

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**DETECÇÃO MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DE
Staphylococcus aureus EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO
OBTIDAS DE TANQUES DE EXPANSÃO - CORRELAÇÃO COM A
PRESENÇA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS**

DEOLINDA MARIA VIEIRA FILHA CARNEIRO

Botucatu – SP

Novembro de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DETECÇÃO MICROBIOLÓGICA E MOLECULAR DE
***Staphylococcus aureus* EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO**
OBTIDAS DE TANQUES DE EXPANSÃO - CORRELAÇÃO COM A
PRESENÇA DE RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS

DEOLINDA MARIA VIEIRA FILHA CARNEIRO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, Área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. As. Dr. Paulo Francisco Domingues
Co-Orientador: Prof. Adj. Dr. João Pessoa Araújo Júnior

Botucatu – SP

Novembro de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Carneiro, Deolinda Maria Vieira Filha.

Detecção microbiológica e molecular de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite bovino obtidas de tanque de expansão – Correlação com a presença de resíduos de antibióticos / Deolinda Maria Vieira Filha Carneiro. – Botucatu, 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Paulo Francisco Domingues

Co-orientador: João Pessoa Araújo Junior

Assunto CAPES: 50502000

1. Reação em cadeia de polimerase. 2. Leite – Qualidade. 3. Estafilococos áureos. 4. Bovino de leite.

Palavras-chave: Baird-Parker; Mastite; PCR; Petrifilm; Qualidade de leite; Resíduos de antibióticos; *Staphylococcus aureus*.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autora: CARNEIRO, DEOLINDA MARIA VIEIRA FILHA

Título: Detecção microbiológica e molecular de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão - correlação com a presença de resíduos de antibióticos.

Data: 23/11/2009

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Paulo Francisco Domingues – Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – **UNESP**

Prof. Dr. Hélio Langoni

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – **UNESP**

Prof. Dr. José Paes de Almeida N. Pinto

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu – **UNESP**

Prof. Dr. Adil Knackfuss Vaz

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Centro de Ciências Agro-Veterinárias – **UDESC**

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - **USP**

Dedicatória

Ao melhor companheiro que meus caminhos poderiam ter, meu marido, meu
melhor amigo e meu grande amor,

Elinton W. Carneiro.

Aos filhos que me ensinam a viver,

João Victor e Nicolas.

À filha gerada durante este curso – prova substancial da existência de
Deus,

Betina.

Após tantas caminhadas, pude concluir. . . .

*Não há lugar como o aconchego morno
dos braços de quem se ama.*

Dedico!

Agradecimientos

Agradecimentos

Ao bondoso *Deus* que guia a minha vida e a de minha família.

Aos meus pais *Zaul* (in memorian) e *Deolinda* – à educação que me deram, baseada em exemplos. Por me ensinarem a amar os animais.

Ao meu marido e filhos, *Elinton, João Victor, Nicolas e Betina*. Pelo apoio e amor incondicionais. Pela força e sabedoria de nossa união. Pela convicção de que o futuro é plantado dia a dia e colhido eternamente.

À **Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu** - pela oportunidade oferecida.

Ao meu orientador **Prof. Paulo Francisco Domingues**. Eterna gratidão! Pela confiança depositada em mim e em meu trabalho. E, segundo suas palavras, em sua sábia e serena humildade... “Obrigada pela amizade”. Isso é muito mais do que uma orientação ...

Ao meu co-orientador **Prof. João Pessoa**. Inteligente, solícito. Equilibrado.

Ao **Prof. Hélio Langoni**. Exigente, cuidadoso . Sábio.

Aos **demaís Professores, funcionários, alunos e estagiários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública**. Seus exemplos me possibilitaram ver mais longe...

Aos alunos de pós-graduação:

- Aos residentes do Laboratório de Zoonoses: *Lucilene Camossi* (a meiga “Dulce”), *Haroldo Greca Jr.* (“Doldinho”), *Leila Ullmann, Felipe Guimarães*. Obrigada pelo apoio, trabalho, cooperação, amizade. Os encontros da “confra” foram o acalento à minha saudade e à minha solidão.

- *Marcella Troncarelli*, companheira de filosofia de vida... cuja família maravilhosa é um espelho de sua alma. Obrigada pelas palavras, compreensão, carinho... pelo apoio na realização da PCR. Sua contribuição e seu apoio foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Sua amizade é inestimável para mim.

