, 2020. doi: 10.37290/ctnr2641-452X.18:343-347

BALSADI, O. **Estrutura, evolução e tendência do mercado de trabalho**. In: BUAINAIN, A. M. e DEDECCA, C. S. (Org.). Emprego e Trabalho na Agricultura Brasileira, Brasília: IICA (série desenvolvimento rural sustentável), v.9, p.95-134, 2008. ISBN:13: 978-92-9039-990-2

BARBERATO-FILHO, S.; BERGAMASCHI C. de C.; DEL FIOL, F. D. S., ANTONIAZZI, F. B.; STIEVANO, J. M.; JUSTO, A. C.; SILVA, M. T. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina nas Américas: Revisão sistemática e metanálise da prevalência na pecuária. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 44, 2020. doi: 10.26633/RPSP.2020.48

BARILLET, F.; MARIE, C.; JACQUIN, M.; LAGRIFFOUL, G.; ASTRUC, J. M. The French Lacaune dairy sheep breed: use in France and abroad in the last 40 years. **Livestock Production Science**, v. 71, n. 1, p. 17-29, 2001. doi: 10.1016/S0301-6226(01)00237-8

BASANISI, M. G.; NOBILI, G., LA BELLA, G.; RUSSO, R.; SPANO, G., NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. **Small Ruminant Research**, v. 135, p. 17-19, 2016. doi: 10.1016/j.smallrumres.2015.12.024

BASTOS, C. P. **Deteção, prevalência e expressão de genes de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos e surtos**. 92 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

BELANCHE, A.; MARTÍN-COLLADO, D.; ROSE, G.; YÁÑEZ-RUIZ, D. R. A multi-stakeholder participatory study identifies the priorities for the sustainability of the small ruminants farming sector in Europe. **Animal**, v. 15, n. 2, p. 100131, 2021. doi: 10.1016/j.animal.2020.100131

BELOTI, V.; RIBERIO JÚNIOR, J. C.; TAMANINE, R.; YAMADA, A. K., CAVALETTI, L.; SHECAIRA, C. L.; SILVA, F. F. D. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema - PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 16, p. 16, 2011

BHATIA, A.; ZAHOR, S. *Staphylococcus aureus* enterotoxins: a review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 1, p. 188-197, 2007.

BIANCHI, A. E. **Avaliação de sistemas produtivos de ovinos leiteiros em diferentes regiões do Brasil**. 176 f. Tese (Doutorado), Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

BIANCHI, A. E. **Caracterização dos sistemas produtivos de ovinos de leite no Brasil**. 2017. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/producao-de-leite/caracterizacao-dos-sistemas-produtivos-de-ovinos-de-leite-no-brasil-102577n.aspx>.

BIANCHI, A. A.; MORAIS, O. R. de. **Ovinocultura de leite no Brasil, desafios, oportunidades e demandas do setor**. 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/caprilos-e-ovinos/anos-antiores/ovinoultura-leiteira-abcol.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2023.

BIANCHI, A. E.; REICHEN, C.; BORGES, L. I.; SANTOS, J. G. R.; RUDEK, L. dos S.; FERNANDES, S. R.; MORAIS, O. R. de; MONTEIRO, A. L. G. Análise estratégica da cadeia produtiva de leite ovino no Brasil: uma abordagem pela metodologia SWOT. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 44, n. 3, p. 971-988, 2023. doi: 10.5433/1679-0359.2023v44n3p971

BOONSIRI, T.; WATANABE, S.; TAN, X. E.; THITIANANPAKORN, K.; NARIMATSU, R.; SASAKI, K.; CUI, L. Identification and characterization of mutations responsible for the β -lactam resistance in oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*. **Scientific Reports**, 10, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-73796-5

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº. 37**, de 31/10/2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. D.O.U. p. 5, Brasília, DF. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº. 76**, de 26/11/2018. D.O.U. p. 9, Brasília, DF. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº. 77**, de 26/11/2018. D.O.U. p.10, Brasília, DF. 2018.

BRASIL. Secretária da Defesa Agropecuária. **Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal**. Brasília, 174p. 2022.

BRITO, M. A.; GONZÁLEZ, F. D.; RIBEIRO, L. A.; CAMPOS, R., LACERDA, L.; BARBOSA, P. R.; BERGMANN, G. Blood and milk composition in dairy ewes from southern Brazil: variations during pregnancy and lactation. **Ciência Rural**, v. 36, p. 942-948, 2006. doi: 10.1590/S0103-84782006000300033

BRITO, A. N. O. Etnomatemática e educação do campo: Interlaces com a prática campesina na região sisaleira. **Revista Educação, Linguagem e Tecnologias** -ISSN 26755718, v. 1, n. 4, p. 205-216, 2022.

BROM, R. D.; JONG, A. de; ENGELN, E.; HEUVELINK, A.; VELLEMA, P. Zoonotic risks of pathogens from sheep and their milk borne transmission. **Small Ruminant Research**, v. 189, p. 106123, 2020. doi: 10.1016/j.smallrumres.2020.106123

BUAINAIN, A. M.; ROMEIRO, A. R.; GUANZIROLI, C. Agricultura familiar e o novo mundo rural. **Sociologias**, p. 312-347, 2003. doi: 10.1590/S1517-45222003000200011

BUGG, T. D. H.; WRIGHT G. D.; DUTKA-MALEN S.; ARTHUR M.; COURVALIN P.; WALSH, C.T. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM 4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins *vanH* and *vanA*. **Biochemistry**, v. 30, n. 43, p. 10408-10415, 1991. doi: 10.1021/bi00107a007

BUSH, K.; BRADFORD, P.A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harb Perspectives in Medicine**, v.6, n.8, p. a025247, 2016. doi: 10.1101/cshperspect.a025247

CAMPOS, Á. S. Á.; SILVA, J. A. F.; VÁSQUEZ, N. F. R. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella spp.* prevalence in bulk tank milk of Colombian herds and associated milking practices. **Veterinary World**, p. 869-881, 2023. doi: 10.14202/vetworld.2023.869-881

CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; AMATISTE, S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. **International Dairy Journal**, v. 42, p. 12 e 15, 2015. doi: 10.1016/j.idairyj.2014.10.009

CARVALHO, I. T. de. **Microbiologia dos Alimentos**. Recife: EDUFRPE, 2010. 84p. ISBN: 978-85-7946-071-5

CASANOVA, N. G.; RUIZ, M. S.; BELLIDO, J. L. M. Mechanisms of resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus*. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 30, p. 391-396, 2017.

CLARK, N. C.; COOKSEY, R. C.; HILL, B. C.; SWENSON, J. M.; TENOVER, F. C. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from US hospitals. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 11, p. 2311-2317, 1993. doi: 10.1128/aac.37.11.2

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE/NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2018.

CONG, Y.; YANG, S.; RAO, X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. **Journal of advanced research**, v. 21, p. 169-176, 2020. doi: 10.1016/j.jare.2019.10.005

CONNEL, S. R.; TRACZ, D. M.; NIERHAUS, K. H.; TAYLOR, D. E. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. **Antimicrobial**

Agents and Chemotherapy, v. 47, p. 3675-3681, 2003. doi: 10.1128/aac.47.12.3675-3681.2003

CONRAD, L. F. **Mastite bovina por *Staphylococcus aureus***: revisão bibliográfica. 2014.

COSTA, C. R. de M. da; FEITOSA, M. L. T.; PESSOA, G. T.; BEZERRA, D. de O., FERRAZ, M. S.; CARVALHO, M. A. M de. Mastite caprina: etiologia e epidemiologia: Revisão de literatura. **PubVet**, v. 7, p. 619-706, 2013. doi: 10.22256/pubvet.v7n8.1530

COSTA, V. M. de M. **Doenças parasitárias em ruminantes no semi-árido e alternativas para o controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos**. (Dissertação de Mestrado), Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus de Patos, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande. 2009

CRUZ, G. R. B.; BARROS, J. R. L. de, SANTOS, D. G. dos; LIMA, A. M. de; SILVA, A. C. R. da Aspectos sanitários na produção de caprinos e ovinos de produtores familiares no Semiárido Paraibano. **Revista Conexão UEPG**, v. 15, n. 2, p. 129-134, 2019. doi: 10.5212/Rev.Conexao.v.15.i2.0001

CUADROS, G. M.; DIBARRAT, J. P. A.; CARRANZA, B. V.; CEDEÑO, C. B.; ORDOÑEZ, V. V. Formadores de biofilme de *Staphylococcus aureus*: sua importância na mastite ovina. **Brazilian Journal Animal Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 4408-4423, 2021. doi: 10.34188/bjaerv4n3-125

DIAS, J.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, A. Ordenha e boas práticas de produção. Pecuária Leiteira na Amazônia. **EMBRAPA**. p.105-130, 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/217359/1/cpafro-18460.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2024.

