

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DOS *Staphylococcus aureus*
ISOLADOS EM DIFERENTES PONTOS DO FLUXOGRAMA DE
PRODUÇÃO DO LEITE**

Viviane de Souza
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Julho de 2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DOS *Staphylococcus aureus*
ISOLADOS EM DIFERENTES PONTOS DO FLUXOGRAMA DE
PRODUÇÃO DO LEITE**

Viviane de Souza

Orientador: Prof. Dr. Antonio Nader Filho

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva)

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2010

S719e Souza, Viviane de
Epidemiologia molecular dos *Staphylococcus aureus* isolados em diferentes pontos do fluxograma de produção do leite / Viviane de Souza. -- Jaboticabal, 2010
ix, 63 f. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010

Orientador: Antonio Nader Filho

Banca examinadora: Luciano Menezes Ferreira, Luiz Francisco Zafalon, Oswaldo Durival Rossi Junior, Angela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho

Bibliografia

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Epidemiologia molecular. 3. Mastite.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 637.1:616-036.22

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DOS *Staphylococcus aureus* ISOLADOS EM DIFERENTES PONTOS DO FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DO LEITE

AUTORA: VIVIANE DE SOUZA

ORIENTADOR: Dr. ANTONIO NADER FILHO


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em MEDICINA VETERINÁRIA área de MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:


Dr. ANTONIO NADER FILHO


Dr. LUCIANO MENEZES FERREIRA


Dr. LUIZ FRANCISCO ZAFALON


Dr. OSWALDO DURIVAL ROSSI JUNIOR


Dra. ANGELA CLEUSA DE FÁTIMA BANZATTO DE CARVALHO

Data da realização: 20 de julho de 2010.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. ANTONIO NADER FILHO

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

VIVIANE DE SOUZA – nascida na cidade de Uberaba – Minas Gerais, em 18 de Julho de 1979. Médica Veterinária, formada pela Universidade Federal de Uberlândia, no ano de 2003. Realizou estágio na Embrapa Gado de Leite, onde acompanhou e executou atividades no Laboratório de Qualidade do Leite e Microbiologia. Em agosto de 2003 iniciou o Curso de Capacitação para Médicos Veterinários, Responsáveis Técnicos em estabelecimentos produtores de alimentos de origem animal e estagiou no Laboratório de Análises Físico-Químicas e Microbiológicas de Alimentos de Origem Animal e Água, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, Unesp – Câmpus de Jaboticabal – SP. Ingressou no curso de pós-graduação desta Universidade, em 2004, e obteve título de Mestre em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, em julho de 2006 com a dissertação intitulada “Características físico-químicas, microbiológicas, celulares e detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite de tanque comunitário”. Em 2005 concluiu o curso de Pós-graduação “Lato-Sensu” em Processamento e controle de qualidade em carne, leite, ovos e pescado, pela Universidade Federal de Lavras. Trabalhou como Fiscal Agropecuário no Instituto Mineiro de Agropecuária, na cidade de Sacramento - MG, por dois anos e oito meses. Em março de 2007, iniciou suas atividades no curso de Doutorado, no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, Unesp – Câmpus de Jaboticabal – SP. Atualmente, trabalha nos Laticínios Scala, na cidade de Sacramento – MG.

A todos vocês que compartilharam dos meus ideais! Dedico essa conquista
com muita gratidão!

Aos meus pais, Joel e Josina

Às minhas irmãs Valéria e Vera

Aos meus irmãos Joel e Joelcio

Aos meus sobrinhos Thyago, Vítor e Lucas

À minha sobrinha e afilhada Lorena

A Deus, por sempre iluminar meu caminho

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Nader Filho, pela orientação e, principalmente, pela confiança e amizade. Minha eterna gratidão por todos os ensinamentos!

Ao Prof. Dr. Oswaldo Durival Rossi Júnior, pelos ensinamentos e pelas sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luciano Menezes Ferreira, ao Pesquisador Dr. Luiz Francisco Zafalon e à Prof. Dra. Angela Cleusa de Fátima Banzatto de Carvalho, pela participação na banca examinadora, e pelas valiosas sugestões para a conclusão do presente trabalho.

Aos produtores rurais integrantes dos tanques comunitários da Gameleira – Sacramento-MG, por tornar possível a realização desta pesquisa.

Às queridas amigas Poliana e Sandra... Vocês foram fundamentais na execução deste trabalho. Obrigada pela amizade!

Aos amigos Fernanda, Bel e Flávio, pelo auxílio prestado durante o experimento.

À Liliana Biondi Naka (Lila) e Waldemar Dibeli Júnior (Diba), pela amizade, conselhos e companheirismo. Saibam que tenho um carinho enorme por vocês!

Ao Prof. Dr. Antônio Sérgio Ferraudó, pela realização das análises estatísticas.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade do curso de pós-graduação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal.

Ao CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

Às minhas eternas amigas Bruna Alexandrino, Fernanda Rezende, Natacha, Roberta e Thaís... Obrigada pela convivência e momentos descontraídos durante todos esses anos!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Quadros	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Características das propriedades rurais e da população bovina	16
4.2. Seleção dos animais	19
4.3. Colheita das amostras	19
4.3.1. Amostras dos óstios papilares	22
4.3.2. Amostras de leite dos quartos mamários	22
4.3.3. Amostras dos insufladores da ordenhadeira mecânica	23
4.3.4. Amostras das superfícies internas dos latões, baldes, coadores e dos tanques de expansão comunitários e da tubulação utilizada para transvase do leite	23
4.3.5. Amostras de leite dos latões de cada propriedade e dos tanques de expansão comunitários	24
4.3.6. Amostras obtidas das mãos dos ordenhadores	25
4.3.7. Amostras de água das propriedades e da água utilizada para higienização dos tanques de expansão comunitários	25
4.4. Exames laboratoriais	26

4.4.1. Isolamento e identificação das estirpes de estafilococos coagulase-positivos	26
4.4.1.1. Teste da catalase	26
4.4.1.2. Teste da coagulase livre em tubo	27
4.4.1.3. Teste de Voges-Proskauer	27
4.5. Caracterização molecular dos isolados	27
4.5.1. Extração de DNA	28
4.5.2. Amplificação de Fragmentos de DNA Cromossômico	29
4.6. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	31
4.7. Classificação dos pulsotipos	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
7. CONCLUSÕES	52
8. REFERÊNCIAS	53

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1. Pontos de colheita das amostras provenientes das seis propriedades rurais que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 1, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009	20
Tabela 2. Pontos de colheita das amostras provenientes das seis propriedades rurais que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 2, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009	21
Tabela 3. Distribuição das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de acordo com a origem das amostras nas seis propriedades rurais que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 1, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009	36
Tabela 4. Distribuição das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de acordo com a origem das amostras nas seis propriedades rurais que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 2, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009	38

Tabela 5. Distribuição das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de acordo com a origem, entre as amostras provenientes das 12 propriedades estudadas, com os respectivos padrões de macrorrestrição do crDNA	45
Tabela 6. Distribuição das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de acordo com a origem, entre as amostras provenientes de cada propriedade estudada, com os respectivos padrões de macrorrestrição do crDNA	48

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Eletroforograma da ATCC 25923, utilizada como cepa controle positivo nas análises moleculares para confirmação da espécie <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figura 2. Eletroforogramas das amostras submetidas à análise molecular para confirmação das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i>	35
Figura 3. Exemplos de padrões de macrorrestrição do crDNA das estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> submetidas à Eletroforese em Gel de Campo Pulsado	42
Figura 4. Dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais do DNA de <i>Staphylococcus aureus</i> em Eletroforese em Gel de Campo Pulsado	43

Lista de Quadros

	Página
Quadro 1. Características gerais das seis propriedades rurais que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 1, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009	17
Quadro 2. Características gerais das seis propriedades rurais que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 2, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009	18
Quadro 3. Figuras da tubulação de PVC utilizada para auxiliar o transvase de leite no tanque de expansão comunitário 2 ..	24
Quadro 4. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para identificação da espécie de <i>Staphylococcus aureus</i> e os respectivos tamanhos dos fragmentos esperados	30

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DOS *Staphylococcus aureus* ISOLADOS EM DIFERENTES PONTOS DO FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DO LEITE

RESUMO – A mastite bovina é a principal doença do gado leiteiro em todo o mundo, devido a sua elevada ocorrência, aos prejuízos econômicos que acarreta aos produtores e à perda da qualidade do leite. Dentre os agentes da mastite, o *Staphylococcus aureus* é o mais frequentemente isolado. Sabe-se que o conhecimento do perfil molecular deste microrganismo é de fundamental importância para uma melhor compreensão dos estudos epidemiológicos de dispersão deste patógeno nas propriedades rurais. Sendo assim, durante o período de janeiro a abril de 2009, 222 vacas lactantes pertencentes a 12 propriedades rurais situadas no Município de Sacramento-MG foram submetidas ao *California Mastitis Test* (CMT). Foram colhidas amostras de leite dos quartos reagentes ao CMT, assim como do leite produzido em cada propriedade rural e do leite de conjunto das 12 propriedades contido em dois tanques de expansão comunitários. Paralelamente, foram colhidas, também, amostras dos óstios papilares, dos latões, dos baldes, dos coadores, dos insufladores das ordenhadeiras, das mãos dos ordenhadores, da superfície dos tanques de expansão, da tubulação auxiliar no transvase do leite, da água utilizada no processo de produção e da água utilizada para higienização dos tanques comunitários. A partir das 446 amostras colhidas nos diversos pontos, 244 estirpes foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente como estafilococos coagulase-positivos. O fragmento de DNA cromossômico específico da espécie de *S. aureus* foi amplificado em 106 estirpes, das quais 103 foram submetidas à eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Os pontos de colheita de amostras que apresentaram maior frequência de isolamento de estirpes de *Staphylococcus aureus* foram os óstios papilares (31,1%), o leite das vacas reagentes ao CMT (21,7%), os insufladores das ordenhadeiras mecânicas (21,7%), o leite dos latões (6,6%) e o leite contido nos tanques de expansão comunitários (5,6%). Neste estudo houve heterogeneidade genética entre as 103 estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas, uma vez que foram identificados 32 pulsotipos diferentes, cujo pulsotipo 1 foi o que apresentou maior similaridade entre as estirpes isoladas nos

diferentes pontos do fluxograma de produção do leite. A maior ocorrência de isolamentos do pulsotipo 1 das estirpes de *Staphylococcus aureus* foi observada nas amostras colhidas dos óstios papilares (10,6%), seguidas pelas amostras de leite das fêmeas reagentes ao CMT (5,8%) e insufladores das ordenhadeiras mecânicas (3,8%), evidenciando, portanto, a importância desses pontos no mecanismo de transmissão desses agentes nas propriedades estudadas.

Palavras-chave: mastite, *Staphylococcus aureus*, tanque comunitário, PCR, PFGE.

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *Staphylococcus aureus* ISOLATES AT DIFFERENT SITES IN THE MILK PRODUCTION FLOWCHART

ABSTRACT- Bovine mastitis is a main disease in milk cattle worldwide. *Staphylococcus aureus* is the most frequently isolated among mastitis agents. The microorganism's molecular profile is of paramount importance for a better understanding of epidemiologic studies of these pathogens on farms and ranches. Two hundred twenty-two cows on 12 farms in the municipality of Sacramento-MG, Brazil were tested by the California Mastitis Test (CMT) between January and April 2009. Milk samples were collected from four CMT reagents, from the milk produced on each farm and from milk collectively collected from the 12 farms and maintained in two community bulk tanks. At the same time samples of papillary ostia were collected from milk pails, cans, sieves, milking machine insufflators, milkers' hands, from the water used on the 12 farms and from the two community bulk tanks. Two hundred and forty-four strains among the 446 samples collected from several sites were isolated and biochemically characterized as positive coagulase *Staphylococcus*. Chromosome DNA fragment, specific to *S. aureus*, was amplified in 106 strains. Further, when 103 *S. aureus* strains underwent pulsed field gel electrophoresis (PFGE), the samples' collection sites with the highest isolation frequency of *S. aureus* strains were papillary ostia (31.1%), milk of cows which reacted to CMT (21.7%), the insufflators of milking machines (21.7%), milk in pails (6.6%) and milk in the community bulk tanks (5.6%). Since 32 different pulsotypes were identified, genetic heterogeneity existed among the 106 *S. aureus* isolated strains. Pulsotype 1 had the highest similarity among the *S. aureus* isolated strains at the different sites of the milk production flowchart. Since highest isolation frequency of pulsotype 1 of *S. aureus* strains were papillary ostia (10.6%), milk of cows which reacted to CMT (5.8%), the insufflators of milking machines (3.8%), the importance of the above sites for the transmission of the agent among the different properties under analysis is evident.

Keywords: mastitis, *Staphylococcus aureus*, community bulk tank, PCR, PFGE.

1. INTRODUÇÃO

O setor lácteo possui grande importância para o segmento agropecuário brasileiro. De acordo com o censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2006 existiam aproximadamente 1,34 milhões de propriedades produtoras de leite no país.

Para aumentar a competitividade e incrementar ainda mais a demanda por produtos lácteos, o setor tem a missão de melhorar a qualidade da matéria-prima, ponto de extrema importância para o futuro da cadeia produtiva do leite no Brasil. Com a melhoria da qualidade, pode-se almejar crescimento ainda maior das exportações e a elevação do consumo no mercado interno (ALVIM et al., 2009).

Considerando-se que o preenchimento de todos os critérios desejáveis de qualidade depende de um programa de saúde para o rebanho, baseado principalmente em medidas de prevenção e adoção de práticas de higiene adequadas, a mastite é considerada uma enfermidade de grande importância nos sistemas de exploração pecuária, principalmente devido aos prejuízos causados pela redução na produção de leite e pela baixa qualidade do leite produzido.

Dentre os agentes etiológicos da mastite, o *Staphylococcus aureus* apresenta elevada prevalência nos rebanhos estudados. Sabe-se que o conhecimento do perfil molecular desses microrganismos é de fundamental importância para uma melhor compreensão dos estudos epidemiológicos de dispersão deste patógeno nas propriedades rurais, de modo a favorecer a elaboração de protocolos de profilaxia e controle das mastites.