- *Patricia Y. Faccioli*, tão jovem e tão sábia! Disciplinada, organizada, honesta. Correta em tudo que faz. Longas horas de convívio nos calorosos finais de semana do laboratório da NUPEMAS... Aprendi muito com você, amiga.

- *Ana Paula Correa*..... Quantas horas de conversa.... Obrigada querida.

- *Cristina Perito Cardoso*, e o amor pelos primatas (rs)... a vida nos une novamente!

Aos **demais alunos de pós-graduação**... todos eternamente guardados em meu coração... especialmente Nair, Audrey, Luciano, Tatiana, Amanda, Thiago, Betina, Luciana, Melissa, Fábio, Priscila, Simone, Juliana, Rodrigo, Mariana, Bruna Silva, Bruna Sanchez....

À **Margarete Castanha**, grande amiga, cuida de meus filhos em minha ausência.

À FAPESP (Processo 2008/02935-9), pelo apoio financeiro.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

Este período em Botucatu, convivendo com tantas e diferentes pessoas, com seus problemas e habilidades, fez com que este doutorado significasse também muito em minha vida pessoal. Este “estágio” que estas pessoas fizeram em minha vida – e vice-versa – permitiu um crescimento maravilhoso. A distância do meu marido e filhos... me sensibilizou acima da normalidade, me permitindo amar cada um destes com quem convivi. Os professores, funcionários, as mulheres da limpeza, os técnicos, os colegas...

Sou muito grata à vida, por me oferecer tantos caminhos de crescimento.

Muito Obrigada!!

"Pois onde estiver o vosso tesouro, aí estará também o vosso coração"

(Mateus 6.21).

Resumo

Resumo

CARNEIRO, D.M.V.F. **Detecção microbiológica e molecular de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão – Correlação com resíduos de antibióticos.** Botucatu, 2009. 82p. Tese – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, São Paulo.

Entre os diferentes tipos de patógenos que podem ser transmitidos pelo leite e produtos lácteos, *Staphylococcus aureus* é um dos mais importantes. Então, torna-se fundamental sua pesquisa em produtos lácteos destinados ao consumo humano. A presente tese investigou 100 amostras de leite do tanque de expansão de 50 fazendas leiteiras no Oeste de Santa Catarina, usando o método de cultivo em Baird-Parker, obtendo 42% de amostras positivas para a presença do agente. A análise das condições de manejo de ordenha não apresentou correlação com a presença do agente nas amostras de leite. A metodologia de referência para detecção de *S. aureus* recomenda a utilização do ágar Baird-Parker (BP). No entanto, outros meios de cultura podem produzir resultados em um tempo mais curto, como *Petrifilm*® *Staph Express Count System* (PSE) e da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). Assim, este estudo também teve como objetivo comparar a eficiência desta metodologia para a detecção de *S. aureus* no leite dos tanques. Os resultados mostraram que a PCR – utilizando os primers Sa442-1 e Sa442-2 – não apresenta limiares de Sensibilidade (53,8), Especificidade (36,5) VPP (23), VPN (69,2), Acurácia (41,0) e Coeficiente de Kappa (-0,067) que justifiquem a sua utilização como método de detecção de *S. aureus* em amostras de leite de tanque, quando comparado ao cultivo microbiológico em BP. Resultado semelhante foi obtido com o uso do método PSE (100; 14,9; 29,2; 100; 37; 0,083 respectivamente), cuja baixa Especificidade sugeriu incluir também outros estafilococos coagulase-positivos não *S. aureus*. Investigou-se também a presença de resíduos de antibióticos com Delvotest®. No entanto, não pôde ser

estabelecida a correlação entre os resultados dos exames microbiológicos e PCR com os resultados de resíduos de antimicrobianos, devido à ausência desses resíduos nas amostras de leite avaliadas.

Palavras-chave: Baird-Parker; Mastite; PCR; Petrifilm; Qualidade de leite; Resíduos de antibióticos; *Staphylococcus aureus*.

Abstract

Abstract

CARNEIRO, D.M.V.F. **Microbiological and molecular detection of *Staphylococcus aureus* from bovine bulk tank samples – correlation with antibiotic residues.** Botucatu, 2009. 82p. Thesis – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, São Paulo.