DÍAZ, L. D.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M. An international regulatory review of food health-related claims in functional food products labeling. **Journal Functional Foods**, v. 68, p. 103896, 2020. doi: 10.1016/j.jff.2020.103896

DORE, S.; LICCARDI, M.; AMATISTE, S.; BERGAGNA, S.; BOLZONI, G.; CALIGIURI, V.; CANNAS, E. A. Survey on small ruminant bacterial mastitis in Italy, 2013-2014. **Small Ruminant Research**, v. 141, p.91-93, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.07.010>

DUMITRESCU, O.; DAUWALDER, O.; BOISSET, S.; REVERDY, M. E.; TRISTAN, A.; VANDENESCH, F. *Staphylococcus aureus* resistance to antibiotics: key points in 2010. **Medecine Sciences: M/S**, v. 26, n. 11, p. 943-949, 2010. doi: 10.1051/medsci/20102611943

EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). **The European Union Summary Report on Trends and**

Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal 2014, v. 12, 312 pp., 2014.

EL-NAGGAR, F. W.; ELSHAER, S. L.; ABDEL-RHMAN, S.; KENAWY, H. I.; HASSAN, R. Detection of Pathogenicity Island-encoding Virulence Genes of *Staphylococcus aureus* Isolated from Various Clinical Sources. **Egyptian Journal of Medical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 19-30, 2023. doi: 10.21608/EJMM.2023.299226

ENDRES, C. M.; CASTRO, Í. M. S.; TREVISOL, L. D.; SEVERO, J. M.; MANN, M. B.; VARELA, A. P. M.; FRAZZON, A. P. G.; MAYER, F. Q.; FRAZZON, J. Molecular characterization of the bacterial communities present in sheep's milk and cheese produced in South Brazilian Region via 16S rRNA gene metabarcoding sequencing. **LWT**, v. 147, 2021. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111579

ENDRES, C. M. **Microbiologia do leite de ovelha e queijos produzidos no sul do Brasil: um estudo sobre a microbiota, qualidade microbiológica e resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus spp.* isolados**. 72 f. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2022.

ENDRES, C. M.; MOREIRA, E.; FREITAS, A. B. de; CASTEL, A. P. D.; GRACIANO, F.; MANN, M. B.; FRAZZON, J. Evaluation of Enterotoxins and Antimicrobial Resistance in Microorganisms Isolated from Raw Sheep Milk and Cheese: Ensuring the Microbiological Safety of These Products in Southern Brazil. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1618, 2023. doi: 10.3390/microorganisms11061618

EER, H.; MA, L.; XIE, X.; MA, J.; MA, X.; YUE, C.; MA, Q.; LIANG, X.; DING, W.; LI, Y. Genetic polymorphism association analysis of SNPs on the species conservation genes of Tan sheep and Hu sheep. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, p. 915-926, 2020. doi: 10.1007/s11250-019-02063-1

ESCOPELLI, K. S.; POLIDORI, C. A.; PINTO, A. T.; SCHMIDT, V. Aceitabilidade e Intenção de Compra de Queijo tipo Pecorino produzido com Leite Ovino. **Higiene Alimentar**, p. 119-122, 2016.

EVANOWSKI, R. L.; KENT, D. J.; WIEDMANN, M.; MARTIN, N. H. Milking time hygiene interventions on dairy farms reduce spore counts in raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 5, p. 4088-4099, 2020. doi: 10.3168/jds.2019-17499

FAJER, Z. B.; AL-EZZY, A. I. A.; AL-ZUHAIIRI, A. H. Molecular prevalence of *MecA* and *Blaz* Genes with phenotypic analysis of Antibiotic Sensitivity Pattern for *S. aureus* Isolated From Dermal lesions of Sheep Breeders In Diyala Governorate–Iraq. **Diyala Journal of Medicine**, v. 25, n. 1, p. 12-26, 2023. doi:10.26505/djm.v25i1.1016

FALASCA, C.; GARCIA, C. A.; SPRESSÃO, R. L.; SANTOS, L. C. R. dos. Infecção parasitária nas diferentes estações do ano das raças Texel e Suffolk das diferentes categorias animais. **Brazilian. Journal Animal. Environ. Reserach.**, v. 6, n. 2, p. 1558-1562, 2023. doi: 10.34188/bjaerv6n2-048

FARIAS, A. C.; DILDA, A.; FERREIRA, M. B.; NESPOLO, C.; ARAUJO, D. N.; STEFANI, L. M. **Ovinocultura Leiteira**: Aspectos produtivos. Indústria de Laticínios, v. 143, p. 73-76, 2020.

FAVA, L.W.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; PINTO, A.T. Evaluation of physico chemical characteristics of fresh, refrigerated and frozen Lacaune ewes' milk. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.66, n.6, p.1924-1930. 2014. doi: 10.1590/1678-7675

FEITOSA, A. C.; SILVA, J. F. M.; RODRIGUES, R. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **Revista Desafios**, v. 04, n. 04, 2017.

FERREIRA, L. R.; ALMEIDA, T. T. de; ANDRETTA, M.; PERIN, L. M.; CAMARGO, A. C.; CARVALHO, A. F. de; NERO, L. A. Further culture-independent characterization of the lactic microbiota of Serro artisanal cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1593-1598, 2022. doi: 10.1007/s42770-022-00778-2

FERREIRA, M. B.; NESPOLO, C. R.; CENTENARO, G. S.; MESSA, S. P.; FARIAS, A. C. da R.; STEFANI, L. M. Innovative dulce de leche made by sheep's milk with and without the addition of sheep's milk cream. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 65-71, 2021. doi: 10.1590/fst.11120

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bad Bug Book**: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Chapter: Patogenic Bacteria. Second ed. 2012.

FIGUEIRA, L. M.; ALVES, N. G.; DA FONSECA, J. F. **Produção de leite ovino: a raça Lacaune**. In: Workshop sobre Produção de Caprinos na Região da Mata Atlântica, 15., 2018, Coronel Pacheco. Anais... Brasília, DF: EMBRAPA, p. 53-68.

FIGUEIREDO, S. C. de. **Importância do nível de escolaridade para os agricultores na gestão da propriedade rural**. Anais I CINTEDI. Campina Grande: Realize Editora. p.16-22, 2014. ISSN: 2359-2915.

FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 836-871, 2001.doi: 10.1128/cmr.14.4.836-871.2001

FOTOU, K.; TZORA, A.; VOIDAROU, C.; ALEXOPOULOS, A.; PLESSAS, S.; AVGERIS, I.; BEZIRTZOGLU, E.; AKRIDA-DEMERTZI, K.; DEMERTZIS, P. G. Isolation of microbial pathogens of subclinical mastitis from raw sheep's milk of Epirus (Greece) and their role in its hygiene. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 315-319, 2011. Doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.05.002

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

FUSCO, V.; CHIEFFI, D.; FANELLI, F.; LOGRIECO, A. F.; CHO, G. S.; KABISCH, J.; FRANZ, C. M. Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st

century. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 2013-2049, 2020. doi: 10.1111/1541-4337.12568

GARCIA, S. N.; OSBURN, B. I.; CULLOR, J. S. A one health perspective on dairy production and dairy food safety. **One Health**, v. 7, p. 100086, 2019. doi: 10.1016/j.onehlt.2019.100086

GELASAKIS, A. I.; KALOGIANNI, A. I.; BOSSIS, I. Aetiology, risk factors, diagnosis and control of foot-related lameness in dairy sheep. **Animals**, v. 9, n. 8, 2019. doi: 10.3390/ani9080509

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. Simões. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 655 p.

GHERARDI, G. *Staphylococcus aureus* Infection: Pathogenesis and Antimicrobial Resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, p. 8182, 2023. doi: 10.3390/ijms24098182

GHARIB, A.; ATTIA, A.; BENDARY, M. Detection of the *coa* gene in *Staphylococcus aureus* from different sources by polymerase chain reaction. **Suez Canal Veterinary Medical Journal. SCVMJ**, v. 18, n. 1, p. 167-177, 2013. Doi: 10.21608/SCVMJ.2013.78290

GOODGER, W. J.; FARVER, T.; PELLETIER, J.; JOHNSON, P.; DESNAYER, G.; GALLAND, J. The association of milking management practices with bulk tank somatic cell counts. **Preventive Veterinary Medicine**, v.15, p.235-251, 1993. doi: 10.1016/0167-5877(93)90096-C.