Diante das poucas informações disponíveis sobre a epidemiologia do *Staphylococcus aureus* em pequenas propriedades produtoras de leite no sistema de tanques de expansão comunitários, estudou-se 12 dessas propriedades situadas na região da Gameleira, Município de Sacramento-MG.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O cenário atual do setor lácteo

O setor lácteo brasileiro avançou nos últimos anos em virtude da atuação dos distintos elos da cadeia produtiva do leite. Dentre os avanços alcançados, pode-se citar a granelização do leite, o pagamento pelo leite valorizando sólidos e qualidade, a Instrução Normativa nº 51 instituída pelo Ministério da Agricultura, em busca da melhoria da qualidade do leite e da rastreabilidade. Independentemente das mudanças que o setor lácteo brasileiro passou nos últimos anos, BARROS & SIMÃO FILHO (2009) enfatizam que diversos fatores precisam ser melhorados como: a redução da informalidade, consolidação e maior integração da indústria, ganhos de produtividade na fazenda, melhoria na qualidade do leite e maior acesso a outros mercados.

Considerando que dentro desse novo cenário de modernização da colheita de leite, a palavra-chave é racionalização com otimização do processo, as indústrias captadoras de leite optam pelo fechamento ou cancelamento de linhas de leite deficitárias ou que geram baixa eficiência, especialmente aquelas mais distantes das fábricas ou de difícil acesso para os caminhões e compostas por produtores que apresentam pequena escala de produção (SANTOS & FONSECA, 2003). Sendo assim, no momento em que a Instrução Normativa nº 51 era discutida, falou-se que milhares de produtores poderiam sair da atividade por não terem condições de se ajustar à norma e encontrarem dificuldades em adquirir resfriadores individualmente, devido a seu alto custo. Para evitar esse problema, a norma criou a possibilidade dos mesmos resfriarem o leite em tanques comunitários (tanques em regime de condomínio), formando associações de produtores utilizando um único tanque de expansão o qual é instalado em uma propriedade e recebe leite de outras propriedades. Dessa forma, o investimento fica pulverizado entre vários pequenos produtores, o que viabiliza a permanência na atividade e reduz a comercialização do leite informal e a ocorrência do êxodo rural (RIBEIRO & TEIXEIRA, 2000).

De acordo com a Instrução Normativa nº 22 (BRASIL, 2009), o tanque comunitário deve ser instalado em local adequado, provido de paredes, cobertura, pavimentação, iluminação, ventilação e condições de acesso apropriadas, e ainda possuir ponto de água corrente de boa qualidade e local próprio para higienização das mãos, latões e demais utensílios. O tanque, os latões e demais utensílios devem ser higienizados logo após a entrega do leite, em local apropriado, utilizando água corrente de boa qualidade, detergentes, sanitizantes e utensílios de limpeza apropriados e específicos.

Segundo BRITO et al. (2006), para que os produtores que fazem uso dos tanques comunitários atendam as exigências da Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002), é necessário maior atenção à higiene da ordenha, lavagem e limpeza dos utensílios e à qualidade da água. Além disso, devem ser adotadas medidas relacionadas à organização dos produtores como conscientização e treinamentos.

2.2. Considerações sobre a mastite bovina

A mastite é considerada a doença que causa os maiores prejuízos à produção leiteira, devido à redução na quantidade e na qualidade do leite e derivados lácteos, custo com medicamentos, aumento da mão de obra e tempo de descarte do leite após o tratamento até a total eliminação dos resíduos de antibióticos utilizados (COSTA et al., 1999; SANTOS, 2003). Segundo BRITO (2009), a mastite continua a ser um dos maiores entraves para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. Patógenos da mastite interferem na qualidade do leite porque invadem os tecidos e alteram os processos de síntese no interior da glândula mamária. Isso resulta em redução da produção e alterações na composição do leite. O leite de vaca com mastite apresenta teores de lactose, caseína, gordura, cálcio e fósforo menores que o leite normal. Ao mesmo tempo aumentam, de forma indesejável, os teores de cloreto, sódio, o potencial de rancificação e o número de células somáticas (BRITO et al., 2003).

De acordo com a intensidade do processo inflamatório, as mastites são classificadas em clínica e subclínica. A mastite clínica caracteriza-se por modificações

visíveis no leite, como a presença de grumos de fibrina ou pus e, muitas vezes, alterações na glândula mamária como aumento de volume, presença de dor, aumento de temperatura e rubor. A mastite subclínica, por sua vez, não apresenta sinais clínicos evidentes. O leite apresenta aspecto macroscópico normal e não há sinais visíveis de inflamação do úbere, podendo ser detectada somente por provas indiretas com o leite, como o *California Mastitis Test* (CMT) (RADOSTITS et al., 2002).

Levando-se em consideração as características do agente infeccioso há as mastites contagiosas e as ambientais. Nas mastites contagiosas, a fonte primária dos agentes é o próprio úbere das vacas infectadas, com seus respectivos quartos infectados. Nestes casos a disseminação no rebanho ocorre durante a ordenha, transmitindo-se o agente de um quarto mamário quando infectado para outros, pelas mãos dos ordenhadores, pelos panos ou esponjas de uso múltiplo ou copos das teteiras no processo de ordenha mecânica e outros fômites. Já nas mastites ambientais a fonte primária da infecção é essencialmente o ambiente onde a vaca é explorada. Neste caso a infecção ocorre com maior frequência entre as ordenhas, pelas novas chances de contaminações externas à sala de ordenha (LANGONI, 2007).

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

As infecções intramamárias causadas por *S. aureus* apresentam implicações importantes em Saúde Pública, tendo em vista que toxinas podem ser excretadas no leite e permanecer estáveis nos produtos destinados aos consumidores (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

Entre as características morfofisiológicas do *S. aureus*, destacam-se as seguintes: são cocos Gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, apresentando metabolismo fermentativo com produção de ácido e não gás, não fotossintético, não esporulado, catalase positivos, e capazes de multiplicar-se em meio com 10% de cloreto de sódio. São microrganismos mesófilos, com temperatura de desenvolvimento de 7 a 48°C e ótima de 37°C, em pH na faixa de 4,0 a 10,0 (KLOOS & BANNERMAN, 1999).

O *S. aureus* é classificado entre os patógenos contagiosos, uma vez que a exposição de quartos mamários não infectados é geralmente limitada ao processo de ordenha (FOX & GAY, 1993; SMITH & HOGAN, 1993). A principal fonte de infecção são animais com quartos mamários infectados por *S. aureus*, além da pele do úbere e dos tetos contaminados, enquanto os bocais da ordenhadeira são considerados a principal via de transmissão da infecção (MYLLYS et al., 1997).

A prevalência da mastite por *S. aureus* em rebanhos leiteiros ocorre devido à sua alta infectividade associada a fatores de virulência que conferem ao microrganismo a capacidade de se instalar no parênquima mamário, formar microabscessos, resistir à fagocitose e sobreviver no interior de fagócitos, restringindo, dessa forma, o acesso dos agentes antimicrobianos, mesmo quando administrados em concentrações terapêuticas (ARAÚJO & ANDRIOLI, 1996).

BRITO et al. (1999) conduziram um estudo para definir os padrões de infecção intramamária de 48 rebanhos em propriedades de exploração leiteira do Estado de Minas Gerais, totalizando 6.315 amostras de leite de um total de 1.609 animais. Isolaram-se 3.919 microrganismos, sendo 3.637 de quartos mamários com infecção por um único agente e 283 de infecção mista. Detectaram *S. aureus* em 19,2% das amostras de leite de quartos mamários de vacas em lactação, o qual foi o patógeno primário mais frequentemente isolado, estando presente em 98% dos rebanhos estudados.

BRITO et al. (2006) realizaram exames microbiológicos de 72 amostras de leite provenientes de 24 rebanhos, sendo que, *S. aureus* foi isolado em 82% das amostras.

Visando avaliar a ocorrência e a etiologia da mastite subclínica, PEREIRA et al. (2007) estudaram 31 rebanhos leiteiros localizados na região Sul de Minas Gerais, nos quais 2.368 amostras de leite de vacas foram submetidas ao CMT. Os principais patógenos identificados foram estafilococos coagulase-positivos (35,6%) e os índices de mastite subclínica variaram de 18,6% até 89,7%, com 54,8% dos rebanhos analisados apresentando taxas superiores a 50%, e em 19,4% os índices foram superiores a 70%.

ZAFALON et al. (2008), em trabalho realizado em Nova Odessa-SP, isolaram *S. aureus* do leite, óstios e insufladores, porém não isolaram do leite do tanque de expansão, da água de lavagem dos insufladores e da oriunda das torneiras para a lavagem dos tetos.

2.2.2. Diagnóstico da mastite

O diagnóstico da mastite clínica é realizado a partir da observação de alteração no leite utilizando a caneca de fundo escuro e presença de sinais da inflamação com dor, edema no úbere e redução na secreção do leite. No entanto, a mastite subclínica pode ser melhor caracterizada pelo aumento da Contagem de Células Somáticas, devido ao influxo de leucócitos, uma vez que o leite está aparentemente normal. A prova do *California Mastitis Test* (CMT), desenvolvida por SCHALM & NOORLANDER (1957) a partir do fenômeno de Whiteside, surgiu devido à necessidade de um teste rápido e eficiente, realizado a campo, para o diagnóstico da mastite subclínica.

O CMT, apesar de ser subjetivo, tem a vantagem de ser utilizado ao pé da vaca, e estima o número de células somáticas no leite. Trata-se de um kit que consta de uma raquete com quatro receptáculos, onde são misturados aproximadamente 2 mL de leite com 2 mL de reagente. A ação do detergente aniônico é lisar os leucócitos liberando material genético (DNA) das células, ocorrendo viscosidade, que é proporcional ao número de células presentes na amostra de leite (LANGONI, 2007).

A Contagem de Células Somáticas (CCS) é considerada um dos principais indicadores da qualidade do leite. Esta investigação pode ser efetuada diretamente no leite do tanque de expansão ou no leite de animais individualmente, com a colheita sendo realizada nos quartos glandulares separadamente (RUEGG, 2001).

Alguns fatores podem influenciar os resultados da CCS no leite, como o estágio de lactação, sendo maiores as contagens tanto no início como no final da lactação, a idade do animal e o estresse, que também podem aumentar o número de células somáticas no leite (LANGONI, 2007).

Segundo esse mesmo autor, para a realização do diagnóstico microbiológico, as amostras de leite devem ser semeadas em meios de culturas seletivos, os quais permitem o isolamento dos principais patógenos envolvidos nas mastites. Compreende ainda, a caracterização bioquímica dos isolados, possibilitando a caracterização fenotípica e genotípica, bem como a realização do antibiograma.

O cultivo de amostras de leite de vacas, individualmente, seguido de identificação bacteriana, pode ser realizado como parte da pesquisa para a presença de mastites nos rebanhos. Por detectar, especificamente, o quarto infectado, as amostras individuais são preferíveis, pois resultam em menor número de quartos a serem tratados (RADOSTITS et al., 2002). Porém, segundo ELIAS (2007), do ponto de vista prático e econômico, uma vez instituídos programas de controle, esse manejo apresenta-se pouco efetivo, pelo custo e mobilização de mão de obra para um número elevado de amostras, principalmente pela atual tendência dos produtores ao aumento do número de animais em lactação.

Segundo SANTOS (2007), a análise do leite do tanque é uma ferramenta útil para avaliar a qualidade do leite e monitorar a saúde da glândula mamária nos rebanhos. Quando realizadas rotineiramente, estas análises, associadas a informações sobre práticas de manejo adotadas podem auxiliar na resolução de problemas de mastite e de qualidade do leite.

A cultura do leite do tanque tem sido usada como um método de triagem para a presença de patógenos das mastites nos rebanhos. As principais vantagens dos métodos estão associadas ao menor custo, maior facilidade de colheita de amostras e redução do número de amostras a serem processadas. Em contrapartida, apresenta limitações como: ausência de um teste padrão para colheita e cultivo das amostras, que vão desde a forma da colheita até o número e a frequência de amostragens (ELIAS, 2007; SANTOS, 2007).

2.3. Caracterização molecular dos isolados de *Staphylococcus aureus*

Do ponto de vista epidemiológico, é de grande importância a determinação da origem dos organismos envolvidos na etiologia da mastite bovina. Nesse contexto, a caracterização exata dos patógenos se faz imprescindível para a detecção das vias de transmissão e fontes de infecção, além de permitir o monitoramento da disseminação de estirpes bacterianas entre populações animais (LANGE et al., 1999).

Segundo PRATA et al. (2006) deverá ser dada ênfase à caracterização molecular para a identificação correta das espécies de microrganismos envolvidos na mastite, assim como à identificação dos genes responsáveis pelos fatores de virulência dos principais patógenos, que fornecerão subsídios a estudos epidemiológicos e permitirão a rastreabilidade de tais patógenos ao longo da cadeia produtiva do leite.

As limitações conferidas pelos métodos de cultivo levaram ao desenvolvimento de técnicas de reação em cadeia pela polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) para a identificação dos agentes etiológicos das mastites. A técnica propicia uma opção promissora para uma rápida identificação bacteriana pela utilização de sequências de DNA espécie-específicas. Além disso, as técnicas baseadas na PCR permitem a detecção de microrganismos mesmo em números reduzidos (FORSMAN et al., 1997; PHUEKTES et al., 2003).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), propicia um método de detecção e identificação direta de patógenos (MEYER et al., 1991). A técnica de PCR apresenta três etapas: extração do ácido nucléico, sua amplificação e posterior visualização do produto. O desempenho satisfatório do método depende, entre outros, da escolha acertada dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) e da técnica utilizada na extração do ácido nucléico da amostra (COLLINS et al., 1994).

FERREIRA (2008), em trabalho realizado em rebanho localizado em Nova Odessa-SP, caracterizou 245 estirpes de *S. aureus*, e observou que os isolamentos foram mais frequentes entre as amostras de leite (61,2%), seguidas pelo óstio papilar (26,4%) e insufladores (12,2%).