Among the different types of pathogens that can be transmitted by milk and dairy products, *Staphylococcus aureus* is one of the most important. Then, it becomes fundamental its research in dairy products for human consumption. The present thesis investigated 100 samples of bulk tank milk from 50 dairy farms in the western part of Santa Catarina, by using the method of cultivation in Baird-Parker, obtaining 42% positive samples to the presence of the agent. The analysis of the management conditions of milking doesn't showed correlation with the presence of *S. aureus* in the milk samples. The reference methodology for *Staphylococcus aureus* detection recommends the use of the Baird-Parker agar (BP). However, others culture media may produce results in a more shorter time, as *Petrifilm*® *Staph Express Count System* (PSE) and the Polymerase Chain Reaction (PCR). So, this study also aimed to compare the efficiency of the fore cited methodology for the detection of *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk. The findings showed that PCR – using the primers Sa442-1 e Sa442-2 - doesn't show thresholds of sensitivity (53,8), specificity (36,5), PVP (23), PVN (69,2), Accuracy (41,0) and Kappa Coefficient (-0,067) that justify their use as a method of detection of *S. aureus* in bulk tank milk samples, when compared to microbiological cultivation in BP. Similar results were obtained with the use of PSE

method (100; 14,9; 29,2; 100; 37; 0,083 respectively), whose low threshold of Specificity (14,9) suggested include also other staphylococci coagulase-positive other than *S. aureus*. In addition, antibiotic residues were investigated with Delvotest[®]. However, could not be established the correlation between the results of microbiological tests and PCR with the results of antimicrobial residues, due to the absence of these residues in the milk samples evaluated.

Keywords: Baird-Parker, bovine mastitis, PCR, petrifilm, *Staphylococcus aureus*.

Lista de Quadros

Lista de Quadros

Quadro	Página
QUADRO 1 – Produção de leite em 2007 – Brasil, Santa Catarina e Região de Xanxerê.....	6
QUADRO 2. Seqüência das bases, localização dentro dos genes, e tamanhos previstos dos produtos amplificados pelos primers oligonucleotídeos <i>Staphylococcus aureus</i> -específicos.....	34

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Figura	Página
FIGURA 1. - Região de Xanxerê - Oeste do Estado de Santa Catarina.....	6
FIGURA 2. - Propriedade leiteira localizada na região oeste de Santa Catarina.....	21
FIGURA 3. - Gado leiteiro criado em propriedade localizada na região oeste de Santa Catarina.....	21
FIGURA 4. Sistema de ordenha canalizado, em propriedade leiteira localizada na região oeste de Santa Catarina.....	22
FIGURA 5. - Exemplo de colônias típicas (setas) em Ágar Baird-Parker. As colônias pretas são circundadas por um halo de precipitação (interno) e outro transparente (externo).....	24
FIGURA 6. Ágar sangue bovino apresentando diferentes linhagens de <i>Staphylococcus</i> sp., hemolíticas e não hemolíticas, isoladas de amostras de leite de tanques de expansão.....	25
FIGURA 7. Fluxograma da detecção microbiológica de <i>S. aureus</i> clássica – padrão ouro, das amostras de leite de tanques de expansão.....	26
FIGURA 8. Exemplo de resultado positivo (seta) no teste de coagulase livre em tubo....	27
FIGURA 9. Exemplo de resultado positivo (seta) no teste de produção de acetoina.....	28
FIGURA 10 - Diluição das amostras, placas de Petri com Baird Parker e placas Petrifilm.....	29
FIGURA 11. A. Colônias de <i>S. aureus</i> isoladas em <i>Petrifilm® Staph Express Count System</i> (3M – EUA), a partir de amostras de leite em diferentes diluições. B. Colônias de <i>S. aureus</i> apresentando halo rosado pink, identificadas após incubação com disco de DNase.....	30
FIGURA 12. Padrões de coloração para leitura da detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite, pelo <i>Delvotest®</i>	33
FIGURA 13. Leitura do <i>Delvotest®</i> : na ausência de resíduos de antimicrobianos ocorre a multiplicação bacteriana, produção de ácido e alteração da cor original do indicador (de púrpura para amarelo).....	33
FIGURA 14. Visualização dos produtos amplificados em gel de agarose a 1,5%.....	35
FIGURA 15. Frequência de isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> , em meio Baird-Parker, a partir de amostras de leite de tanques de expansão, agrupados de acordo com a CCS (célis/mL x 10 ³).	