GOKSOY, E. O.; KIRKAN, S.; BARDAKCIOGLU, H. E.; SEKKIN, S.; BEYAZ, D.; PARIN, U.; AKTAS, F. F.; BOGREKCI, I.; SERTER, E.; MERIC, Y.; KAHRAMAN, E. Y.; KIZANLIK, P. K.; SAHINER, C.; YUKSEL, H. T.; KARAARSLAN, S.; TURKMEN, R.; ANEMA, C.; BENT, W. V. D.; OZDES, A. Evaluation of The Effects of Milking Hygiene and Sanitation Education on Total Bacterial and Somatic Cell Number of Bulk Tank Milk in Dairy Cattle Breeding. **International Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 37-42, 2021. doi: 10.47278/journal.ijvs/2020.009

GÓMEZ, C.; PINAL, L.; FRANCO, J.; CARRILLO, J.M.; RAMÍREZ, J. Identification of *Staphylococcus aureus* strains negative for enterotoxins A, B and C isolated from bovine mastitis in México. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, p. 249–253, 2007. doi: 10.1016/j.vetimm.2007.02.011

GONZALES-BARRON, U.; GONÇALVES-TENÓRIO, A.; RODRIGUES, V.; CADAVEZ, V. Foodborne pathogens in raw milk and cheese of sheep and goat origin: a meta-analysis approach. **Current Opinion in Food Science**, v. 18, p. 7-13, 2017. doi: 10.1016/j.cofs.2017.10.002

GOTTELAND, M.; CIRES, M. J.; CARVALLO, C.; VEJA, N.; RAMIREZ, M. A.; MORALES, P.; RIVAS, P.; ASTUDILLO, F.; NAVARRETE, P.; DUBOS, C. Probiotic screening and safety evaluation of *Lactobacillus* strains from plants, artisanal

goat cheese, human stools, and breast milk. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 4, p. 487-495, 2014. doi: 10.1089/jmf.2013.0030

GRACE, D.; WU, F.; HAVELAAR, A. H. MILK Symposium review: foodborne diseases from milk and milk products in developing countries: review of causes and health and economic implications. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 11, p. 9715-9729, 2020. doi: 10.3168/jds.2020-18323

GUAN, X.; XU, Q.; ZHENG, Y.; QIAN, L.; LIN, B. Screening and characterization of lactic acid bacterial strains that produce fermented milk and reduce cholesterol levels. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 730-739, 2017. doi: 10.1016/j.bjm.2017.02.011

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. **Princípios da Utilização Prudente e Racional de Antimicrobianos em Animais**. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. Guia de Antimicrobianos em Veterinária, Porto Alegre: Artmed, 2010.

GUERRA, I. C.; OLIVEIRA, C. E. V.; MAIA, J. M.; LIMA, F. A.; QUEIROGA, R. C. R. E.; OLIVEIRA, M. E. G.; GONZAGA N. S. V. Análise comparativa da composição centesimal de leite bovino, caprino e ovino. **Encontro de Iniciação à Docência**, v. 10, 2008.

GUIMARÃES, V. P.; SOUZA, J. D. F. de. Aspectos Gerais da Ovinocultura no Brasil. In: SELAIVE-VILLARROEL, A. B.; OSÓRIO, J. C. da S. **Produção de Ovinos no Brasil**. São Paulo: Roca, 656p. 2014.

GUILLAUME, G.; LEDENT, V.; MOENS, W.; COLLARD, J.M. Phylogeny of efflux-mediated tetracycline resistance genes and related proteins revisited. **Microbial Drug Resistance**, v. 10, p. 11-26, 2004. doi: 10.1089/107662904323047754

HEIDORN, L. L.; WANDER, A. E.; VILELA, J. D. C. F. Consumo de lácteos de origem caprina e ovina no estado de Goiás e Distrito Federal. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 61, p. e259563, 2022. doi: 10.1590/1806-9479.2022.259563

HERAWATI O.; BEJO S. K.; ZAKARIA Z.; RAMANOON, S. Z. The global profile of antibiotic resistance in bacteria isolated from goats and sheep: A systematic review, **Veterinary World**, v.16, n.5, p.977-986, 2023. doi:10.14202/vetworld.2023.977-986

HORNA, G.; ASTOCONDOR, L.; JACOBS, J.; GARCÍA, C. Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. **Revista Española de Quimioterapia**. v.28 n.2. p.98-100, 2015.

IBGE. Censo Agropecuário. **Número de estabelecimentos agropecuários com ovinos, efetivos, venda, produção de lã e produção de leite, por tipologia, condição do produtor em relação às terras e grupo de cabeças de ovinos**. Brasília: Centro de Documentação e Disseminação de Informações, Gráfica Digital, 2017. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6930#resultado>. Acesso em: 24 abr. 2023.

IBGE. **Rebanho de Ovinos (Ovelhas e Carneiros)**: Brasil. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>. Acesso em: 15 de dez. 2023.

IBGE. **Rebanho de Ovinos (Ovelhas e Carneiros)**: Santa Catarina. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/sc>. Acesso em: 22 jan. 2024.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2021 PPM**. Rio de Janeiro: Centro de Documentação e Disseminação de Informações Gráfica Digital, 2021. 12 p. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=oque-> e. Acesso em: 21 abr. 2023.

IKEDA, T.; TAMATE, N.; YAMAGUCHI, K.; MAKINO, S. I. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2793-2795, 2005. doi: 10.1128/AEM.71.5.2793-2795.2005

INVITROGEN. **Platinum Taq DNA Polymerase**. Life Technologies. Thermo Fischer Scientific, 2015. Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Platinum_Taq_DNA_Polymerase_UG.pdf. Acesso em: 29 jun. 2024.

ISO 11290-1:1996. **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method**. Genebra:International Organization for Standardization. 1996.

ISO 14661:2005. **Milk and Milk products – Quality control in microbiological laboratories — Part 2: Determination of the reliability of colony counts**. Genebra:International Organization for Standardization. 2005.

ISO 4833-1:2015 - **Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique**. Genebra:International Organization for Standardization. 2015.

ISO 6579:2002. **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** Genebra:International Organization for Standardization. 2022

ISO 6278:2019. **Microbiologia de Alimentos para Consumo Humano e Animal - Requisitos Gerais e Orientações para Análises Microbiológicas**. Genebra: International Organization for Standardization, 2019.

ISO 7932:2004. **Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus***: Colony-count technique at 30°C. International Organization for Standardization. 2004.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 28.ed. Porto Alegre: Artmed, 865. p. 2022. ISBN 9786558040163

KARIMZADEH, R.; GHASSAB, R. Identification of *nuc* nuclease and *sea* enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from nasal mucosa of burn hospital staff: a cross-sectional study. **New Microbes and New Infections**, v. 47, p. 100992, 2022. doi: 10.1016/j.nmni.2022.100992

KASALICA, A.; VUKOVIĆ, V.; VRANJEŠ, A.; MEMIŠI, N. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 27, n. 3, p. 1067-1082, 2011.

KLINGER, I.; ROSENTHAL, I. Public health and the safety of milk and milk products from sheep and goats. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 16, n. 2, p. 482-488, 1997. doi: 10.20506/rst.16.2.1034

KONEMAN, E. **Diagnóstico microbiológico texto e atlas colorido**. Sexta edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2012.

KOVAŘOVIC, V.; SEDLÁČEK, I.; PETRÁŠ, P.; KRÁLOVÁ, S.; MAŠLAŇOVÁ, I.; ŠVEC, P.; PANTŮČEK, R. *Staphylococcus ratti* sp. nov. isolated from a lab rat. **Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 51, 2022. doi: 10.3390/pathogens11010051

KRUGER, C.; ARRUDA, R. S. de; ARRUDA, E. de F.; RADDATZ, J. C. O produtor rural e a contabilidade: uma análise das fontes de assessoramento na atividade rural. **Revista UNEMAT de Contabilidade**, v. 10, n. 20, p. 139-164, 2021. doi: 10.30681/ruc.v10i20.5805

LARSEN, H.; SLOTH, K.; ELSBERG, C.; ENEVOLDSEN, C.; PEDERSEN, L.; ERIKSEN, N. H.; JENSEN, N. The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 71, n. 1-2, p.89–101. 2000. doi:10.1016/s0378-1135(99)00161-3

LEGARRA, A.; BALOCHE, G.; BARILLET, F.; ASTRUC, J.M.; SOULAS, C.; AGUERRE, X.; ARRESE, F.; MINTEGI, L.; LASARTE, M.; MAEZTU, F.; Within- and across-breed genomic predictions and genomic relationships for Western Pyrenees dairy sheep breeds Latxa, Manech, and Basco-Béarnaise. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 3200-3212, 2014. doi: 10.3168/jds.2013-7745

LE LOIR, Y.; HENNEKINNE, J. A. Detection of staphylococcal enterotoxins. **Encyclopedia of food microbiology**, n. seconde édition, p. 3248, 2014. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00319-0

LI, R.; MA, Y.; JIANG, L. Research progress of dairy sheep milk genes. **Agriculture**, v. 12, n. 2, p. 169, 2022. doi: 10.3390/agriculture12020169

LOCATELLI, J. F. P; NARDI JUNIOR, G. DE; FRANCO, J. R.; CICCONE, C. E. Importância do *pré-dipping* e *pós-dipping* no controle da mastite bovina. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 12, p. 31100-31107, 2023. doi: 10.34117/bjdv9n12-035.

LOUTA, M., KARAGIANNIS, P., PAPANIKOLOPOULOU, V., VOURAKI, S., TSIPIS, E., PRISKAS, S.; ARSENOS, G. FarmDain, a Decision Support System for Dairy Sheep and Goat Production. **Animals**, v. 13, n. 9, p. 1495, 2023. doi: 10.3390/ani13091495

LUCENA, C. C.; GUIMARÃES, V. P.; Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. **Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos**. Sobral: EMBRAPA Caprinos e Ovinos, 17p. 2018. Disponível em: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 21 abr. 2023.