Segundo estudos de OLIVEIRA (2001), realizado em cinco propriedades leiteiras da região noroeste do Estado de São Paulo, o leite, foi também, o produto que apresentou a maior ocorrência (85,0%) de estirpes de *S. aureus* isoladas. No entanto, obteve somente 1,5% de isolamentos nos insufladores, enquanto que nenhuma estirpe foi isolada dos óstios papilares.

FAGUNDES (2007) observou percentuais de 3,9% e 6,7% de *S. aureus* no leite individual nas regiões de São Carlos e Ribeirão Preto, respectivamente. Quanto ao leite de mistura, verificou-se que a ocorrência de *S. aureus* foi de 19% em ambas regiões.

2.4. Estudo epidemiológico-molecular de *Staphylococcus aureus*

O objetivo dos estudos de genotipagem é fornecer evidências laboratoriais de que agentes etiológicos epidemiologicamente relacionados, ou seja, isolados durante um período determinado de tempo e em uma área geográfica específica, também seriam geneticamente relacionados e, assim, representariam uma mesma estirpe que se disseminou (TENOVER et al., 1995). Em relação à mastite bovina, a caracterização da diversidade genética dos *S. aureus* isolados de rebanhos leiteiros é fundamental para uma melhor compreensão do padrão de dispersão do patógeno. Tais informações podem auxiliar na elaboração de estratégias mais eficientes que visam à redução dos casos de infecção, uma vez que a partir dos perfis moleculares é possível inferir relações genéticas existentes entre os diferentes clones, detectar o fluxo gênico e traçar rotas de dispersão da infecção no rebanho (KAPUR et al., 1995).

Segundo KAPUR et al. (1995), existe uma heterogeneidade genética considerável em populações naturais de *S. aureus*, a qual pode ser explorada para investigar a disseminação dos isolados de origem humana e animal. A dificuldade de erradicação deste agente infeccioso dos rebanhos leiteiros pode estar relacionada à infecção por clones altamente transmissíveis (SMITH et al., 1998).

A associação entre os isolados de *S. aureus* provenientes de mastites e os locais de isolamento são de extrema importância epidemiológica. As linhas de ordenha são locais de intenso manejo, que podem propiciar condições de veiculação de patógenos

para a glândula mamária, especialmente *S. aureus*, caso sejam negligenciados os procedimentos de desinfecção dos equipamentos de ordenha e de higiene da glândula mamária durante a pré ordenha (SANTOS et al., 2003).

Entre as técnicas de análise genotípica, a eletroforese em gel de campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE) de fragmentos obtidos por macrorrestrição parece ser o método de maior sensibilidade, pois pode detectar variações genéticas entre isolados bacterianos filogeneticamente e epidemiologicamente relacionados, inclusive *S. aureus* (ZADOKS et al., 2002).

Segundo TENOVER et al. (1995), a técnica de PFGE é uma ferramenta de tipagem de maior poder discriminatório para *S. aureus*, por detectar variações genéticas menores entre estirpes epidêmicas e é considerada um bom método para estabelecimento de relações clonais em estudos epidemiológico-moleculares.

Na PFGE, padrões de restrição de genomas bacterianos completos são analisados e comparados. O cromossomo bacteriano é digerido por uma endonuclease de restrição de corte raro, com o objetivo de produzir um número moderado de fragmentos de DNA. Para proteger o DNA bacteriano de danos mecânicos, os microrganismos são imobilizados pela mistura da suspensão bacteriana em agarose fundida antes da lise celular. Os blocos contendo DNA purificado e digerido são inseridos em géis de agarose e os fragmentos do DNA separados por eletroforese em gel de campo pulsado, no qual a orientação do campo elétrico sofre alternância. Os perfis de restrição de DNA dos isolados são comparados para determinar a relação entre eles (LUKINMAA et al., 2004; TENOVER et al., 1997; TENOVER et al., 1995).

Para cada espécie de microrganismos deve ser aplicada a enzima de restrição que melhor aponte as variações entre estirpes e, no caso de *S. aureus*, a enzima *Sma*I é a mais indicada (VAN BELKUM et al., 1998).

A resolução da PFGE depende de vários fatores como: composição e concentração de agarose, solução tamponante, tensão da corrente elétrica (voltagem), tempo de pulso e tempo de corrida eletroforética. Outros fatores como grau de uniformidade, a força relativa dos campos elétricos, o ângulo entre os campos elétricos que se alternam de acordo com cada aparelho utilizado, a temperatura de corrida e

ainda, a integridade do DNA, também podem afetar o limite de resolução da técnica (MAGALHÃES et al., 2005).

A interpretação dos resultados de PFGE é realizada de acordo com os critérios definidos por TENOVER et al. (1995), que consideram três classes de relação entre os isolados: isolados que apresentam até três bandas diferentes são considerados relacionados, isolados apresentando de quatro a seis bandas diferentes são classificados como possíveis relacionados e os isolados que apresentam sete ou mais bandas diferentes são considerados não relacionados.

Segundo TENOVER et al. (1995), a relação de similaridade entre dois isolados pode ser estimada com base nos critérios de interpretação para os padrões de fragmentos de bandas, produzidos pela digestão do DNA cromossômico com a enzima *Sma*I. Dois isolados são considerados geneticamente idênticos quando os padrões de fragmentos de restrição presentes em ambos os isolados apresentem o mesmo número de bandas com o mesmo peso molecular. A interpretação epidemiológica desses resultados é que os isolados são considerados derivados de uma mesma estirpe.

As amostras são consideradas idênticas se mostrarem 100% de similaridade e são consideradas clonalmente relacionadas se apresentarem similaridade superior a 80%. O dendrograma ilustra relações filogenéticas e proporciona uma representação visual de linhagens, similaridades e diferenças genéticas entre grupos (SINGH et al., 2006).

Segundo MAGALHÃES et al. (2005), a PFGE é uma técnica bastante complexa com um poder discriminatório muito elevado. É considerado padrão ouro em epidemiologia molecular, mas ressaltam, porém, que métodos de tipagem não substituem dados epidemiológicos, somente auxiliam e, se utilizados isoladamente, podem levar a conclusões equivocadas.

FERREIRA (2008) submeteu 245 estirpes de *S. aureus* isoladas do leite de casos de mastite, dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira mecânica, à PFGE. Observou-se que houve a manutenção e a disseminação clonal dos pulsotipos identificados nas amostras analisadas. A análise de PFGE revelou 39 pulsotipos

distintos, dos quais 25 (64,1%) encontraram-se distribuídos nas 137 (55,9%) estirpes obtidas do leite.

Trabalho realizado por SANTOS (2009) identificou 32 perfis genéticos, agrupados em 12 linhagens, a partir dos 107 isolados de leite, material de insufladores, pele do úbere, mãos e fossas nasais de ordenhadores provenientes de 11 rebanhos de São Paulo e Pernambuco.

2.5. Medidas de controle da mastite

O preenchimento de todos os critérios desejáveis de qualidade depende de um programa de saúde para o rebanho, baseado principalmente em medidas de prevenção, adoção de práticas de higiene adequadas antes, durante e após a ordenha, e de conservação e transporte do leite em condições de higiene e temperatura adequadas (BRITO & BRITO, 1998).

Segundo LANGONI (2007), as medidas de controle estão relacionadas aos aspectos higiênicos referentes aos animais, às pessoas responsáveis pela ordenha, ao meio ambiente, especialmente estábulo e sala de ordenha. Os aspectos higiênicos relacionados à ordenhadeira, assim como os parâmetros de vácuo e o número de pulsações, também são extremamente importantes para o êxito de um programa de controle de mastites.

Algumas práticas mais frequentemente recomendadas em programa de controle da mastite são: a higienização dos equipamentos de ordenha, o uso de antisséptico antes e após a ordenha (pré e pós-dipping), ordenha dos animais infectados por último, tratamento apropriado dos casos clínicos, antibioticoterapia dos casos subclínicos durante a secagem e descarte das vacas com mastites crônicas recidivantes (COSTA et al., 1999).

Segundo MELO (2008), considerando-se a capacidade de estirpes de *S. aureus* formarem biofilmes e aderirem a diversas superfícies, principalmente de equipamentos e instalações no ambiente de ordenha, ressalta-se a importância da desinfecção e higiene adequada destes equipamentos para a eliminação desses agentes.

De acordo com MURRAY (1998), a fonte mais provável de contaminação primária de alimentos por *S. aureus* é o próprio ser humano que ao manusear os alimentos pode contaminar o produto cru, os equipamentos, e/ou o produto final. Segundo DINGWELL et al. (2004), um ponto crucial na profilaxia é a higiene do ordenhador. Suas mãos são o grande agente transmissor de bactérias para o úbere, o leite e todo o material utilizado durante o processo de obtenção do leite.

Trabalho realizado por TONDO et al. (2000) examinando a contaminação por *S. aureus* em leite e derivados e sua relação com os isolados e as fontes de contaminação, verificaram ocorrência de 35,2% de *S. aureus* nos seres humanos, manipuladores dos alimentos.

Em propriedades rurais destinadas à produção leiteira, a água também destaca-se como via de transmissão de agentes causadores de mastites. Segundo ADESIYUN et al. (1997) e AMARAL et al. (2004), a água utilizada em propriedades leiteiras pode ser importante veículo de microrganismos patogênicos para o leite e para a glândula mamária. Assim, existe a necessidade da desinfecção e controle de qualidade da água utilizada na produção de leite, com os objetivos de minimizar os riscos à saúde humana e animal.

Um suprimento de água de boa qualidade para a lavagem dos utensílios (baldes, latões, tanque de refrigeração e equipamentos de ordenha), tetos das vacas e mãos dos ordenhadores, é essencial. Água com qualidade microbiológica não satisfatória, utilizada no processo de ordenha, tem sido indicada como um fator que pode influenciar tanto a qualidade microbiológica quanto a contagem de células somáticas do leite. A qualidade química da água também deve ser observada, pois muitas vezes a dureza da água afetará na ação dos detergentes empregados para limpeza (BRITO et al., 2003).

AMARAL et al. (2003), ao analisarem 180 amostras de água pertencentes a 30 propriedades leiteiras situadas na região Nordeste do Estado de SP, observaram que o maior número de isolados de *S. aureus* ocorreu na água utilizada no local da ordenha.

AMARAL et al. (2004) avaliaram o risco da qualidade da água na qualidade do leite e na saúde da glândula mamária de vacas de 30 propriedades do estado de São Paulo, analisando amostras de água das fontes de abastecimento, saída do

reservatório e do estábulo. Observou-se que 90% das amostras das fontes, 86,7% das oriundas dos reservatórios e 96,7% originadas dos estábulos estavam em desacordo com os padrões de potabilidade. *S. aureus* foram isolados na água nos três pontos de colheita, sendo que em 100% das amostras de água utilizada nos estábulos, esses microrganismos foram capazes de produzir enterotoxinas.

Diante do exposto, idealizou-se o presente trabalho com a finalidade de atingir os objetivos que serão apresentados a seguir.

3. OBJETIVOS

3.1. Investigar a frequência de isolamento de estirpes de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite das fêmeas reagentes ao CMT, no leite individual e de conjunto de 12 propriedades leiteiras e em diferentes pontos do fluxograma de produção.

3.2. Conhecer as características genóticas das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em diferentes pontos do fluxograma de produção do leite.

3.3. Estabelecer a relação epidemiológica existente entre as estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas, com vistas à localização e às vias de transmissão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Características das propriedades rurais e da população bovina

Foram estudadas 12 propriedades rurais situadas na região da Gameleira, município de Sacramento-MG, entre as quais seis realizavam a ordenha manualmente, uma vez ao dia, e entregavam o leite no tanque de expansão comunitário 1. Em três das seis propriedades restantes, a ordenha era efetuada mecanicamente através do sistema “balde ao pé” duas vezes ao dia, e as demais realizavam a ordenha manualmente, uma vez ao dia. O leite oriundo dessas outras seis propriedades era entregue no tanque de expansão comunitário 2.

A produção diária total do leite das seis propriedades, que entregavam leite no tanque comunitário 1 era de aproximadamente 200 L. Já a produção diária total do leite das outras propriedades, que entregavam leite no tanque comunitário 2, era de aproximadamente 700 L.

O rebanho bovino nas propriedades era constituído em sua maioria por animais mestiços e a alimentação baseava-se em uma dieta composta por milho moído, farelo de soja, farelo de algodão, calcário calcítico, suplementos minerais, pastagens variadas e, ainda, silagem de milho.

Muito embora o teste da caneca telada ou de fundo escuro seja amplamente difundido, uma vez que leite contendo grumos não pode ser incorporado ao leite de mistura, em nenhuma das propriedades objeto do presente estudo esta prática era realizada.

Nos Quadros 1 e 2 estão dispostas as características gerais das propriedades, as quais foram avaliadas segundo os procedimentos e medidas higiênicas adotados durante o processo de obtenção do leite.

Quadro 1. Características gerais das seis propriedades rurais que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 1, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009.

Características	Propriedades					
	1	2	3	4	5	6
Nº animais em lactação	12	09	16	17	06	08
Nº animais com mastite clínica	0	0	0	0	0	0
Realização de teste de mastite clínica	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Realização CMT	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Tipo de ordenha	Manual	Manual	Manual	Manual	Manual	Manual
Pré-dipping	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Pós-dipping	Não	Não	Não	Não	Não	Não

Nº animais em lactação: vacas leiteiras em produção; Nº animais com mastite clínica: número de vacas com presença de grumos no leite no momento do teste da caneca de fundo escuro indicando mastite clínica; Faz teste mastite clínica: uso pela propriedade do teste da caneca do fundo escuro como rotina na ordenha; Faz teste CMT: uso pela propriedade do *California mastitis test* para diagnóstico de mastite subclínica no rebanho; Pré-dipping: antissepsia dos tetos através da imersão com desinfetante antes da ordenha; Pós-dipping: imersão dos tetos com desinfetante após a ordenha.

Quadro 2. Características gerais das seis propriedades rurais que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 2, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009.