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Tabela	Página
TABELA 1. Tabela 1 – Estimativa da associação entre características da fazenda/rebanho e isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> , em meio Baird-Parker.....	40
TABELA 2. Frequências de detecção de <i>S. aureus</i> em 100 amostras de leite obtidas de tanques de expansão de propriedades leiteiras do oeste de Santa Catarina, segundo os três métodos diagnósticos utilizados.....	46
TABELA 3. Valores de mediana e quartis de UFC detectados pelo método de cultivo em meio Baird-Parker e pelo <i>Petrifilm</i> [®] <i>Staph Express Count System</i> , comparados pelo Teste de Mann-Whitney.....	46
TABELA 4. Correlação entre os valores de UFC detectados pelo método de cultivo em meio Baird-Parker e pelo <i>Petrifilm</i> [®] <i>Staph Express Count System</i>	47
TABELA 5. Resultado da prova da coagulase e açúcares (maltose e trealose) nas colônias típicas e atípicas selecionadas em Baird-Parker.....	49
TABELA 6. Avaliação da acurácia dos métodos <i>Petrifilm</i> [®] <i>Staph Express Count System</i> e PCR, frente ao cultivo tradicional, em meio Baird-Parker (padrão-ouro).....	51

Sumário

Sumário

Assunto	Página
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.2. Mastite Bovina.....	6
2.3. <i>Staphylococcus</i> spp e <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.4. Aspectos epidemiológicos da mastite por <i>S. aureus</i>	9
2.5. Resíduos de antibióticos e Delvotest®	13
2.6. Sistema Petrifilm®	14
2.7. Reação em Cadeia da Polimerase	15
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Dados das Propriedades.....	20
4.2. Colheita das Amostras.....	22
4.3. Análise Microbiológica.....	23
4.3.1. Detecção Microbiológica de <i>S. aureus</i> clássica – padrão ouro.....	23
4.3.1.1. Caracterização das amostras de <i>S. aureus</i>	25
4.3.1.1.1. Teste de coagulase livre em tubo.....	27
4.3.1.1.2 Teste da Catalase.....	27
4.3.1.1.3. Teste para verificar a produção de acetoina (Voges-Proskauer).....	27
4.3.1.1.4. Teste da utilização dos carboidratos (maltose e trealose)..	28
4.3.2. Detecção Microbiológica de <i>S. aureus</i> - <i>Petrifilm® Staph Express Count System</i>	29
4.4. Amostra bacteriana padrão de <i>S. aureus</i> – controle positivo.....	30
4.4.1. Contaminação experimental da solução salina e cultivo microbiológico.....	30
4.4.2. Contaminação experimental do leite e cultivo microbiológico.....	30
4.5. Contagem de Células Somáticas (CCS).....	31
4.6. Detecção de resíduos de antibióticos.....	32
4.7. Técnica de biologia molecular para a pesquisa de <i>S. aureus</i>	33

4.7.1. Pesquisa de DNA de <i>S. aureus</i> no leite de amostras de tanque de expansão.....	
4.7.1.1. Protocolo de Extração dos ácidos nucléicos a partir de leite bovino.....	33
4.7.1.2. Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) para a detecção de <i>S. aureus</i>	33
4.7.1.3. Amplificação do DNA de <i>S. aureus</i>	34
4.7.1.4. Visualização do produto amplificado.....	34
4.7.1.5. Pesquisa de DNA de <i>S. aureus</i> em solução salina e leite experimentalmente contaminados.....	35
4.7.1.6. Controles.....	36
5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
6.1.Características das propriedades avaliadas e freqüências de <i>S. aureus</i> segundo parâmetros epidemiológicos.....	40
6.2. Resultados de UFC.....	40
6.3. Resultados da pesquisa de resíduos de antimicrobianos.....	46
6.4. Acurácia da PCR e do Petrifilm com relação ao cultivo em Baird-Parker.....	49
6.4.1. Petrifilm®	51
6.4.2. PCR.....	53
7. CONCLUSÕES.....	55
8. REFERÊNCIAS.....	58
Anexo.....	60
	72

Introdução

1 - Introdução

O leite e seus derivados desempenham um papel nutricional importante para o homem, particularmente nos primeiros anos de vida, uma vez que fornecem proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais necessários ao desenvolvimento do organismo. Sabe-se que o consumo de um litro de leite por dia supre todas as necessidades protéicas de crianças com até seis anos de idade e mais de 50% do conteúdo de proteínas requisitados pelos adultos. Em relação ao cálcio, o consumo de um litro de leite diário supre 100% das necessidades diárias deste mineral (FONSECA, 2000).