LV, G.; JIANG, R.; ZHANG, H.; WANG, L.; LI, L.; GAO, W.; QIN, L. Molecular characteristics of *Staphylococcus aureus* from food samples and food poisoning outbreaks in Shijiazhuang, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 652276, 2021. doi: 10.3389/fmicb.2021.652276

MAJUMDER, S.; JUNG, D.; RONHOLM, J.; GEORGE, S. Prevalence and mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from mastitic dairy cattle in Canada. **BMC Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2021.

MARIE-ETANCELIN, C.; MANFREDI, E.; AUREL, M. R.; PAILLER, F.; ARHAINX, J.; RICARD, E.; BARILLET, F. Genetic analysis of milking ability in Lacauene dairy ewes. **Genetics Selection Evolution**, v. 38, n. 2, p. 183-200, 2006. doi: 10.1186/1297-9686-38-2-183

MARKEY, B., F. LEONARD, M. ARCHAMBAULT, A. CULLINANE, D. MAGUIRE, **Clinical Veterinary Microbiology – E-book**, 2ed., Elsevier Health Sciences,, London, 2013. ISBN 0702055883. Disponível em: https://books.google.com.br/books?id=FUJYAQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-BR&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

MARQUES, C.; GAMA, L. T.; BELAS, A., BERGSTRÖM, K.; BEURLET, S.; BRIEND-MARCHAL, A.; POMBA, C. European multicenter study on antimicrobial resistance in bacteria isolated from companion animal urinary tract infections. **BMC Veterinary Research**, v. 12, p. 1-17, 2016. doi: 10.1186/s12917-016-0840-3

MARTIN, N. H.; EVANOWSKI, R. L.; WIEDMANN, M. Invited review: Redefining raw milk quality—Evaluation of raw milk microbiological parameters to ensure high-quality processed dairy products. **Journal of Dairy Science**, 2023. doi: 10.3168/jds.2022-22416

MCCALLUM, N.; BERGER-BÄCHI, B.; SENN, M. M. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 2-3, p. 118-129, 2010. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.08.015

MCGUINNESS, W.A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Yale Journal of Biological Medicine**. n. 902 p.269-281. 2017.

MEDEIROS, J. X.; COSTA, N. G. da; RIBEIRO, J. G. B. L.; MEDEIROS, S. A. F. de. **Inova Nordeste: iniciativas estratégicas para apoiar inovações no Nordeste: Ovinocaprinocultura**. Recife: CGEE/FADE/UFPE, 2005

MEDIAVILLA, J. R.; CHEN, L.; MATHEMA, B.; KREISWIRTH, B. N. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 588-595, 2012. doi: 10.1016/j.mib.2012.08.003

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000. doi: 10.1128/jcm.38.3.1032-1035.2000

MENEZES, M. F.; SIMEONI, C. P.; BORTOLUZZI, D.; HUERTA, K.; ETCHEPARE, M.; MENEZES, C. Microbiota e Conservação do Leite. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 89, n. 76, p. 76-89, 2014. doi: 10.5902/2236117013033

MERLIN JUNIOR, I. A.; COSTA, R. G., COSTA, L. G., LUDOVICO, A.; REGO, F. C. de A., ARAGON-ALEGRO, L. C.; SANTANA, E. H. W. de. Ovinocultura leiteira no Brasil: aspectos e fatores relacionados à composição, ao consumo e à legislação. **Colloquium Agrariae**. ISSN: 1809-8215. 2015. p. 38-53.

MONTEIRO, M. G.; BRISOLA, M. V.; VIEIRA FILHO, J. E. R. **Diagnóstico da cadeia produtiva de caprinos e ovinos no Brasil**. Texto para Discussão, 2021. doi: 10.38116/td2660

MORAIS, O. R. de. Produção de leite de ovelha no Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BOVINOCULTURA LEITEIRA, 4., 2013, Viçosa, MG. **Anais de Congresso**. Viçosa: UFV, p. 317-324.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary microbiology**, v. 124, n. 1-2, p. 66-72, 2007. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.014

MORANTES, M.; DIOS-PALOMARES, R.; PEÑA, M. E.; RIVAS, J., PEREA, J.; GARCÍA-MARTÍNEZ, A. Management and productivity of dairy sheep production systems in Castilla-La Mancha, Spain. **Small Ruminant Research**, v. 149, p. 62-72, 2017. doi:10.1016/j.smallrumres.2017.01.005

MORRISON, L.; ZEMBOWER, T. R. Antimicrobial resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics**, v. 30, n. 4, p. 619-635, 2020. doi:10.1016/j.giec.2020.06.004

MAROGNA, G.; ROLESU, S.; LOLLAI, S.; TOLA, S.; LEORI, G. Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. **Small Ruminant Research**, v. 88, n. 2-3, p. 119-125, 2010. doi:10.1016/j.Smallrumres.2009.12.019

MUNIEWEG, F. R.; NESPOLO, C. R.; PINHEIRO, F. C.; GAVIÃO, E. R.; PINHEIRO, F. C.; CZARNOBAY, M. Qualidade do leite cru ovino armazenado sob refrigeração. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 5, n. 1, p. 52-59, 2017.

MURRAY, R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología Médica**. Países Baixos: Elsevier, 872p. 2020.

MURAKAMI, K.; MINAMIDE, W.; 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, n. 10, p. 2240-2244, 1991. doi: /10.1128/jcm.29.10.2240-2244.1991

MWANGI, M. M.; WU, S. W.; ZHOU, Y.; SIERADZKI, K.; DE LENCASTRE, H.; RICHARDSON, P.; TOMASZ, A. Tracking the in vivo evolution of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* by whole-genome sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 22, p. 9451-9456, 2007. doi: 10.1073/pnas.0609839104

NASCIMENTO, G. R. S. do; CRUZ, C. de A.; STELLA, A. E.; MEIRELLES-BARTOLI, R. B.; VILELA, G. B.; MENDES, A. D. C. M.; DE PAULA, E. M. N. Resistência antimicrobiana em *Staphylococcus sp.* causadores de Mastite Bovina—revisão de literatura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 1, p. 4375-4391, 2023. doi: 10.34119/bjhrv6n1-340

NECIDOVÁ, L.; BURSOVÁ, Š.; SKOČKOVÁ, A.; JANŠTOVÁ, B.; PRACHAŘOVÁ, P.; ŠEVČÍKOVÁ, Ž.; JANŠTOVÁ, B. Growth and enterotoxin production of *Bacillus cereus* in cow, goat, and sheep milk. **Acta Veterinaria Brno**, v. 83, n. 10, p. 3-8, 2014. doi: 10.2754/avb201483S10S3

NEIDHARDT, F. Bacterial genetics. In: RYAN K. J.; RAY, C. G. **Sherris Medical Microbiology** - An introduction to infectious diseases. 4ª ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, p. 53-74, 2004.

NESPOLO, C. R.; MUNIEWEG, F. R.; MARCELINO, A. H.; ARAÚJO, L. C. S. R.; ARAUJO, D. N.; STEFANI, L. D. C. M. Effects of cold storage and freezing on sheep's milk. **Food Science and Technology**, v. 44, 2024. doi: 10.5327/fst.00137%20

NESPOLO, C. R.; TAFFAREL, J. A. S.; BRANDELLI, A. Parâmetros microbiológicos e físico-químicos durante a produção e maturação do queijo Fascal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 323-328, 2009. doi: 10.22456/1679-9216.16391

NIKOLIC, P.; MUDGIL, P. The cell wall, cell membrane and virulence factors of *Staphylococcus aureus* and their role in antibiotic resistance. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 259, 2023. doi: 10.3390/microorganisms11020259

NÓBREGA, A. **Câmara Setorial debate regulamentações para leite e abatedouros de caprinos e ovinos**. 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticiasp_p_id=buscanoticia_WAR_pcebusca6_1portlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=p_op_up&p_p_mode=vie>. Acesso em: 21 abr. 2023.

OGOREVC, J.; KUNEJ, T.; RAZPET, A.; DOVC, P. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. **Animal Genetics**, v. 40, n. 6, p. 832-851, 2009. doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01921.x

ORDONHEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 280p. 2005
ISBN: 9788536304311

OSMAN, K. M.; ZOLNIKOV, T. R.; SAMIR, A.; ORABI, A. Prevalence, pathogenic capability, virulence genes, biofilm formation, and antibiotic resistance of *Listeria* in goat and sheep milk confirms need of hygienic milking conditions. **Pathogens and Global Health**, v. 108, n. 1, p. 21-29, 2014. doi: 10.1179/2047773213Y.0000000115

PACHECO, M. A. S.; PINHEIRO, V. H. S.; FERNANDES, R. V.; GUIMARÃES, A.; CAMPOS, C. A.; VARGAS, R. T.; COURA, F. M. Importância da assistência técnica gerencial em fazendas leiteiras. **RECIMA21- Revista Científica Multidisciplinar**, v. 4, n. 5. 2023. doi: 10.47820/recima21.v4i5.3137

PAPPA, E.; KONDYLI, E.; SOTIRAKOGLU, K.; BOSNEA, L.; MATARAGAS, M.; ALLOUCHE, L.; TSIPLAKOU, E.; PAPPAS, A. Farmers profile and characterization of sheep and goat dairy chain in northwestern Greece. **Sustainability**, v. 13, n. 2, p. 833, 2021. doi: 10.3390/su13020833

PASHANGHEH, S.; SHEKARFOROUSH, S. S.; AMINLARI, M.; HOSSEINZADEH, S.; NIZET, V.; DAHESH, S.; RAHMDEL, S. Inhibition of histamine accumulation by novel histamine-degrading species of *Staphylococcus* sp. isolated from goats and sheep milk. **Food Science & Nutrition**, v. 10, n. 2, p. 354-362, 2022. doi: 10.1002/fsn3.2723

PAULA JUNIOR, A. de. Escolaridade nas zonas rurais da região sul. **Revista brasileira de geografia econômica - Espaço e Economia**, n. 16, 2019. doi: 10.4000/espacoeconomia.9900

PAULO, L.; RODRIGUES, A. M. **Caderno de boas práticas para a produção de leite de ovelha: + leite + qualidade**. Castelo Branco: CATAA - Associação Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar, p. 1-22, 2022. ISBN 978-989-53956-3-7.

PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; ZOTTI, T. R.; ARISI, A. C. M. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 145-148, 2009. doi: 10.1590/S1517-83822009000100025

PÉRICHON, B.; COURVALIN, P. **Glycopeptide resistance**. In: DOUGHERTY, T.; PUCCI, M. Antibiotic discovery and development. Springer, Boston, MA: Springer US, p. 515-542. 2011. doi: 10.1007/978-1-4614-1400-1_15

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 2177-2197, 2010. doi: 10.3390/toxins2082177

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. E-book. New York: McGraw-Hill, 2018. Disponível em: https://highered.mheducation.com/sites/0072556781/student_view0/web_links.html. Acesso em 15 jan. 2024.

PONNAMPALAM, E. N.; PRIYASHANTHA, H.; VIDANARACHCHI, J. K.; KIANI, A.; HOLMAN, B. W. Effects of nutritional factors on fat content, fatty acid composition, and sensorial properties of meat and milk from domesticated ruminants: an overview. **Animals**, v. 14, n. 6, p. 840, 2024. doi: 10.3390/ani14060840

QUEIROZ, E. O. **Produção de leite ovino em pastagem e confinamento**. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 2008

QUEIROZ, E. O.; SIQUEIRA, E. R.; BOUCINHAS, C. C.; NATEL, A. S.; OLIVEIRA, D. P. JÚNIOR, L. C. V. Composição centesimal do leite e incidência de mastite em ovelhas da raça Bergamácia mantidas em pasto ou confinamento. **PubVet**, v. 6, p. Art. 1345-1351, 2016. doi:10.22256/pubvet.v6n14.1351

QUIJADA, N. M.; HERNÁNDEZ, M.; ONICIUC, E. A.; EIROS, J. M.; FERNÁNDEZ-NATAL, I.; WAGNER, M.; RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. Oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* associated with processed food in Europe. **Food Microbiology**, v. 82, p. 107-110, 2019. doi:10.1016/j.fm.2019.01.021

QUINN, P. J.; MARKEY, B.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. 2005. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed, Porto Alegre, p.115-130.

QUINTANA, Á. R.; PEREA, J. M.; GARCÍA-BÉJAR, B.; JIMÉNEZ, L.; GARZÓN, A.; ARIAS, R. Dominant Yeast Community in Raw Sheep's Milk and Potential Transfers of Yeast Species in Relation to Farming Practices. **Animals**, v. 10, n. 5, p. 906-921, 2020. doi: 10.3390/ani10050906

RAHBARNIA, L.; RAD, R. K.; DEHNAD, A. R.; NAGHILI, B. The examination of some virulence factors in *S. aureus* isolates obtained from the healthy human population, sheep mastitis, and cheese. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 24, n. 2, p. 110, 2023. doi: 10.22099/IJVR.2023.43730.6410

REGECOVÁ, I.; VÝROSTKOVÁ, J.; ZIGO, F.; GREGOVÁ, G.; KOVÁČOVÁ, M. Detection of Antimicrobial Resistance of Bacteria *Staphylococcus chromogenes* Isolated from Sheep's Milk and Cheese. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 570-584, 2021. doi: 10.3390/antibiotics10050570

RIBEIRO, L. C.; PÉREZ, J. R. O.; CARVALHO, P. H. A.; SILVA, F. F.; MUNIZ, J. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, G. M. de; SOUZA, N. V. de. Produção, composição e rendimento em queijo do leite de ovelhas Santa Inês tratadas com ocitocina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 438-444, 2007. doi:10.1590/S1516-35982007000200022

- RICE, L.B.; BONOMO, R. A. **Genetic and biochemical mechanisms of bacterial.** Antibiotics in Laboratory Medicine. 5ª ed. Nova Iorque: Victor Lorian, M. D., p. 441-476, 2005.
- RAHMDEL, S.; HOSSEINZADEH, S.; SHEKARFOROUSH, S. S.; TORRIANI, S.; GATTO, V.; PASHANGHEH, S. Safety hazards in bacteriocinogenic *Staphylococcus* strains isolated from goat and sheep milk. **Microbial Pathogenesis**, v. 116, p. 100-108, 2018. doi: 10.1016/j.micpath.2018.01.016
- ROBERTS, M. C.; SCHWARZ, S. Tetracycline and phenicol resistance genes and mechanisms: importance for agriculture, the environment, and humans. **Journal of Environmental Quality**, v. 45, n. 2, p. 576-592, 2016. doi: 10.2134/jeq2015.04.0207
- ROCHA, C. **Vacinação de ovinos:** saiba como e quando utilizá-las. EMBRAPA RORAIMA. 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/12353077/vacinacao-de-ovinos-saiba-como-e-quando-utiliza-las>. Acesso em: 11 jan. 2023.
- ROMERO, G.; PERIS, C.; FTHENAKIS, G. C.; DIAZ, J. R. Effects of machine milking on udder health in dairy ewes. **Small Ruminants Research**, v. 188, p. 106096, 2020. doi: 10.1016/j.smallrumres.2020.106096
- SAADAT, Y. R.; FOOLADI, A. A. I.; SHAPOURI, R.; HOSSEINI, M. M.; KHIABANI, Z. D. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in organic milk and cheese in Tabriz, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 345, 2014.
- SAIDI, R.; CANTEKIN, Z.; MIMOUNE, N.; ERGUN, Y.; SOLMAZ, H.; KHELEF, D.; KAIDI, R. Investigation of the presence of slime production, VanA gene and antiseptic resistance genes in *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Algeria. **Veterinarska Stanica**, 2021. doi: 10.46419/vs.52.1.9
- SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; MENDONÇA, M. D. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010. doi: 10.1590/1808-1657v77p5452010
- SANTOS, S. C. G. dos; BARONI, L. N.; ALMEIDA NETA, M. R. D. A.; LEAL-BALBINO, T. C.; ANDRADE-FIGUEIREDO, M. Epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* no Brasil: elevada frequência de clones epidêmicos| pandêmicos, CA-MRSA e perspectivas futuras. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 35734-35751, 2021. doi: 10.34117/bjdv7n4-166
- SAVI, D.; ASSEMHEIMER, D. D.; KIELBOWICZ, S. D.; CASAGRANDE, M. V.; BLAGITZ, M. G. BezeLeite – Serviço de assessoria veterinária a criação de bezerras e manejo de ordenha na fronteira sul. **Seminário de Extensão Universitária da Região Sul – SEURS**, Tecnologia e Produção. 2022.

SELVAGGI, M.; D'ALESSANDRO, A. G.; DARIO, C. Environmental and genetic factors affecting milk yield and quality in three Italian sheep breeds. **Journal Dairy Research**, v. 84, n. 1, p. 27-31, 2017. doi: 10.1017/S0022029916000765

SENAR. **Agricultura SC**. Edição 105, 2022. Disponível em: <<https://sistemafaesc.com.br/storage/revistas/c9635442-387e-47fd-b4b4-cfe777416bfc.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2024.

SENG, R.; UDOMLUK, L.; RAPEE, T.; WASSANA C. High prevalence of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from a university environment in Thailand. **International Microbiology**. v. 20, n. 2, p. 65-73, 2017. doi: 10.2436/20.1501.01.286.

SEZER, Ç.; ÖZGÜR, Ç.; AKSEM, A.; LEYLA, V. Food handlers: a bridge in the journey of enterotoxigenic MRSA in food. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 10, p. 123-129, 2015. doi: 10.1007/s00003-015-0939-7

SHARIATI, A.; DADASHI, M.; MOGHADAM, M. T.; VAN BELKUM, A. YASLIANIFARD, S.; DARBAN-SAROKHALIL, D. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12689, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-69058-z

SILVA, C. A. da. **Caracterização do sistema de criação de ovinos no assentamento Maria Bonita - Delmiro Gouveia/AL**. (Dissertação de Mestrado em Agroecossistemas), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2018.