Características	Propriedades					
	1	2	3	4	5	6
Nº animais em lactação	40	15	22	32	18	27
Nº animais com mastite clínica	0	0	0	1	0	0
Realização de teste de mastite clínica	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Realização CMT	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Tipo de ordenha	Mecânica balde ao pé	Mecânica balde ao pé	Manual	Mecânica balde ao pé	Manual	Manual
Pré-dipping	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
Pós-dipping	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Desinfecção teteiras entre ordenhas	Não	Não	-	Não	-	-

Nº animais em lactação: vacas leiteiras em produção; Nº animais com mastite clínica: número de vacas com presença de grumos no leite no momento do teste da caneca de fundo escuro indicando mastite clínica; Faz teste mastite clínica: uso pela propriedade do teste da caneca do fundo preto como rotina na ordenha; Faz teste CMT: uso pela propriedade do *California mastitis test* para diagnóstico de mastite subclínica no rebanho; Pré-dipping: antissepsia dos tetos através da imersão com desinfetante antes da ordenha; Pós-dipping: imersão dos tetos com desinfetante após a ordenha; Desinfecção teteiras entre ordenhas: procedimento para higienização das teteiras entre um animal e outro durante a ordenha.

4.2. Seleção dos animais

Durante o período de janeiro a abril de 2009, 222 vacas lactantes aparentemente saudáveis, pertencentes a 12 propriedades rurais, foram submetidas ao *California Mastitis Test* (CMT). O teste foi usado como triagem dos casos de mastite subclínica no rebanho, em que foram consideradas positivas as amostras de leite dos quartos mamários que apresentaram escore ≥ 1 ao CMT (SCHALM & NOORLANDER, 1957). Assim, foram colhidas amostras de leite dos animais reagentes ao CMT, exceto daqueles que estavam nos primeiros dez dias de lactação ou nos 30 dias anteriores a secagem, bem como das fêmeas que apresentavam mastite clínica.

Para a realização do CMT, foram desprezados três jatos de leite e, em seguida, colhidos cerca de dois mililitros em cada um dos quatro compartimentos circulares da bandeja plástica. Depois do escoamento do excesso de leite efetuado por inclinação da bandeja, foi adicionada em cada compartimento, igual quantidade do reagente, tendo-se o cuidado de evitar a formação de espuma. A homogeneização foi efetuada por meio de movimentos circulares e uniformes, durante 10 a 15 segundos, quando realizavam-se as leituras e a interpretação da prova (SCHALM & NOORLANDER, 1957). Assim, foram consideradas positivas as misturas (leite + reagente) que apresentaram evidente formação de gel viscoso, acompanhadas ou não pela coloração violeta, e negativas as misturas que permaneceram inalteradas, ou seja, sem a clara evidência de viscosidade (HIPOLITO et al., 1965).

4.3. Colheita das amostras

As tabelas 1 e 2 mostram a distribuição dos pontos de colheita das 446 amostras obtidas nas 12 propriedades rurais, de acordo com dois tanques de expansão comunitários objetos desta investigação.

Tabela 1. Pontos de colheita das amostras provenientes das seis propriedades rurais que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 1, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009.

Prop	Leite	Óstio	Latões Limpos	Baldes	Coadores	Leite do latão	Leite do Tanque Comunitário	Mãos dos Ordernhadores	Água das Propriedades	Água Tanque Comunitário	Superfície do Tanque Comunitário	Total
1	14	1	1	1	1	1	1	2	2	1	3	41
2	10	1	1	1	1	1	1	2	2	1	-	30
3	10	1	1	1	1	2	2	-	3	1	-	31
4	11	1	1	1	1	1	1	2	4	1	2	36
5	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	14
6	-	1	1	1	1	1	1	2	1	1	-	9
Total	47	6	6	6	6	7	7	10	13	6	6	161

(-) Sem colheita de amostras.

Tabela 2. Pontos de colheita das amostras provenientes das seis propriedades rurais que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 2, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009.

Prop	Leite	Ósio	Insufiadores antes da ordenha	Insufiadores após a ordenha	Latões Limpos	Superfície da Tubulação	Leite do leiteiro	Leite do Comunitário	Mãos dos Ordenhadores	Água das Propriedades	Água Tanque Comunitário	Coadores	Baldes	Total
n	n	n	n	n	n	n	n	N	n	n	n	n	n	n
1	20	20	20	20	4	6	1	1	2	2	1	-	-	97
2	21	16	16	16	4	-	1	1	2	2	-	1	-	85
3	2	2	-	-	4	-	1	1	2	2	1	1	1	17
4	11	11	16	16	5	-	1	1	2	2	1	1	-	67
5	-	-	-	-	1	-	2	1	2	2	-	1	1	10
6	-	-	-	-	1	-	2	1	2	1	-	1	1	9
Total	54	54	52	52	19	6	8	6	12	11	3	5	3	285

(-) Sem colheita de amostras.

4.3.1. Amostras dos óstios papilares

Foram colhidas amostras dos óstios papilares dos quartos das fêmeas reagentes ao CMT, utilizando-se, para tanto, suabes estéreis acondicionados em tubos contendo água peptonada a 0,1%. Assim, os suabes eram friccionados sobre o óstio papilar, em movimentos circulares e posteriormente mergulhados nos respectivos tubos (INGAWA et al., 1992).

Todos os suabes utilizados durante o experimento foram adquiridos prontos – swab sampler com água peptonada tamponada 3M™.

Em seguida, estas amostras foram acondicionadas em caixa de material isotérmico contendo gelo e levadas, para isolamento e identificação bacteriana, ao Laboratório de Análises de Alimentos de Origem Animal e Água do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal-SP, UNESP.

4.3.2. Amostras de leite dos quartos mamários

As amostras foram colhidas de acordo com os procedimentos recomendados pelo *National Mastitis Council* (HARMON et al., 1990). Após a limpeza do óstio papilar com álcool etílico 70% (v/v) utilizou-se tubos de ensaio esterilizados para acondicionamento das amostras individuais de 2 a 5 mL de leite, de cada quarto mamário, antes do início da ordenha. Estas amostras foram acondicionadas em caixa de material isotérmico contendo gelo e levadas ao laboratório para isolamento e identificação bacteriana.

4.3.3. Amostras dos insufladores da ordenhadeira mecânica

Nas três propriedades que possuíam ordenhadeira mecânica, antes do início e ao final da ordenha, suabes estéreis acondicionados em tubos contendo água peptonada a 0,1% foram friccionados em movimentos circulares na porção final de cada um dos insufladores em todos os conjuntos de ordenhadeiras, conforme recomendação de McDONALD et al. (1993). Os suabes acondicionados em tubos contendo água peptonada a 0,1% foram transportados em caixa de material isotérmico contendo gelo e levados ao laboratório para isolamento e identificação bacteriana.

4.3.4. Amostras das superfícies internas dos latões, baldes, coadores e dos tanques de expansão comunitários e da tubulação utilizada para transvase do leite

Suabes acondicionados em tubos contendo água peptonada a 0,1% foram friccionados nas superfícies internas dos latões higienizados, utilizados para acondicionamento do leite até o momento da entrega nos tanques de expansão comunitários, nos baldes, nos coadores e na superfície de um tanque de expansão comunitário higienizado (antes do transvase do leite) e na superfície da tubulação higienizada (PVC), utilizada para auxiliar o transvase de leite no tanque de expansão comunitário 2 (Quadro 3). Posteriormente os suabes foram mergulhados nos respectivos tubos e foram acondicionados em caixa de material isotérmico contendo gelo e levados ao laboratório para isolamento e identificação bacteriana.



Quadro 3. Figuras da tubulação de PVC utilizada para auxiliar o transvase de leite no tanque de expansão comunitário 2.

4.3.5. Amostras de leite dos latões de cada propriedade e dos tanques de expansão comunitários

Para a colheita das amostras de leite oriundas dos tanques de expansão comunitários, realizou-se a homogeneização do leite do tanque acionando-se o agitador por um tempo mínimo de cinco minutos. Após a homogeneização, um volume de 20 mL foi retirado com o auxílio de uma concha esterilizada, da parte superior e central do tanque, e acondicionado em frasco de vidro esterilizado (BRITO et al., 1998).

Todas as amostras foram acondicionadas em caixa de material isotérmico contendo gelo e levadas ao laboratório para isolamento e identificação bacteriana.

4.3.6. Amostras obtidas das mãos dos ordenhadores

Suabes estéreis mergulhados em água peptonada a 0,1% foram passados nos espaços interdigitais, nos espaços subungueais e sobre as palmas das mãos dos ordenhadores, e posteriormente mergulhados nos respectivos tubos. Somente em uma das 12 propriedades não foi possível a obtenção de amostras das mãos do ordenhador.

Os suabes acondicionados em água peptonada a 0,1% foram transportados em caixa de material isotérmico contendo gelo e levados ao laboratório para isolamento e identificação bacteriana.

4.3.7. Amostras de água das propriedades e da água utilizada para higienização dos tanques de expansão comunitários

As amostras de água foram colhidas diretamente das torneiras e mangueiras existentes nas salas de ordenha, após o escoamento por três minutos, assim como nos reservatórios das propriedades e nas salas onde os tanques de expansão comunitários estavam instalados, com os devidos cuidados de assepsia, em frascos de vidro esterilizados, em quantidade aproximada de 400 mL (APHA, 2001).

As amostras foram diluídas, quando necessário, até a diluição 10^{-3} e submetidas à técnica de membrana filtrante (membrana Schleicher e Schuell de 0,45 μ e 47 mm de diâmetro, ref. nº 1794-0) em sistema de filtro acoplado em kitasato conectado à bomba de vácuo. Inicialmente foram filtrados 10 mL da amostra diluída e posteriormente 10 mL da amostra pura. Entre cada amostra foram filtrados 100 mL de água destilada estéril (APHA, 2001). Para cada amostra foi utilizado uma membrana, a qual foi colocada em placa de petri contendo ágar Baird-Parker. As colônias suspeitas foram avaliadas segundo suas características morfológicas e tintoriais (Mac FADDIN, 1976).

4.4. Exames laboratoriais

4.4.1. Isolamento e identificação das estirpes de estafilococos coagulase-positivos

As amostras obtidas do leite provenientes dos quartos mamários das fêmeas reagentes ao CMT e as amostras de leite obtidas nos latões das propriedades e nos tanques comunitários, foram semeadas diretamente em placas de petri, contendo ágar Baird-Parker com auxílio de alça de semeadura e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. As amostras oriundas dos óstios papilares, dos insufladores dos conjuntos de ordenha, dos latões, dos baldes, dos coadores, da superfície da tubulação e das mãos dos ordenhadores foram semeadas em ágar Baird-Parker com os suabes utilizados nas colheitas e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas.

A seguir, 3 a 5 colônias foram semeadas em tubos com ágar nutriente inclinado e incubadas a 37°C por 24 horas. Após, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas apresentadas em forma de cocos Gram-positivos e agrupados sob a forma de cachos de uva foram submetidas às provas de catalase, da coagulase livre e de produção de acetoina (VP) (Mac FADDIN, 1976).

4.4.1.1. Teste da catalase

Após 24 h de cultivo em ágar nutriente, com uma alça bacteriológica flambada, retirou-se uma determinada quantidade de cultivo de *Staphylococcus* spp. Logo após foi feito um esfregaço em uma lâmina de vidro limpa, adicionando-se uma gota de água oxigenada (H₂O₂) a 3% sobre os microrganismos na lâmina. As estirpes que apresentaram imediato borbulhamento (liberação de gás) foram consideradas positivas (Mac FADDIN, 1976).

4.4.1.2. Teste da coagulase livre em tubo

Para a execução da prova de coagulase, as estirpes foram semeadas em tubos contendo caldo de infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion - BHI), e incubadas a 35°C por 24 horas. Em seqüência acrescentaram-se, em tubos de ensaio (10 x 70 mm), 0,3 mL desta cultura e 0,5 mL de plasma de coelho diluído a 1:5 em solução de cloreto de sódio a 0,85% esterilizada. Após agitação, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C e as leituras realizadas após 1, 2, 3, 4 e 24 horas. O resultado foi considerado positivo quando ocorria coagulação do plasma (GARCIA et al.,1980).

No presente trabalho, os microrganismos isolados que não provocaram coagulação do plasma de coelho não foram submetidos às demais provas de identificação para *S. aureus*, apesar da possibilidade, segundo SOUTO (2006), de isolados de *S. aureus* de infecções intramamárias apresentarem características bioquímicas atípicas, não demonstrando comportamento bioquímico clássico, como por exemplo, reação de coagulase positiva.

4.4.1.3. Teste de Voges-Proskauer

Para verificar a produção da acetoina a partir da glicose, as estirpes de estafilococos foram inoculadas em tubos contendo caldo de cultivo MRVP (Methyl-red Voges-Proskauer Broth) e incubadas à 37 °C por 48 h. Em seguida, foi adicionada 0,6 mL de uma solução de alfa-naftol a 5% e 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio a 40% (reativo de Barrit) em cada tubo. Após agitação foi feita a leitura, sendo considerados positivos os tubos em que a cultura apresentou a coloração vermelha após 15 min (Mac FADDIN, 1976).

4.5. Caracterização molecular dos isolados

A caracterização molecular dos isolados foi realizada em todas as estirpes que apresentaram-se como cocos Gram-positivos, agrupados sob a forma de “cachos de uva” e que se mostraram positivas nos testes da catalase, da coagulase e de Voges-Proskauer.

4.5.1. Extração de DNA

Para a extração de DNA das estirpes isoladas utilizou-se o Kit Invitex®, – Extração de Material Genômico, que continha o protocolo de extração de DNA para bactérias Gram-positivas, as soluções de lise, de extração e de lavagem e colunas de purificação.

Foi centrifugado 1,5 mL de cultura em caldo BHI (37°C/18h a 24h) a 10.000 rpm por 3 min e 30 s. Em seguida, todo o sobrenadante foi descartado em solução de hipoclorito de sódio.

O precipitado foi ressuspensionado em 400 µL de Ressuspension Buffer R, transferido para o Extration Tube L e incubado a 37°C por 10 min, sob constante agitação. Posteriormente, a amostra foi incubada a 65°C por 10 min e por fim incubada a 95°C por 5–10 min sobre constante agitação. Para manter as amostras sobre agitação constante utilizou-se Thermomixer compact.