SILVA, E. S.; R.; V. C. F.; CORDÃO, M. A.; OLIVEIRA FILHO, H. S.; PEREIRA, G. E. S.; GOMES, J. F.; FIGUEIREDO, S. C. **Papel da Ovinocaprinocultura no Desenvolvimento Social em Assentamentos do Sertão Paraibano**. In Padrões Ambientais Emergentes e Sustentabilidade dos Sistemas. Atena Editora. p. 80-86. 2020. doi: 10.22533/at.ed.6502028059.

SILVA, J. M. dos S. da. Características classificação e patogenicidade do *Staphylococcus aureus*. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 2, p. 54-54, 2021.

SILVA-DE-JESUS, A. C.; FERRARI, R. G.; PANZENHAGEN, P.; CONTE-JUNIOR, C. A. *Staphylococcus aureus* biofilm: the role in disseminating antimicrobial resistance over the meat chain. **Microbiology**, v. 168, n. 10, p. 001245, 2022. doi: 10.1099/mic.0.001245

SIQUEIRA, A. K., SALERNO, T., LARA, G. H. B., CONDAS, L. A. Z., PEREIRA, V. C., RIBOLI, D. F. M., RIBEIRO, M. G Enterotoxin genes, multidrug resistance, and molecular typing of *Staphylococcus spp.* isolated from organic bovine milk. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 54, n. 1, p. 81-87, 2017. doi: 10.11606/issn.1678-

SORIO, A. Diagnóstico da oferta e demanda de ovinos e caprinos para processamento de carne, pele e leite na região central do Tocantins. **Secretaria do desenvolvimento da agricultura e pecuária - Estado do Tocantins**, v. 19, 2017.

SOUZA, V. de; BENEVIDES, S. D.; OLIVEIRA, L. S.; SANTOS, V. O. dos. **Aspectos importantes para a obtenção de leite de cabra com qualidade**. Sobral: EMBRAPA Caprinos e Ovinos, 55p. 2014. doi: 10.1590/0103-8478cr20220288

SOUZA, D. B. de; PEREIRA, R. I.; ENDRES, C. M.; FRAZZON, J.; PRICHULA, J.; FRAZZON, A. P. G. Resistant enterococci isolated from raw sheep's milk and cheeses from South region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 53, n. 10, p. 1-9, 2023.

STRÖHER, J. A.; SANTOS JR, L. C. O. dos; SALAZAR, M. M. Avaliação da qualidade microbiológica do leite cru refrigerado no trajeto do campo à indústria: estudo de caso no Rio Grande do Sul. **Nutrivisa-Revista de Nutrição e Vigilância em Saúde**, v. 10, n. 1, p. e11064-e11064, 2023. doi:10.59171/nutrivisa-2023v10e11064

TSUBAKISHITA, S.; KUWAHARA-ARAI, K., S; SAKI, T.; HIRAMATSU, K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4352-4359, 2010. doi: 10.1128/aac.00356-10

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: An introduction** 13. ed. New York: Pearson. 2019.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu. 760p., 2008.

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

TURCHI, B., TURINI, L., TARTUFOLI, L., PAOLIERI, G., MAUCERI, R., PEDONESE, F., BERTELLONI, F. Low prevalence of bacteria harbouring the main transferable genes coding for β -lactams resistance in ovine bulk tank milk produced in Central Italy. **Small Ruminant Research**, v. 231, p. 107197, 2024. doi: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2024.107197>

TURNER, N. A.; SHARMA-KUINKEL, B. K.; MASKARINEC, S. A.; EICHENBERGER, E. M.; SHAH, P. P.; CARUGATI, M.; FOWLER JR, V. G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203-218, 2019. doi: 10.1038/s41579-018-0147-4

VALLIN, V. M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H. L.; SILVA, L. C. C. da. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 181-188, 2009. doi: 10.5433/1679-0359.2009v30n1p181

VASILEIOU, N. G.C.; CHATZOPOULOS, D. C.; SARROU, S.; FRAGKOU, I. A.; KATSAFADOU, A. I.; MAVROGIANNI, V. S.; FTHENAKIS, G. C. Role of staphylococci in mastitis in sheep. **Journal of Dairy Research**, v. 86, n. 3, p. 254-266, 2019. doi: 10.1017/S0022029919000591

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M., BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 271-280, 1996. doi: 10.1016/0168-1605(96)00952-X

VIEIRA, R. K. R.; VIEIRA, R. K. R.; RODRIGUES, M.; SANTOS, P. K. S.; MEDEIROS, N. B. C.; CÂNDIDO, E. P.; NUNES-RODRIGUES, M. D. The effects of implementing management practices on somatic cell count levels in bovine milk. **Animals**, v. 15, n. 4, p. 100177, 2021. doi: 10.1016/j.animal.2021.100177

WEMETTE, M.; SAFI, A., BEAUVAIS, W.; CERES, K.; SHAPIRO, M., MORONI, P.; IVANEK, R. New York State dairy farmers perceptions of antibiotic use and resistance: A qualitative interview study. **Plos One**, v. 15, n. 5, p. e0232937, 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0232937

WENDORFF, W. L.; HAENLEIN, GEORGE, F.W. Sheep milk—composition and nutrition. **Handbook of milk of non-bovine mammals**, p. 210-221, 2017. doi: 10.1002/9781119110316.ch3.2

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Resolution and decisions of Seventy-Second World Health Assembly: Antimicrobial resistance**. 2019. Disponível em: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA72-REC1/A72_2019_REC1-en.pdf. Acesso em 11 jan 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em 11 jan. 2024.

YILMAZ, M.; SEKER, E. Investigation of *mecA*, *vanA* and *pvl* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in smallholder dairy farms. **Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi**, v. 33, n. 1, p. 50-55, 2022. doi: 10.35864/evmd.1008728

ZHANG, P.; MIAO, X.; ZHOU, L.; CUI, B.; ZHANG, J.; XU, X.; WU, C.; PENG, X.; XIN WANG, X. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* from food poisoning outbreaks and retail foods in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 11, p. 728-734, 2020. doi: 10.1089/fpd.2019.2774

ZURITA, J.; MEJÍA, C.; GUZMÁN-BLANCO, M. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina na América Latina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 97-106, 2010. doi: 10.1590/S1413-86702010000800005

ZVONKO, A.; ŽELJKA, K. Š.; KRUNOSLAV, Z.; JOSIP, N. Introduction of Lacaune sheep in Croatian sheep breeding. **Journal of Agriculture, Food, Environment Sciences, JAFES**, v. 76, n. 4, p. 10-16, 2022.

ANEXO A – COMPROVANTE DO CEUA



UDESC
UNIVERSIDADE
DO ESTADO DE
SANTA CATARINA

LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

Universidade do Estado de Santa Catarina

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

SUBMISSÃO INVALIDADA

Informamos que a proposta intitulada "Qualidade microbiológica do leite ovino e seus derivados produzidos na região Sul do Brasil", protocolada sob o CEUA nº 3039260623 (ID 001806), sob a responsabilidade de **Lenita de Cássia Moura Stefani** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, foi avaliada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) em 31/08/2023, e considerada INVALIDADA baseada nas seguintes considerações:

PARECER CEUA: INVALIDADO - O projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar os parâmetros de qualidade microbiológica do leite ovino e seus derivados bem como estabelecer correlações entre os manejos higiênicos-sanitários adotados, a qualidade microbiológica, e a prevalência de patógenos nos produtos finais. Como as amostras de leite serão coleta diretamente do tanque e os derivados lácteos nas propriedades, não há necessidade do projeto de pesquisa ser aprovado no CEUA. Parecer do relator INVALIDAR.

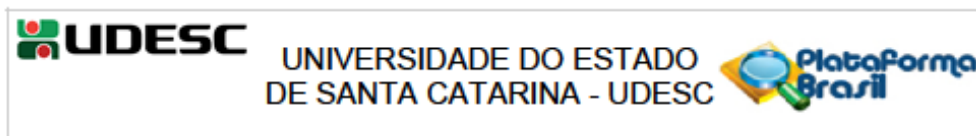
Lages, 31 de agosto de 2023

José Cristani
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina



ANEXO B – COMPROVANTE DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Qualidade microbiológica do leite ovino e seus derivados produzidos na região Sul do Brasil

Pesquisador: LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAUJO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 70724123.2.1001.0118

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SC UDESC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.327.638

Apresentação do Projeto:

Trata-se da segunda versão da Pesquisa: Qualidade microbiológica do leite ovino e seus derivados produzidos na região Sul do Brasil.

Pesquisador Responsável: LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAUJO,

Equipe de pesquisa: LARISSA DO PRADO LOPES, Médica veterinária PhD. LENITA MOURA STEFANI,

Zootecnista Dra. DENISE ARAUJO, Farmacêutica Dra. CASSIA REGINA NESPOLO.