Foi adicionado à amostra 400 µL de Binding Buffer B6, homogeneizou-se e em seguida todo o conteúdo do Extration Tube L foi transferido para o RTA Spin Filter Set, incubada a temperatura ambiente por 1 min e centrifugada a 12.000 rpm por 1 min e 30 s, com posterior descarte do filtrado.

Ao RTA Spin Filter Set foi adicionado 500 µL de Wash Buffer I. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 1 min e 30 s. O filtrado foi descartado juntamente com o tubo, sendo que o RTA Spin Filter Set foi colocado em um novo tubo RTA Receiver.

Ao RTA Spin Filter Set foi adicionado 600 μ L de Wash Buffer II e posteriormente a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 1 min e 30 s. Após o descarte do filtrado, a amostra foi novamente centrifugada para prover total eliminação do Wash Buffer II, a 13.200 rpm por 3 min e 30 s, sendo o filtrado descartado juntamente com o tubo. O RTA Spin Filter Set foi colocado em um RTA Receiver de 1,5 mL.

Ao RTA Spin Filter Set foi adicionado 200 μ L do Elution Buffer D, previamente aquecido a 56°C. A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 1 min, e em seguida, centrifugada a 8.000 rpm por 1 min e 30 s. O filtrado continha o material genético desejado, sendo armazenado em freezer -20°C até o momento da utilização nas reações de PCR.

4.5.2. Amplificação de Fragmentos de DNA Cromossômico

A caracterização molecular dos *Staphylococcus aureus* foi efetuada a partir da amplificação de fragmentos de DNA cromossômico específico para estes microrganismos, de acordo com o protocolo descrito por MARTINEAU et al. (1998). Desse modo, apenas as estirpes identificadas genotipicamente por esta técnica como sendo desta espécie foram submetidas aos testes seguintes. As reações compreenderam volume final de 20 μ L contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador Sa442-1 (5'- AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG- 3') e Sa442-2 (5'- CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA- 3'), e 0,5 U de *Taq* polimerase em amplificação do tipo *host-start*.

As misturas de PCR foram submetidas à desnaturação, por 3 min, a 94°C e, posteriormente, a 30 ciclos de 1 s, a 95°C, para desnaturação e 30 s, a 55°C, para pareamento e extensão dos oligonucleotídeos iniciadores.

O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose, em cuba horizontal. Sendo assim, 10 μ L do produto amplificado foram aplicados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo a uma concentração de 50 μ L/L e submetido à corrida eletroforética a 120 V por 90 min. Utilizou-se marcador de peso

molecular de 100 pares de bases (pb) (Invitrogen, Brasil), disposto no gel juntamente com todas as amostras analisadas em cada eletroforese, como padrão para o tamanho das bandas de DNA formadas. O tamanho dos segmentos amplificados era de 108 pb.

O produto de eletroforese foi visualizado em aparelho fotodocumentador Gel Doc 2000 – BioRad.

Foram tomados os devidos cuidados para evitar-se a contaminação de utensílios e equipamentos de laboratório com o material genético. As amostras foram extraídas, amplificadas e visualizadas na mesma sequência. A inclusão de um controle negativo foi realizada durante todo o procedimento, para prevenir riscos de resultados falsos positivos em todas as reações. Foi utilizada a ATCC 25923 como cepa controle positiva de *S. aureus* em todas as reações.

Quadro 4. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen, Brasil) utilizados para identificação da espécie de *Staphylococcus aureus* e os respectivos tamanhos dos fragmentos esperados (MARTINEAU et al., 1998)

Primers	Sequência	Tamanho do fragmento esperado - pares de bases
Sa442-1	5'-AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG-3'	
Sa442-2	5'-CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA-3'	108 pb

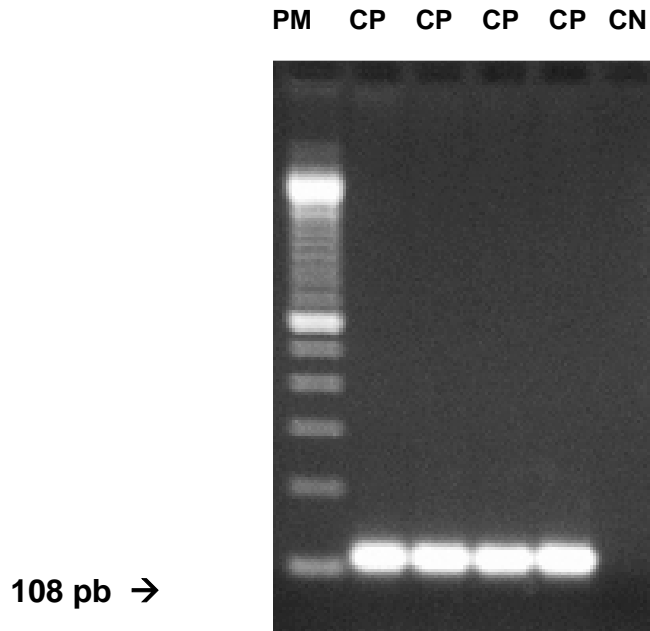


Figura 1. Eletroforograma da ATCC 25923, utilizada como cepa controle positivo nas análises moleculares para confirmação da espécie *S. aureus*; PM: Marcador de Peso Molecular Ladder 100 (Invitrogen®); C.P.: Controle positivo (utilização de DNA da ATCC 25923); C.N.: Controle Negativo (utilização de água Mili-Q estéril e filtrada)

4.6. Eletroforese em gel de campo pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis – PFGE)

De acordo com o protocolo estabelecido por McDOUGAL et al. (2003), uma alçada de cultura pura de *S. aureus* estocada em BHI e mantida sob refrigeração foi semeada em 5 mL de caldo THB (Todd-Hewitt Broth) e incubados em agitação vigorosa a 35-37°C por 18-24 h. O ajuste da concentração bacteriana foi feito em espectrofotômetro com a adição de salina e absorbância de 0,9 a 1,1 com comprimento de onda de 610 nm.

Duzentos microlitros da suspensão bacteriana foram centrifugados a 12.000 rpm por 2 a 4 min, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 300 µL de tampão TE (10mM Tris HCl, 1 mM EDTA [pH 8,0]) e equilibrado em banho-maria

a 37°C por 10 min. Foram utilizados, para a lise celular, 40 µL de solução de lisostafina (1 mg/mL em 20 mM de acetato de sódio) e, acrescidos à suspensão bacteriana, 300 µL de solução 20% de agarose low-melting (em tampão TE), gentilmente homogeneizados e dispostos nos moldes para a confecção dos blocos.

A solidificação da mistura foi realizada em temperatura ambiente por 10 min ou em refrigerador a 4°C por 5 min. Em seguida, os blocos foram removidos dos moldes e adicionados em tubos contendo 3 mL de tampão de lise EC (6 mM Tris HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% de deoxicolato de sódio, 0,5% de lauroylsarcosine, pH 8,0) e incubados a 37°C por, no mínimo, 4 h.

Posteriormente, o tampão de lise EC foi descartado e adicionados 4 mL de tampão TE, incubando a 37°C por 30 min, e esta troca repetida, no mínimo, mais três vezes. Até posterior utilização para a digestão restritiva com enzima *Sma*I, que cliva o DNA cromossômico no local de restrição CCC-GGG, os blocos foram armazenados a 4°C.

Para a digestão restritiva com *Sma*I, foi transferido um bloco para novo tubo de ensaio com 200 µL de tampão de restrição 1x, para equilíbrio do bloco, e incubados a 30°C por, pelo menos, 30 min. Após a remoção deste tampão, foram acrescidos 200 µL de reação, desta vez com 5 µL da enzima *Sma*I, em cada tubo, com incubação a 30°C por 4 h.

Após a solidificação do gel de agarose de grau cromossomal (*cromosomal grade agarose*, BioRad) a 1% preparado em tampão 0,5x TBE, os blocos foram introduzidos diretamente nos poços formados com a retirada do pente que acompanha o aparelho. Para a vedagem, foi utilizada a mesma agarose equilibrada a, aproximadamente, 56°C, com a finalidade de impedir que os blocos saiam dos poços.

A eletroforese foi executada com célula de eletroforese CHEF-DR III (BioRad, Melville, N. Y.) e, como padrão, foi utilizado DNA do bacteriófago λ, que serviu como controle dos parâmetros de corrida das unidades CHEF-DR. Os padrões de corrida foram os seguintes: pulso inicial, 5 s; pulso final, 40 s; voltagem, 200 V ou 6 V/cm; tempo, 21 h; e temperatura, 14°C.

Para que os fragmentos de DNA fossem corados, os géis foram colocados, sob imersão, em 100 μL de tampão TE com 1,5 μL de brometo de etídio, por 45 min. Em seguida foram descorados em água destilada, por 25 min, e fotografados posteriormente para a visualização dos diferentes pulsotipos no sistema de fotodocumentação GelDoc® (BioRad).

4.7. Classificação dos pulsotipos

A classificação dos pulsotipos em grupos foi gerada pelo dendrograma resultante da análise de agrupamento por método hierárquico utilizando como medida de semelhança entre os pulsotipos o coeficiente de Jaccard e a ligação dos grupos pelo método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages) (SNEATH & SOKAL, 1973). O software STATISTICA versão 7 foi utilizado no processamento da análise de agrupamento. As análises foram realizadas no Departamento de Ciências Exatas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal-SP, UNESP.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e identificação das estirpes de estafilococos coagulase-positivos de acordo com pontos de colheita das amostras

Das 446 amostras colhidas nos diversos pontos do fluxograma do leite, foram isoladas e identificadas 244 estirpes de estafilococos coagulase-positivos, as quais foram submetidas à amplificação de fragmentos de DNA Cromossômico específico da espécie de *S. aureus*.

5.2. Amplificação de Fragmentos de DNA Cromossômico

Entre as 244 estirpes de estafilococos coagulase-positivos, o fragmento de DNA cromossômico específico da espécie de *S. aureus* foi amplificado em 106 amostras.

Os produtos da reação de amplificação de algumas amostras submetidas à análise molecular para confirmação das estirpes de *Staphylococcus aureus* estão apresentados na Figura 2.

A distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de acordo com a origem das amostras, estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

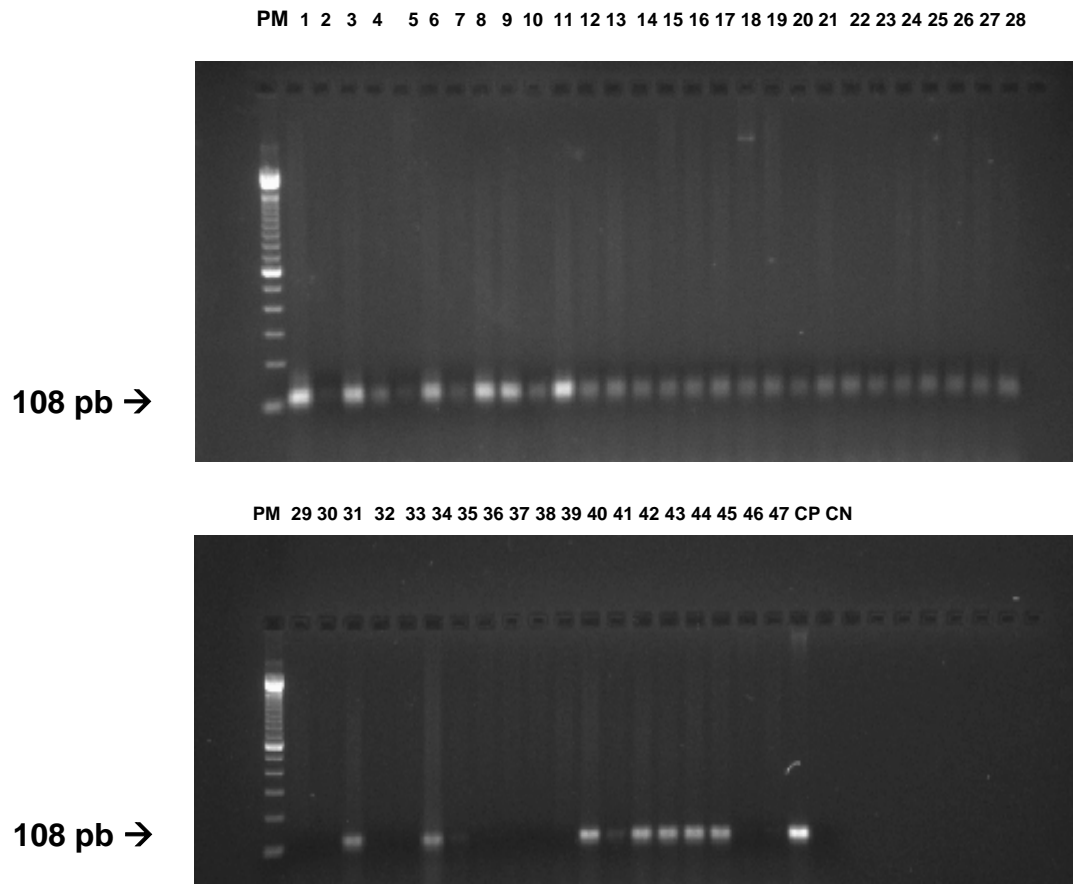


Figura 2. Eletroforogramas gerado de amostras submetidas à análise molecular para confirmação das estirpes de *Staphylococcus aureus*.

PM: Marcador de Peso Molecular Ladder 100 (Invitrogen®)

C.P.: Controle positivo (utilização de DNA da ATCC 25923)

C.N.: Controle Negativo (utilização de água Mili-Q estéril e filtrada)

Tabela 3. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de acordo com a origem das amostras, nas seis propriedades rurais que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 1, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009.

Prop.	Leite		Óstio		Latões		Baldes		Coadores		Leite do latão		Leite do Tanque Comunitário		Mãos dos ordenhadores		Água das propriedades		Água do Tanque Comunitário		Superfície Tanque Comunitário		Total			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	3	8,0	7	19,0	-	-	-	-	-	-	1	2,7	1	2,7	1	2,7	1	2,7	-	-	-	-	-	-	13	35,1
2	2	5,4	2	5,4	-	-	-	-	-	-	1	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	13,5
3	5	13,5	1	2,7	-	-	-	-	-	-	1	2,7	1	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	21,7
4	-	-	5	13,5	-	-	1	2,7	-	-	1	2,7	1	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	21,7
5	1	2,7	1	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	8,0
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	11	29,6	16	43,3	-	-	1	2,7	-	-	4	10,8	4	10,8	1	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	37	100,0

Na Tabela 3, observa-se que as estirpes de *S. aureus* obtidas dos óstios papilares e do leite das fêmeas reagentes ao CMT foram os locais que apresentaram o maior número de isolados, com 16 (43,3%) e 11 (29,6%) estirpes, respectivamente. Considerando-se que os *S. aureus* são patógenos contagiosos, cujos principais sítios de localização nos animais são representados pelo leite dos quartos infectados e superfícies da pele do úbere e do teto, e que a transmissão desses microrganismos ocorre usualmente entre as vacas durante a ordenha, os dados inseridos nesta Tabela, evidenciam, portanto, que a realização correta da antissepsia dos tetos antes da ordenha é de fundamental importância.

Os dados da Tabela 3, mostram que na propriedade 1, houve o isolamento de uma (2,7%) estirpe de *S. aureus* nas mãos do ordenhador. Considerando-se que nessa propriedade a ordenha era realizada manualmente, esse achado ratifica a importância da higienização das mãos, diante da possibilidade de constituírem-se em uma importante via de contaminação e transmissão de *S. aureus* durante o processo de obtenção do leite.

Observa-se ainda, que houve a presença de *S. aureus* em quatro (10,8%) amostras de leite do latão das propriedades. Esses microrganismos foram também isolados em quatro (10,8%) amostras do leite de conjunto contido no tanque comunitário. Este achado talvez possa ser atribuído às precárias condições higiênicas dos baldes, latões e coadores utilizados na obtenção do leite que certamente influenciaram na qualidade microbiológica deste produto, independentemente da provável ocorrência de falhas nos procedimentos de higienização do tanque comunitário. Acrescenta-se ao exposto, a possibilidade da ocorrência de contaminações por estes microrganismos ao longo do trajeto do leite, desde sua obtenção até o momento em que foi colocado no tanque comunitário.

Neste sentido, PHILPOT & NICKERSON (2002) assinalam que a inadequada limpeza do tanque de expansão assim como dos utensílios auxiliares utilizados na obtenção do leite, pode levar ao acúmulo de resíduos no leite em suas superfícies, de modo a servir de substrato para a multiplicação bacteriana.

Tabela 4. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de acordo com a origem das amostras, nas seis propriedades rurais que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 2, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009.

Prop.	Leite		Óstio		Insufladores antes da ordenha		Insufladores após a ordenha		Latões		Baldes		Coadores		Superfície da Tubulação		Leite do Tanque Com.		Mãos dos ordenhadores		Água das prop. Com.		Água Tanque Com.		Total			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	3	4,2	5	7,0	-	-	3	4,2	-	-	-	-	-	-	1	1,4	-	-	1	1,4	-	-	1	1,4	-	-	14	20,2
2	5	7,0	6	8,7	1	1,4	4	6,0	1	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2,8	-	-	-	-	19	27,5		
3	1	1,4	-	-	-	-	-	-	2	2,8	-	-	2	2,8	-	-	1	1,4	-	-	-	-	-	-	6	8,7		
4	3	4,2	6	8,7	8	12,0	7	10,0	-	-	1	1,4	-	-	-	-	-	-	1	1,4	-	-	-	-	26	38,0		
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,4	-	-	1	1,4	1	1,4	-	3	4,2	
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1,4	-	-	-	-	-	-	1	1,4		
Total	12	16,8	17	24,4	9	13,4	14	20,2	3	4,2	1	1,4	2	2,8	1	1,4	3	4,2	2	2,8	3	4,2	2	4,8	-	69	100,0	

Na Tabela 4, observa-se que a ocorrência de estirpes de *S. aureus* obtidas dos óstios papilares e do leite das fêmeas reagentes ao CMT foram os locais de isolamento que apresentaram o maior número de isolados, com 17 (24,4%) e 12 (16,8%) estirpes, respectivamente. De acordo com SANTOS & FONSECA (2007), a incidência de infecções está altamente correlacionada com o número de patógenos presentes na extremidade dos tetos. Assim, acredita-se que a ocorrência de *S. aureus* nos pontos em questão, possa estar diretamente associada à ausência da execução dos procedimentos de antissepsia dos tetos antes e após a ordenha.

Neste sentido, sabe-se que a realização do pré-dipping (antissepsia dos tetos antes da ordenha) reduz a contaminação dos tetos e o risco de novas infecções intramamárias, além de melhorar a eficiência da ordenha. A realização do pós-dipping (antissepsia dos tetos após a ordenha) com desinfetante à base de iodo e a imersão completa dos insufladores em balde com solução clorada (hipoclorito de sódio) dos insufladores das ordenhadeiras são medidas importantes para o controle da mastite (SANTOS & FONSECA, 2007).

A investigação realizada por PHILPOT & NICKERSON (2002) utilizando os produtos disponíveis no mercado para a realização do pós-dipping, de acordo com os protocolos estabelecidos pelo National Mastitis Council, mostrou que nesta etapa do processo de obtenção do leite pode-se reduzir em pelo menos 50% a taxa de infecção por microrganismos contagiosos.

De acordo com os dados inseridos na Tabela 4, observa-se que houve o isolamento de estirpes de *S. aureus* nos insufladores das ordenhadeiras mecânicas, antes e após a ordenha, em nove (13,4%) e 14 (20,2%) ocasiões, respectivamente. Esses achados demonstram que os insufladores da ordenhadeira podem constituir em uma importante via de contaminação e transmissão de *S. aureus* durante a obtenção do leite. Segundo KIM (1995) a higiene e a desinfecção do equipamento de ordenha é uma importante medida para a redução do número de microrganismos no leite. Segundo FONSECA & SANTOS (2001), a limpeza dos equipamentos de ordenha quando não respeitados os procedimentos corretos de tempo e temperatura e a utilização e concentração de detergentes, pode levar ao acúmulo de componentes do leite no

sistema, propiciando a multiplicação de microrganismos que irão contribuir para o aumento de até 10% da contaminação bacteriana do leite.

De acordo com a Tabela 4, observa-se que houve isolamento de estirpes de *S. aureus* nos latões, baldes e coadores, em três (4,3%), um (1,4%) e dois (2,8%) respectivamente, reforçando a deficiente higienização realizada nos utensílios das propriedades desta investigação. Observa-se ainda que houve a ocorrência de estirpes de *S. aureus* em uma (1,4%) amostra obtida da superfície da tubulação auxiliar no transvase do leite. Esta ocorrência pode ser atribuída à inadequada higienização empregada na tubulação, o que pode ter favorecido a formação de biofilme no utensílio em questão.

Considerando-se a capacidade de estirpes de *S. aureus* formarem biofilmes e aderirem a diversas superfícies, principalmente de equipamentos e instalações no ambiente de ordenha, ressalta-se a importância da desinfecção e da higiene adequada destes equipamentos para a eliminação desses agentes (MELO, 2008).

Os dados inseridos na Tabela 4 mostram que houve o isolamento de três (4,2%) estirpes de *S. aureus* nas mãos dos ordenhadores. Sabendo-se que as mãos constituem uma importante via de contaminação e transmissão de *S. aureus* durante o processo de obtenção do leite, esse achado demonstra a importância da higienização das mãos.

Observa-se, ainda, que houve a presença de *S. aureus* em três (4,2%) amostras de leite do latão das propriedades. Esses microrganismos foram também isolados em duas (2,8%) amostras do leite de conjunto contido no tanque comunitário. Este achado talvez possa ser atribuído às precárias condições higiênicas dos utensílios utilizados na obtenção do leite que certamente influenciaram na qualidade microbiológica deste produto, independentemente da provável ocorrência de falhas nos procedimentos de higienização do tanque comunitário.

Segundo FAGUNDES (2007), pelo fato de *S. aureus* ser uma bactéria de origem contagiosa e sua disseminação entre os animais dar-se principalmente durante a ordenha, pelas más condições de higiene dos animais, dos ordenhadores e dos

procedimentos de ordenha, pode-se relacionar a presença de *S. aureus* às condições de higiene encontradas nas propriedades.

Sabendo-se que em propriedades rurais destinadas à produção leiteira, a água também se destaca como via de transmissão de agentes causadores de mastites, conforme dados inseridos na Tabela 4, observa-se que no presente estudo houve a ocorrência de *S. aureus* em 2 (4,8%) amostras de água das propriedades. Na propriedade 1, acredita-se que a água contaminada favoreceu a possível formação de biofilmes nos insufladores da ordenhadeira, tornando-o um local de elevada transmissibilidade da enfermidade. Na propriedade 5, a água utilizada possivelmente constituiu fonte de contaminação para as mãos do ordenhador.

Segundo FERREIRA (2008), a formação de biofilme nos insufladores, caso ocorram falhas na manutenção e na higiene dos equipamentos, pode contribuir para a troca de genes de resistência entre os microrganismos que ali colonizam.

De acordo com ADESIYUN et al. (1997) e AMARAL et al. (2004), a água utilizada em propriedades leiteiras pode ser importante veículo de microrganismos patogênicos para o leite e para a glândula mamária. Sendo assim, existe a necessidade da desinfecção e controle de qualidade da água utilizada na produção de leite, com os objetivos de minimizar os riscos à saúde humana e animal.

FERREIRA (2008) ao estudar as 245 estirpes de *S. aureus* isoladas dos casos de mastite e de outros sítios de localização em uma propriedade rural, observou que os isolamentos foram mais frequentes entre as amostras de leite, seguidas pelas amostras dos óstios papilares e dos insufladores. Do mesmo modo, OLIVEIRA (2001), em estudo realizado em cinco propriedades leiteiras da região noroeste do estado de São Paulo, observou que o leite foi o ponto de colheita que apresentou maior ocorrência de estirpes de *S. aureus*. Deve-se assinalar, contudo, que o referido autor observou a presença destes microrganismos em apenas 1,5% dos insufladores, enquanto que nenhuma estirpe foi isolada dos óstios papilares.

5.3. Eletroforese em gel de campo pulsado

No momento da realização da eletroforese em gel de campo pulsado, observou-se que três estirpes de *S. aureus* não atingiram a concentração bacteriana necessária para a execução da prova. Sendo assim, 103 estirpes de *S. aureus* foram submetidas à PFGE.

Alguns exemplos dos produtos amplificados obtidos na análise dos géis da eletroforese de campo pulsado estão apresentados na Figura 3, enquanto o dendrograma dos produtos amplificados, gerado pelo algoritmo UPGMA, pode ser visualizado na Figura 4.

PM 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 PM

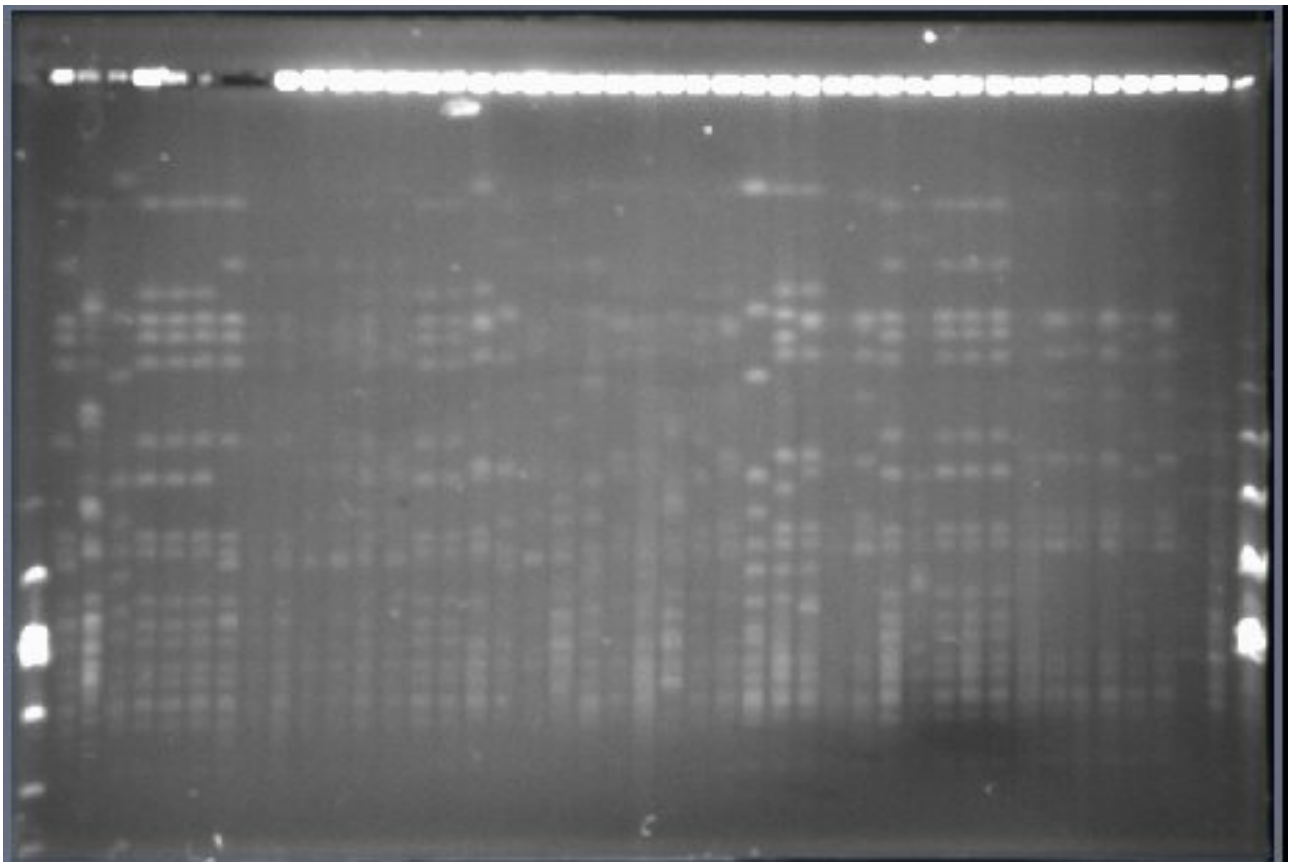


Figura 3. Exemplos de padrões de macrorrestrrição do crDNA das estirpes de *Staphylococcus aureus*, submetidas à PFGE.