Instituição proponente: UDESC

Instituição co-participante: Fundação Universidade Federal do Pampa UNIPAMPA

Participantes da pesquisa: 10 proprietários - com aplicação de questionários

Metodologia Proposta:

"Amostragem: O estudo será realizado através da coleta de dados em 10 propriedades, onde 5 estão localizadas na região da Serra Gaúcha e 5 no Oeste do estado de Santa Catarina. A coleta de dados será por meio de um questionário que de maneira geral compreenderá, o perfil da propriedade, o sistema de criação e ordenha, as condições higiênico-sanitárias e de manejo dos animais. Em cada uma das propriedades também serão coletas 100 amostras de leite cru. Quanto aos derivados lácteos serão coletadas 60 amostras (queijo e iogurte) oriundos das respectivas

Endereço: Avenida Madre Benvenutta, 2007, Retitoria - Térreo -sala CEP/UDESC
Bairro: Itacorubi **CEP:** 88.035-001
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3664-8084 **Fax:** (48)3664-7881 **E-mail:** cepsh.reitoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 6.327.638

propriedades selecionados com base na disponibilidade do produto nos pontos de venda. As amostras coletadas serão acondicionadas em embalagens estéreis, identificadas e transportadas sob refrigeração até os Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Imunologia (LABMIM) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) e da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) e em parceria com os Laboratórios de

Microbiologia de Alimentos e Biologia Molecular do Instituto SENAI de Tecnologia de Alimentos e Bebidas (Chapecó), onde serão avaliados os parâmetros microbiológicos e moleculares, em duplicata. As avaliações laboratoriais serão distribuídas ao longo de vida de prateleira de cada produto. O leite cru será avaliado diariamente e os derivados lácteos em análises semanais. Questionário Sanitário: O questionário padronizado será aplicado em todas as propriedades e serão abordados temas relacionados ao perfil de propriedade, ao tipo de criação, número de animais, ao tipo de mão-de-obra adotada, ao manejo do rebanho, manejo higiênico sanitário da ordenha e características sanitárias.

Análises microbiológicas e moleculares: Serão coletadas 100 amostras de 80 ml cada de leite cru em 10 propriedades para realizar análises microbiológicas. As amostras serão submetidas à contagem bacteriana total, contagem de bolores e leveduras, coliformes totais e fecais utilizando a metodologia comercial Petrifilm™. As análises de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. serão conduzidas com o uso dos kits comerciais Compact Dry®. As

contagens de *S. aureus*, *Clostridium* spp. e *Bacillus cereus* seguirão as metodologias tradicionais. Teste de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão Os isolados obtidos serão submetidos ao teste de susceptibilidade aos antibióticos relevantes de uso na saúde humana e animal, incluindo amoxicilina, azitromicina, penicilina, cefalexina, ceftriaxona, gentamicina, cloranfenicol e tetraciclina. A metodologia utilizada será o Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão. Detecção de genes de resistência utilizando PCR Posterior ao teste de disco-difusão os isolados classificados como resistentes a ação dos antibióticos testados, seguirão para a análise de PCR

(Reação em Cadeia da Polimerase) a procura de genes de resistência relacionados as beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) por meio da utilização do kit PureLink® Genomic DNA For Purification of Genomic DNA (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad). A extração do DNA das amostras será realizada utilizando um kit comercial, seguindo as instruções do fabricante. A escolha do kit levará em consideração as especificidades dos produtos lácteos, com o objetivo de eliminar substâncias interferentes, como gordura, sais, entre outros, que podem prejudicar a eficácia da PCR. Para detecção dos genes alvo, serão utilizados primers específicos que se ligarão

Endereço: Avenida Madre Benvenuta, 2007, Reitoria - Térreo -sala CEP/UDESC

Bairro: Itacorubi

CEP: 88.035-001

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3664-8084

Fax: (48)3664-7881

E-mail: cepsh.reitoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 6.327.638

aos genes de interesse permitindo a sua amplificação. Posterior a amplificação por PCR, os produtos serão separados eletroforéticamente em um gel de agarose, de acordo com uma metodologia inerente. Como controles positivos serão utilizadas cepas conhecidamente resistentes".

Metodologia de Análise de Dados:

"Os dados serão tabulados e dispostos em tabelas. Para analisar os resultados obtidos nos diferentes testes, as contagens serão transformadas em log de UFCg-1. Para cada parâmetro quantitativo analisado, serão calculadas a média e o desvio-padrão. As análises estatísticas serão realizadas utilizando o software R. Para comparar a qualidade microbiológica do leite com a qualidade microbiológica dos produtos, será utilizada a correlação de Pearson. Já a comparação dos resultados obtidos entre os dois estados será realizada em um delineamento inteiramente casualizado".

Redação de artigos científicos 01/01/2024 31/05/2024

Tabulação de dados 04/09/2023 06/11/2023

Aplicação de questionário 01/11/2023 20/12/2023

Confecção da Dissertação de Mestrado 01/01/2024 31/05/2024

Análises Microbiológicas e Moleculares 01/07/2023 31/10/2023

Coleta de material 01/07/2023 31/10/2023

Orçamento Financeiro: R\$ 23.000,00

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Este projeto tem como objetivo geral avaliar os parâmetros de qualidade microbiológica do leite ovino e seus derivados nas regiões do Oeste de Santa Catarina e Serrana do Rio Grande do Sul. Além disso, busca estabelecer correlações entre os manejos higiênicos-sanitários adotados, a qualidade microbiológica, e a prevalência de patógenos nos produtos finais. Também é proposto comparar os resultados obtidos entre os dois estados, visando obter uma visão abrangente da situação e identificar possíveis diferenças entre as regiões estudadas.

Objetivo Secundário:

- Caracterizar as propriedades produtoras;

Endereço: Avenida Madre Benvenuta, 2007, Reitoria - Térreo -sala CEP/UDESC
 Bairro: Itacorubi CEP: 88.035-001
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3664-8084 Fax: (48)3664-7881 E-mail: cepsh.reitoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 6.327.638

- Avaliar as condições higiênico-sanitárias e de manejo nas propriedades;
- Avaliar a qualidade microbiológica das amostras de leite e derivados;
- Pesquisar a prevalência de microrganismos patogênicos;
- Comparar as características microbiológicas entre SC e RS;
- Fornecer informações que permitam a classificação e caracterização do leite de ovelha e seus derivados produzidos na região Sul do Brasil;
- Correlacionar o perfil das propriedades, com o atendimento ao estabelecido pela IN 76 e IN 77 para o leite cru refrigerado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos destes procedimentos aos participantes envolvem: Risco de Privacidade e Confidencialidade; Risco de Identificação Pessoal; Risco Psicológico ou Emocional; Risco de Violação de Dados; Risco de Viés ou Manipulação; Risco de Tempo e Incomodação; Risco de Falta de Consentimento Informado. Contudo, por se tratar de um projeto de pesquisa avaliado pelo CEP, e o seguimento de todas as diretrizes éticas e legais da Universidade do Estado de Santa Catarina cada um dos riscos traz consigo medidas para minimizá-los, de modo a garantir a proteção dos participantes, assim como a confidencialidade dos dados. São elas: Os dados serão armazenados de maneira segura, acessíveis apenas para a equipe de pesquisa autorizada. A anonimização dos dados será alcançada por meio da substituição de informações pessoais por códigos. O questionário foi projetado para não conter perguntas que permitam a identificação dos participantes. Os participantes têm a opção de pular questões desconfortáveis sem sofrer penalidades. A segurança dos dados é garantida por meio de métodos de criptografia durante a transmissão e armazenamento seguro em servidores dedicados. As perguntas do questionário são formuladas de maneira objetiva e imparcial para minimizar influências enviesadas nos resultados. O questionário é conciso, focado nas questões relevantes para a pesquisa, com um tempo estimado de conclusão de 25 minutos. Antes de iniciar o questionário, os participantes receberão informações claras sobre a natureza, objetivos e procedimentos do estudo. O consentimento informado será obtido por escrito.

Benefícios:

Ao contribuir com as respostas ao questionário, o produtor estará ajudando a avançar o conhecimento científico no campo da produção de leite de ovelha, contribuindo para o desenvolvimento de melhores práticas e estratégias. Além disso, o produtor terá a oportunidade

Endereço: Avenida Madre Benvenuta, 2007, Reitoria - Térreo -sala CEP/UDESC
 Bairro: Itacorubi CEP: 88.035-001
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3664-8084 Fax: (48)3664-7881 E-mail: cepsh.reitoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 6.327.638

de refletir sobre suas próprias práticas de produção, avaliando seus pontos fortes e identificando áreas que podem ser aprimoradas. Sua participação também lhe proporcionará reconhecimento e visibilidade na comunidade acadêmica, possibilitando a abertura de portas para futuras colaborações e parcerias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora respondeu ao Parecer Consubstanciado n. 6.298.428, emitido em 13 de Setembro de 2023.

1 - Ajustar o cronograma de pesquisa para iniciar a coleta de dados após aprovação neste Comitê.

(Aplicação de questionário 10/07/2023 28/08/2023). Alterar o projeto básico da Plataforma Brasil.

Resposta: Alteração na Plataforma Brasil - Aplicação de questionário 01/11/2023 à 20/12/2023.

2 - Solicita-se que os riscos da pesquisa sejam expressos de forma clara no projeto básico, bem como a apresentação das providências e cautelas a serem empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições que possam vir a causar algum dano ao participante de pesquisa.

Resposta: Alteração na Plataforma Brasil – Similar ao TLCE

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados nesta versão:

- Projeto Básico - PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO
- Carta Resposta - Carta_Resposta2.pdf

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências da segunda versão:

1 - Ajustar o cronograma de pesquisa para iniciar a coleta de dados após aprovação neste Comitê.