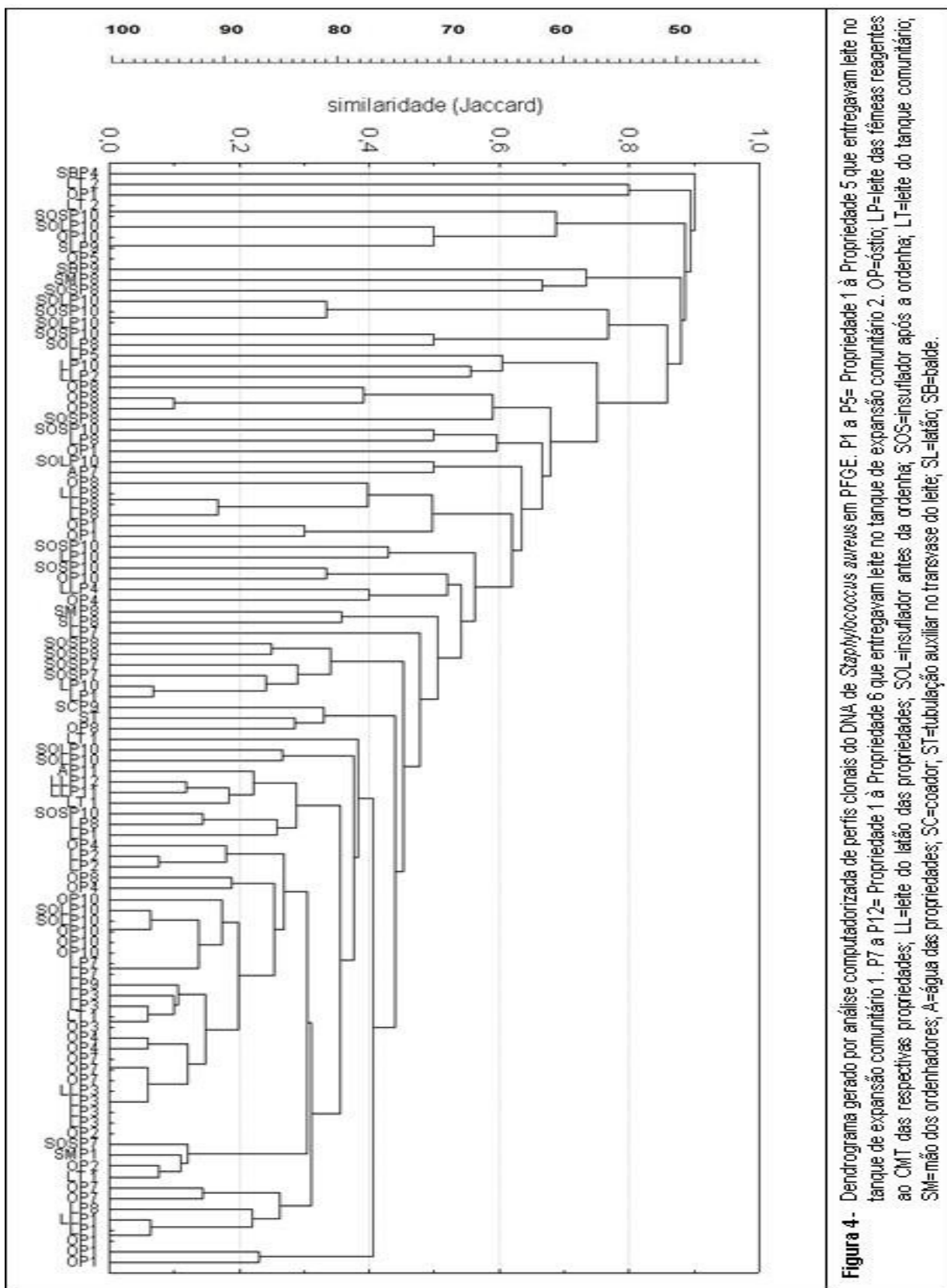


Figura 4. Dendrograma gerado por análise computadorizada de perfis clonais do DNA de *Staphylococcus aureus* em PFGE. P1 a P5= Propriedade 1 à Propriedade 5 que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 1. P7 a P12= Propriedade 1 à Propriedade 6 que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 2. OP=ósto; LP=leite das fêmeas reagentes ao CMT das respectivas propriedades; LL=leite do latão das propriedades; SOL=insulador antes da ordenha; SOS=insulador após a ordenha; LT=leite do tanque comunitário; SW=mão dos ordenhadores; A=água das propriedades; SC=coador; ST=tubulação auxiliar no transvase do leite; SL=latão; SB=baide.

Segundo SANTOS et al. (2003), a associação entre os isolados de *S. aureus* provenientes de mastites e os locais de isolamento é de extrema importância epidemiológica. As linhas de ordenha são locais de intenso manejo, que podem propiciar condições de veiculação de patógenos para a glândula mamária, especialmente *S. aureus*, caso sejam negligenciados os procedimentos de desinfecção dos equipamentos de ordenha e de higiene da glândula mamária durante a pré ordenha.

De acordo com o método de análise de agrupamento utilizado foi possível classificar as estirpes de *S. aureus* analisadas em 32 grupos. A classificação dos pulsotipos foi realizada pela análise do dendrograma de acordo com o estabelecido por TENOVER et al. (1997), os quais estabelecem que, as amostras com até 70% de similaridade são agrupadas como mesmo pulsotipo.

Na Tabela 5 estão apresentados os 32 padrões distintos encontrados para as estirpes de *S. aureus* de acordo com a origem das amostras provenientes das 12 propriedades estudadas.

Tabela 5. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de acordo com a origem, entre as amostras provenientes das 12 propriedades estudadas, com os respectivos padrões de macrorrestrição do crDNA, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009.

Pulsotipo	Leite das fêmeas		Óstio		Leite Latão		Leite Tanque Com.		Ins. antes ordenha		Insufladores após ordenha		Latões		Baldes		Coadores		Mãos		Sup. Tub		Água Prop.		Total		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
1	6	5,8	11	10,6	2	1,9	2	1,9	2	1,9	2	1,9	1	1,0											26	25,2	
2			2	1,9																						2	1,9
3	1	1,0	2	1,9	1	1,0																				4	3,8
4			1	1,0			1	1,0			1	1,0									1	1,0				4	3,8
5	1	1,0	2	1,9																						3	2,9
6	3	2,9																								3	2,9
7			1	1,0					1	1,0																2	1,9
8	2	1,9	2	1,9																						2	1,9
9			1	1,0																						3	2,9
10	2	1,9									1	1,0														3	2,9
11					2	1,9	1	1,0																		4	3,8
12							1	1,0	2	1,9																2	1,9
13																										1	1,0
14			1	1,0																						1	1,0
15	2	1,9																								1	1,0
16	1	1,0									4	3,8														6	5,8
17													1	1,0												1	1,0
18			1	1,0	1	1,0																				2	1,9
19			1	1,0																						2	1,9
20	1	1,0									1	1,0														2	1,9
21	2										1	1,0														2	1,9
22	1	1,0	1	1,0																						2	1,9
23																										2	1,9
24	1	1,0	3	2,9																						2	1,9
25	2	1,9																								3	2,9
26					1	1,0																				4	3,8
27																										3	2,9
28																										4	3,8
29																										3	2,9
30																										3	2,9
31																										1	1,0
32			1	1,0			1	1,0																		2	1,9
Total	25	24,3	30	29,1	7	6,8	6	5,9	9	8,8	15	14,6	2	2,0	2	2,0	1	1,0	3	3,0	1	1,0	2	2,0	103	100,0	

De acordo com os dados inseridos na Tabela 5, no presente estudo houve heterogeneidade genética entre os isolados, uma vez que foi observado um grande número de pulsotipos. Esses achados se assemelham aos obtidos por FERREIRA (2008) que obteve 39 pulsotipos, das 245 estirpes de *S. aureus* isoladas do leite de casos de mastite, dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira mecânica, em trabalho realizado em Nova Odessa-SP.

Observa-se, também na Tabela 5, que o pulsotipo 1 apresentou a maior prevalência entre os pulsotipos encontrados, com 25,2% (26) das estirpes tipadas, seguido pelos padrões 15, 3, 4, 11 e 25, com 5,8% (6), 3,8% (4), 3,8% (4), 3,8% (4), 3,8% (4), respectivamente.

LANGHE et al. (1999) observaram, ao pesquisar 66 estirpes de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite no sul do Brasil, 33 pulsotipos distintos e, também, a presença de um mesmo padrão de macrorrestrição do crDNA em 15,1% das amostras.

FERREIRA (2008) observou que o pulsotipo 29 apresentou a maior prevalência entre os padrões de macrorrestrição do crDNA, com 15,1% (31) das estirpes tipadas, seguido pelos padrões 17, 24, 9 e 20, com 10,7% (22), 9,3% (19), 6,9% (14) e 5,8% (12), respectivamente.

Segundo ROBERSON et al. (1994) a elevada variabilidade entre os padrões fenotípicos e genotípicos pode decorrer da diversidade dos locais nos quais os *S. aureus* são encontrados, uma vez que estes microrganismos podem ser isolados do leite de vacas acometidas de mastite clínica e subclínica, da superfície da pele dos tetos, dos insufladores das ordenhadeiras, e dos ordenhadores.

No presente estudo, o pulsotipo 1 apresentou maior similaridade entre as estirpes de *S. aureus* isoladas nos diferentes pontos do fluxograma de obtenção do leite, evidenciando, portanto, a disseminação do agente entre as diferentes propriedades.

A maior distribuição do pulsotipo 1 das estirpes de *Staphylococcus aureus* foi observada nos óstios papilares, seguido pelo leite das fêmeas reagentes ao CMT e insufladores das ordenhadeiras mecânicas com 11 (10,6%), 6 (5,8%), 4 (3,8%) respectivamente, evidenciando com isso, a importância desses pontos no mecanismo

de transmissão do agente entre as diferentes propriedades estudadas. Os resultados obtidos sugerem, ainda, que os procedimentos usuais de higiene adotados durante a ordenha, a limpeza e a desinfecção dos utensílios e dos equipamentos nas propriedades objeto desta investigação, não foram realizados adequadamente.

Na Tabela 6 pode ser observada a distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de acordo com a origem, entre as amostras provenientes de cada propriedade estudada, com os respectivos pulsotipos.

Tabela 6. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de acordo com a origem, entre as amostras provenientes de cada propriedade estudada, com os respectivos padrões de macrorestrição do crDNA, Sacramento-MG, janeiro a abril de 2009.

Pulsotipo	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	Tanque Com. 1	Tanque Com. 2
1	1 Ó, 1 L	1 Ó	2 L, 1 LL, 1 Ó		1 Ó		3 Ó, 2 L	1 L, 1 LL	1 IL	2 IL, 4 Ó, 2 IS			1 LT	1 LT
2	2 Ó													
3	1 LL						2 Ó	1 L						
4	1 M	1 Ó					1 IS							1 LT
5			1 L	2 Ó					1 L	1 IL, 1 Ó				
6			2 L											
7								1 Ó						
8			2 L	1 Ó										
9				1 Ó										
10	1 L							1 L		1 IS	1 LL, 1 A	1 LL	1 LT	
11														
12										2 IL				
13														
14									1 C					1 LT
15	1 L						2 IS	2 IS		1 Ó				1 TA
16							1 L			1 L				
17								1 LA, 1 M						
18				1 Ó, 1 LL										
19										1 Ó, 1 IS				
20										1 L, 1 IS				
21	2 Ó													
22							1 A	1 L, 1 Ó						
23										1 IL				
24	1 Ó							1 L		1 IS				
25								1 IS, 3 Ó						
26		1 LL			1 L			1 SL		1 L				
27										1 IS				
28										1 SL				
29								1 IS, 1 M	1 B					
30										1 SL				
31	1 Ó													1 LT
32														
Total	12	3	9	7	2	-	12	19	4	25	2	1	5	2

Ó=óstio; L=leite das fêmeas reagentes ao CMT; LL=leite do latão das propriedades; IL=insuflador antes da ordenha; IS=insuflador após a ordenha; LT=leite do tanque comunitário; M=mão dos ordenhadores; A=água das propriedades; C=coador; TA=tubulação auxiliar no transvase do leite; LA=latão; B=balde. P1 a P5= Propriedade 1 à Propriedade 5 que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 1. P1 a P6= Propriedade 1 à Propriedade 6 que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 1. P7 a P12= Propriedade 1 à Propriedade 6 que entregavam leite no tanque de expansão comunitário 2.

Os dados inseridos na Tabela 6 revelam que o pulsotipo 1 esteve presente em 8 (66,6%) das 12 propriedades estudadas. Esse pulsotipo se manifestou nos isolados de óstios papilares, leite das fêmeas reagentes ao CMT, leite do latão das propriedades, insufladores das ordenhadeiras mecânicas e no leite do tanque comunitário.

Depreende-se, portanto, que os isolados de mesmo perfil genético identificados nos insufladores das ordenhadeiras mecânicas, nos óstios papilares e no leite refletem a importância das ordenhadeiras mecânicas como via de transmissão deste agente etiológico da mastite.

SANTOS (2009) em estudo epidemiológico-molecular associado à mastite bovina em propriedades de exploração leiteira dos Estados de São Paulo e Pernambuco observou que o isolamento de *S. aureus* pertencente ao mesmo perfil genético em insufladores e a partir de amostras de leite reflete o papel do equipamento de ordenha como possível via de transmissão na mastite bovina no rebanho. Observou ainda que a pele do úbere constituiu também em uma importante via de transmissão da mastite.