(Aplicação de questionário 10/07/2023 28/08/2023). Alterar o projeto básico da Plataforma Brasil.

Resposta: Alteração na Plataforma Brasil - Aplicação de questionário 01/11/2023 à 20/12/2023.

Endereço: Avenida Madre Benvenuta, 2007, Reitoria - Térreo -sala CEP/UDESC
 Bairro: Itacorubi CEP: 88.035-001
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3664-8084 Fax: (48)3664-7881 E-mail: cepsh.reitoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 6.327.638

de refletir sobre suas próprias práticas de produção, avaliando seus pontos fortes e identificando áreas que podem ser aprimoradas. Sua participação também lhe proporcionará reconhecimento e visibilidade na comunidade acadêmica, possibilitando a abertura de portas para futuras colaborações e parcerias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora respondeu ao Parecer Consubstanciado n. 6.298.428, emitido em 13 de Setembro de 2023.

1 - Ajustar o cronograma de pesquisa para iniciar a coleta de dados após aprovação neste Comitê.

(Aplicação de questionário 10/07/2023 28/08/2023). Alterar o projeto básico da Plataforma Brasil.

Resposta: Alteração na Plataforma Brasil - Aplicação de questionário 01/11/2023 à 20/12/2023.

2 - Solicita-se que os riscos da pesquisa sejam expressos de forma clara no projeto básico, bem como a apresentação das providências e cautelas a serem empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições que possam vir a causar algum dano ao participante de pesquisa.

Resposta: Alteração na Plataforma Brasil – Similar ao TLCE

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados nesta versão:

- Projeto Básico - PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO
- Carta Resposta - Carta_Resposta2.pdf

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências da segunda versão:

1 - Ajustar o cronograma de pesquisa para iniciar a coleta de dados após aprovação neste Comitê.

(Aplicação de questionário 10/07/2023 28/08/2023). Alterar o projeto básico da Plataforma Brasil.

Resposta: Alteração na Plataforma Brasil - Aplicação de questionário 01/11/2023 à 20/12/2023.

Endereço: Avenida Madre Benvenuta, 2007, Reitoria - Térreo -sala CEP/UDESC
 Bairro: Itacorubi CEP: 88.035-001
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3664-8084 Fax: (48)3664-7881 E-mail: cepsh.reitoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 6.327.638

2 - Solicita-se que os riscos da pesquisa sejam expressos de forma clara no projeto básico, bem como a apresentação das providências e cautelas a serem empregadas para evitar e/ou reduzir efeitos e condições que possam vir a causar algum dano ao participante de pesquisa.

Resposta: Alteração na Plataforma Brasil – Similar ao TLCE.

Não encontrando outros óbices, protocolo de pesquisa aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

A Equipe Assessora APROVA o Protocolo de Pesquisa e informa que, qualquer alteração necessária ao planejamento e desenvolvimento do Protocolo Aprovado ou cronograma final, seja comunicada ao CEP via Plataforma Brasil na forma de EMENDA, para análise sendo que para a execução deverá ser aguardada aprovação final do CEP. A ocorrência de situações adversas durante a execução da pesquisa deverá ser comunicada imediatamente ao CEP via Plataforma Brasil, na forma de NOTIFICAÇÃO. Em não havendo alterações ao Protocolo Aprovado e/ou situações adversas durante a execução, deverá ser encaminhado RELATÓRIO FINAL ao CEP via Plataforma Brasil até 60 dias da data final definida no cronograma, para análise e aprovação. Lembramos ainda, que o participante da pesquisa ou seu representante legal, quando for o caso, bem como o pesquisador responsável, deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo suas assinaturas na última página do referido Termo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2159747.pdf	18/09/2023 10:39:21		Aceito
Outros	Carta_Resposta2.pdf	18/09/2023 10:37:45	LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAUJO	Aceito
Outros	folhaderosto.pdf	04/09/2023 20:58:12	LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAUJO	Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	04/09/2023 09:57:22	LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAUJO	Aceito

Endereço: Avenida Madre Benvenuta, 2007, Reitoria - Térreo -sala CEP/UDESC
 Bairro: Itacorubi CEP: 88.035-001
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3664-8084 Fax: (48)3664-7881 E-mail: cepsh.reitoria@udesc.br



UNIVERSIDADE DO ESTADO
DE SANTA CATARINA - UDESC



Continuação do Parecer: 6.327.638

Declaração do Patrocinador	declaracaodevalores.pdf	04/09/2023 09:53:34	LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAUJO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhado.pdf	04/09/2023 09:53:08	LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAUJO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEatualizado.pdf	04/09/2023 09:52:23	LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAUJO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PPLuana110623FINAL.pdf	21/06/2023 20:06:29	LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAUJO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEFinal210623.pdf	21/06/2023 20:03:58	LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAUJO	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoPlataformaBR2106Assina da.pdf	21/06/2023 20:03:10	LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAUJO	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	QuestionarioFinal.pdf	20/06/2023 19:34:19	LUANA CAROLINE SOUZA ROSA ARAUJO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 27 de Setembro de 2023

Assinado por:
Renan Thiago Campestrini
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Madre Benvenutta, 2007, Reitoria - Térreo -sala CEP/UDESC
 Bairro: Itacorubi CEP: 88.035-001
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3664-8084 Fax: (48)3664-7881 E-mail: cepsh.reitoria@udesc.br

ANEXO C – QUESTIONÁRIO – ARTIGO 1

ANEXO I

QUESTIONÁRIO APLICADO AO PRODUTOR(A) DE LEITE OVINO

Data: ____/____/____ Temperatura: ____°C Umidade ____ Aplicadora: LUANA

1. INFORMAÇÕES GERAIS

- 1.1 Código Produtor: _____ 1.2 Cidade: _____
- 1.3 Tipo de Mão-de-obra: () Familiar () Contratada () Contratada eventualmente
- 1.4 Escolaridade do proprietário: () Básico () Fundamental () Médio () Superior () Pós-graduação
 ----- () Completo () Incompleto
- 1.5 Sistema: () Intensivo () Semi-intensivo () Extensivo
- 1.6 Tamanho da propriedade: _____ ha
- 1.7 Ovinocultura leiteira é a atividade principal? () Sim () Não

2. ANIMAIS

- 2.1 Raça predominante: () Lacaune () East Friesian () Outras, quais? _____
- 2.2 Nº total de ovelhas: _____
- 2.3 Nº total de ovelhas em lactação: _____
- 2.4 Área para manter as ovelhas à campo: _____
- 2.5 Recebe assessoria profissional de veterinário e/ou zootecnista? () Sim () Não
- 2.6 Se sim, com que frequência? _____

3. SANIDADE

- 3.1 Usa antibióticos? () Sim () Não
- 3.2 Quais? _____
- 3.3 Com que frequência? _____
- 3.4 Usa vacinas? () Sim () Não
- 3.5 Quais? _____
- 3.6 Com que frequência? _____
- 3.7 Realiza exames laboratoriais (fezes, sangue, outros) () Sim () Não

3.8 Se sim, com que frequência? _____

4. MANEJO NUTRICIONAL

4.1 Pastagens utilizada: _____

4.2 Fornecimento de concentrados: _____

5. MANEJO DA ORDENHA

5.1 As ovelhas têm contato com o pastejo antes da ordenha? () Sim () Não

5.2 Tipo de ordenha: () Mecânica () Manual

5.3 Descarte dos 3 jatos antes de ordenhar? () Sim () Não

5.4 Pré-dipping: () Sim () Não Se sim, como realiza? _____

5.5 Secagem dos tetos após o pré-dipping: () Sim () Não

5.6 Pós-dipping: () Sim () Não

5.7 Utiliza pano ou papel pra pré e pós-dipping? _____

5.8 Tem conhecimento de como está a qualidade do leite produzido? () Sim () Não

5.9 Se sim, de que forma? _____

5.10 Se sim, como está a qualidade em geral? _____

5.11 Acredita que precisa melhorar no que tange a produção de maneira geral? () Sim () Não

5.12 Se sim, de que forma? _____

6. OBSERVAÇÕES ADICIONAIS:

Qual o destino do leite produzido? No destino, o leite passa por pasteurização? _____



Código para verificação: **N02Q89SP**

Este documento foi assinado digitalmente pelos seguintes signatários nas datas indicadas:



LENITA DE CASSIA MOURA STEFANI (CPF: 562.XXX.680-XX) em 05/10/2024 às 17:04:53

Emitido por: "SGP-e", emitido em 30/03/2018 - 12:42:03 e válido até 30/03/2118 - 12:42:03.

(Assinatura do sistema)

Para verificar a autenticidade desta cópia, acesse o link <https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo/conferencia-documento/VURFU0NfMTlwMjJfMDAwNDM1MTIfNDM1NjdfMjAyNF9OMDJRODITUA==> ou o site

<https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo> e informe o processo **UDESC 00043519/2024** e o código **N02Q89SP** ou aponte a câmera para o QR Code presente nesta página para realizar a conferência.