FERREIRA (2008) observou que houve a manutenção e a disseminação clonal de alguns pulsotipos identificados nas amostras analisadas. Segundo esse mesmo autor, a ocorrência de estirpes de *S. aureus* com pulsotipos iguais em uma mesma colheita evidenciou, nas amostras de leite, óstios papilares e insufladores da ordenhadeira mecânica, a relação epidemiológica existente entre as fontes de infecção e vias de transmissão.

No presente estudo, acredita-se que a disseminação do *S. aureus* nas diferentes propriedades pode ser atribuída a proximidade existente entre as mesmas, o que possivelmente favorece a troca de animais, sem observar os protocolos de controle sanitário dos rebanhos. Acredita-se ainda, que a disseminação observada pode ser explicada pelo fato de que o sistema de uso do tanque de expansão para refrigeração do leite era comunitário. Assim, no momento da entrega do leite, os latões eram higienizados mecanicamente no local onde os tanques de expansão estavam instalados, favorecendo a disseminação de microrganismos.

Segundo FAGUNDES (2007), a disseminação de *S. aureus* entre diferentes propriedades, possivelmente pode ocorrer através da troca ou venda de animais entre as propriedades.

A ocorrência de *S. aureus* evidencia a importância do diagnóstico destes agentes nas mastites bovinas, cuja identificação proporciona o delineamento de programas de controle mais racionais e efetivos. Desse modo, com a redução da ocorrência desta enfermidade, além da diminuição das despesas com o tratamento, serão criadas condições propícias para a melhoria da qualidade do leite produzido em nosso meio.

Segundo ZECCONI & PICCININI (1999) a variabilidade genotípica sugere a necessidade de identificar clones ou subtipos antes mesmo de serem adotadas medidas específicas no controle da mastite.

Tais informações poderão auxiliar na elaboração de estratégias mais eficientes que visem à redução dos casos de infecção, uma vez que a partir dos perfis moleculares é possível inferir relações genéticas existentes entre os diferentes clones, detectar o fluxo gênico e traçar rotas de dispersão da infecção no rebanho (KAPUR et al., 1995).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento do perfil molecular dos *Staphylococcus aureus* auxilia na melhor compreensão dos estudos epidemiológicos de dispersão destes patógenos nas propriedades rurais objetos desta investigação.

Os resultados obtidos corroboram na identificação dos principais pontos de transmissão das estirpes de *S. aureus* no fluxograma de produção leiteira, e a participação dos bovinos leiteiros como importantes reservatórios destes microrganismos.

Tais achados corroboram, ainda, com a imperiosa necessidade da adoção de algumas medidas voltadas para o estabelecimento de um programa de controle da mastite nessas propriedades, dentre as quais destacam-se:

- a utilização do CMT para a detecção dos casos de mastite subclínica;
- o estabelecimento de uma linha de ordenha, onde os animais sadios devem ser ordenhados antes dos animais infectados;
- a realização da antisepsia dos tetos, por meio da utilização do pré e do pós-dipping;
- a correta desinfecção dos insufladores das ordenhadeiras mecânicas, assim como dos latões de leite e dos tanques de expansão comunitários.

7. CONCLUSÕES

7.1. Os pontos de colheita de amostras que apresentaram maior frequência de isolamento de estirpes de *Staphylococcus aureus* foram os óstios papilares (31,1%), o leite das vacas reagentes ao CMT (21,7%), os insufladores das ordenhadeiras mecânicas (21,7%), o leite dos latões (6,6%) e o leite contido nos tanques de expansão comunitários (5,6%).

7.2. Houve heterogeneidade genética entre as 103 estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas, uma vez que foram identificados 32 pulsotipos diferentes.

7.3. O pulsotipo 1 foi o que apresentou maior similaridade, entre as estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas nos diferentes pontos do fluxograma de obtenção do leite.

7.4. A maior frequência de isolamento do pulsotipo 1 das estirpes de *Staphylococcus aureus* foi observada nos óstios papilares (10,6%), seguido pelo leite das fêmeas reagentes ao CMT (5,8%) e insufladores das ordenhadeiras mecânicas (3,8%), evidenciando, portanto, a importância desses pontos no mecanismo de transmissão desses agentes nas propriedades estudadas.

8. REFERÊNCIAS¹

ADESIYUN, A.A.; WEBB, L.A.; ROMAIN, H.I. Relatedness of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk and human handlers in dairy farms in Trinidad. **Journal of Veterinary Medicine**, Texas, v.44, n.9, p.551-556, 1997.

ALVIM, R.S.; LUCCHI, B.B.; MARTINS, M.C. **Cenário para o agronegócio do leite no Brasil: a visão do setor primário**. In: FÓRUM DAS AMÉRICAS: LEITE E DERIVADOS. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009, cap.10.

AMARAL, L.A. et al. Ocorrência de *Staphylococcus sp*, em água utilizada em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.5, p.620-623, 2003.

AMARAL, L.A. et al. Qualidade da água em propriedades leiteiras como fator de risco à qualidade do leite e a saúde da glândula mamária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.4, p.417-421, 2004.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 1219p.

ARAÚJO, M.L.C.; ANDRIOLI, J.L. *Staphylococcus aureus* resistance patterns to antimicrobials and penicilinase among strains isolated from apparently healthy lactating cows. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v.1, n.27, p.60-63, 1996.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas: NRB-6023, agosto/2002

BARROS, C.S.R.M.; SIMÃO FILHO, P. **Perspectivas para o agronegócio do leite: a visão da indústria.** In: FÓRUM DAS AMÉRICAS: LEITE E DERIVADOS. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009, cap.9.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução Normativa n.22, de 07 de Julho de 2009. Normas técnicas para utilização de tanques comunitários.** Brasília; 2009. 3p. (Instrução Normativa n.22, 2009).

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução Normativa n.51, de 18 de Setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade, Qualidade, Coleta e Transporte de Leite.** Brasília; 2002. 48p. (Instrução Normativa n.51, 2002).

BRITO, J.R.F. et al. **Segurança e qualidade do leite.** In: EMBRAPA GADO DE LEITE: 30 ANOS DE PESQUISA E CONQUISTAS PARA O BRASIL. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2006, cap.9.

BRITO, J.R.F. **Mitos e realidade sobre qualidade e segurança do leite.** In: FÓRUM DAS AMÉRICAS: LEITE E DERIVADOS. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009, cap.2.

BRITO, J.R.F.B.; BRITO, M.A.V.P. **Qualidade higiênica do leite.** Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL-ADT, 1998.17p. (Documentos, 62).

BRITO, M. A. V. P. et al. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, n.1, p.39-44, 1998.

BRITO, M.A.V.P. et al. Padrão de infecção de intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.51, p.129-135, 1999.

BRITO, M.A.V.P. et al. **Qualidade do leite armazenado em tanques de refrigeração comunitários.** In: ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS, PROCESSUAIS E DE POLÍTICAS PÚBLICAS PARA PRODUÇÃO DE LEITE EM BASES SUSTENTÁVEIS. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003, cap.2.

COLLINS, D.M. et al. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.40, n.1-2, p.83-94, 1994.

COSTA, E.O. et al. Avaliação da terapia de mastite clínica: eficácia terapêutica medida em número de dias em tratamento. **NAPGAMA**, Pirassununga, v.2, n.2, p.10-14, 1999.

DINGWELL, R.T. et al. Association of cow and quarter-level factors at drying-off with new intramammary infections during the dry period. **Preventive Veterinary Medicine**, v.63, n.1-2, p.75-89, 2004.

ELIAS, A.O. **Detecção molecular de *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão.** 2007. 91p. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.

FAGUNDES, H. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7 em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo.** 2006. 107p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

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

FERREIRA, L.M. **Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* envolvidas em casos de mastite bovina.** 2008. 88p. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite.** 2. Ed. São Paulo: Lemos Editorial. 2001. 175p.

FORSMAN, P.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. **Microbiology**, London, v.143, n.11, p.3491-3500, 1997.

FOX, L.; GAY, J. Contagious Mastitis. In: E. Hunt, K. L. Anderson (eds.): **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.** W.B. Saunders Company, Philadelphia, v.9, n.3, p.475-487, 1993.

GARCIA, M. L.; MORENO, B.; BERGDOLL, M.S. Characterization of staphylococci isolated from mastitis cows in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, n.3, p.584-553, 1980.

HARMON, R. J. et al. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. **National Mastitis Council**, Arlington. 34p. 1990.

HIPOLITO, O.; FREITAS, M.G.; FIGUEIREDO, J.B. **Doenças infecto-contagiosas dos animais domésticos**. 4. Ed. São Paulo: Edições Melhoramentos, 1965. p.26-37.

INGAWA, K.; ADKINSON, R.; GOUGH, R. Evaluation of gel teat cleaning and sanitizing compound status of the goat udder. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.59, p.21-28, 1992.

KAPUR, V. et al. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.2, p.376-380, 1995.

KIM, J. W. Studies on bacteriological condition in milking environment. **Korean Journal of Dairy Science**, v.2, n. 17, p.113-122, 1995.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P.R. et al. (eds.): **Manual of clinical microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p.264-282.

LANGE, C. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.67, n.2, p.127-141, 1999.

LANGONI, H. Mastite bovina: conceitos e fundamentos. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 4., 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: FMVZ – UNESP. 2007. p.8-17.

LUKINMAA, S. et al. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v.112, n.12, p.908-929, 2004.

Mac FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1976. 312p.

MAGALHÃES et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.64, n.2, p.155-161, 2005.

MARTINEAU, F. et al. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n.3, p.618-623, 1998.

McDONALD, J. et al. Studying the effects of backflushing milking units. **Veterinary Medicine**, Beltsville, v.88, n.4, p.382-386, 1993.

McDOUGAL, L. K. et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacilin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United: Establishing a National Database. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.11, p.5113-5120, 2003.

MELO, P. C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina**. 2008. 103p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.

MEYER, R.; LUTHY, J.; CANDRIAN, U. Direct detection by polymerase chain reaction (PCR) of *Escherichia coli* in water and soft cheese and identification of enterotoxigenic strains. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.13, n.6, p.268-271, 1991.

MURRAY, P.R. et al. **Medical Microbiology**. 3. Ed. Mosby-Year Book. p.175-188, 1998.

MYLLYS, V.; RIDELL, J.; BJORKROTH, I.; PYORALA, S.H.K. Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.57, n.1-2, p.245-251, 1997.

OLIVEIRA, R. P. **Epidemiologia Molecular da Mastite Bovina causada por *Staphylococcus aureus***. 2001. 44p. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2001.

PEREIRA et al. Mastite subclínica em bovinos leiteiros do Sul de Minas Gerais. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 4., 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: FMVZ – UNESP. 2007. p.92.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Campinas, Editora Milkbizz, 2002. 188p.

PHUEKTES, P.; MANSELL, P.; BROWNING, G.F. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.70, n.2, p.149-155, 2003.

PRATA, M.C.A. et al. **Saúde animal**. In: EMBRAPA GADO DE LEITE: 30 ANOS DE PESQUISA E CONQUISTAS PARA O BRASIL. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2006, cap.6.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Caprinos e Equinos**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. 1737p.

RIBEIRO, M.T.; TEIXEIRA, S.R.L. Qualidade do leite em tanques de expansão individuais ou comunitários. **Glória Rural**, Rio de Janeiro, v.3, n.38, p.28-35, 2000.

ROBERSON, J. R. et al. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.77, n.11, p.3354-3364, 1994.

RUEGG, P.L. Contagem de células somáticas como ferramenta para avaliação, controle e tratamento de mastite. In: Curso novos enfoques na produção e reprodução de bovinos, 5., 2001, Uberlândia. **Anais...** Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo/CONAPEC Junior, 2001. p.25-33.

SANTOS, F.G.B. **Estudo epidemiológico molecular e de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* associados à mastite bovina em propriedades de exploração leiteira dos estados de São Paulo e Pernambuco.** 2009. Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SANTOS, F.G.B. et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **NAPGAMA**, Pirassununga, v.6, n.1, p.19-23, 2003.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Manejo de ordenha visando o controle de mastite e a melhoria da qualidade do leite. In: **ESTRATÉGIAS PARA CONTROLE DE MASTITE E MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE.** 1. Ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2007. p.78-94.

SANTOS, M.V. **Boas práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite.** In: O BRASIL E A NOVA ERA DO MERCADO DO LEITE – COMPREENDER PARA COMPETIR. Piracicaba: Agripoint Ltda, 2007, p.135-154.

SANTOS, M.V. Impacto econômico da mastite bovina. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 22, n. 131, p.46-50, 2003.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Granelização e resfriamento do leite e seu impacto sobre a qualidade. **Leite & Derivados**, São Paulo, n.71, p.35-44, 2003.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.130, n.5, p.199-204, 1957.

SINGH, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.19, n.3, p.512-530, 2006.

SMITH, K.; HOGAN, J. Environmental Mastitis. In: E. Hunt, K. L. Anderson (eds.): **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.** W.B. Saunders Company, Philadelphia, v.9, n.3, p.489-498, 1993.

SMITH, T.H.; FOX, L.K.; MIDDLETON, J.R. Outbreak of mastitis caused by one strain of *Staphylococcus aureus* in a closed dairy herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.212, n.4, p.553-556, 1998.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification.** San Francisco: W. H. Freeman, 1973. 573p.

SOUTO, L.I.M. **Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo.** 2006. 84p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n.9, p.2233-2239, 1995.

TENOVER, F.C. et al. How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Washington, v.18, n.6, p.426-439, 1997.

TONDO, E.C. et al. Assessing and analyzing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.46, n.12, p.1108-1114, 2000.

VAN BELKUM, A. et al. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis of SmaI macrorestriction fragments: a multicenter study. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.6, p.1653-1659, 1998.

ZADOKS, R.N. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n.11, p.3894-3902, 2002.

ZAFALON, L.F. et al. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.15, n.1, p.56-65, 2008.

ZECCONI, A.; PICCININI, R. Teoria e prática de controle de mastites por *Staphylococcus aureus*. **NAPGAMA**, Pirassununga, v.5, p.4-11, 1999.