Estas qualidades tornam o leite um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de microrganismos potencialmente patogênicos ao homem e que acarretam prejuízos econômicos aos produtores e à indústria. É de se esperar, portanto, uma grande preocupação em assegurar a integridade e a qualidade intrínseca do leite e dos produtos lácteos destinados ao consumo humano, sob o ponto de vista de Saúde Pública.

Dentre os diversos tipos de microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos pelo leite e derivados, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, cuja importância na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos decorre de sua alta produção, nos alimentos contaminados, de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares (ZECCONI e HAHN, 2000). Deve-se ressaltar que é fundamental a realização de análises microbiológicas periódicas, com vistas à pesquisa de bactérias do gênero *Staphylococcus* no leite entregue nas usinas de beneficiamento (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004), o que nem sempre ocorre.

A qualidade do leite entregue aos laticínios e oferecida para o consumo depende de sua produção nas propriedades leiteiras, e é diretamente relacionada à sanidade das glândulas mamárias e prevalência das mastites.

O impacto gerado pela presença de *Staphylococcus aureus* no leite está justamente no risco potencial à Saúde Pública, uma vez que muitos isolados deste microrganismo são produtores de enterotoxinas potentes. Na literatura

são descritos inúmeros surtos de toxinfecção causados pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas estafilocócicas. Justamente devido ao risco à Saúde Pública, estabeleceu-se em vários países a obrigatoriedade da sua pesquisa e quantificação como parte das ações de fiscalização sanitária de órgãos governamentais. Sua presença em alimentos pode indicar deficiência de processamento ou condições higiênicas inadequadas (SILVA e GANDRA, 2004).

A mastite bovina por *S. aureus* é de difícil tratamento, devido às características de virulência do agente e sua capacidade de penetrar nas células epiteliais mamárias, onde permanece inatingível aos antibióticos. Sua resistência a muitos antibióticos, aliada à sua tendência de apresentar quadros subclínicos e crônicos, e ao uso indiscriminado de medidas terapêuticas, determina a presença de resíduos no leite. Há uma correlação positiva entre a presença de mastite por *S. aureus* no rebanho e a ocorrência de resíduos de antibióticos no leite. Estes resíduos no leite para consumo humano também representam problema à Saúde Pública determinando problemas como reações alérgicas importantes, e contribuindo principalmente ao desenvolvimento e/ou transmissão de resistência bacteriana (RUEGG, 2005).

Um eficiente controle para a mastite bovina requer métodos sensíveis, rápidos e específicos para detectar e identificar os microrganismos que causam consideráveis perdas para a indústria leiteira. Além disto, uma acurada e rápida detecção de *S. aureus* também é de interesse por permitir acesso à qualidade e biossegurança do leite.

O propósito deste experimento foi testar e comparar dois métodos de rápida execução, sensíveis e específicos para a detecção de *S. aureus* no leite, com o método tradicional de isolamento de *S. aureus* em amostras de leite. Pretendeu-se também estabelecer uma possível relação entre a presença de resíduos de antibióticos no leite de tanques com a diminuição da acuidade e sensibilidade das provas microbiológicas à detecção de *S. aureus*, o que poderia determinar falsos negativos pela inibição do crescimento bacteriano.

Revisão de Literatura

2 - Revisão de Literatura

2.1 Santa Catarina no contexto da produção leiteira

O leite é um dos produtos mais importantes da agropecuária. Além da importância econômica expressa pela geração de empregos e renda, desempenha um papel considerável na alimentação humana. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a aquisição de leite cru feita pelos estabelecimentos industriais que funcionam sob algum tipo de inspeção foi de 4,285 bilhões de litros no 3º trimestre de 2009. A principal região em aquisição de leite cru é a Sudeste, captando 40,7% do volume nacional, onde Minas Gerais é o principal estado, representando 26,4% da participação/Brasil. A seguir vem a região Sul, representando 30,3% do volume total de leite captado (IBGE).

A produção de laticínios em Santa Catarina teve início no século XIX, com a vinda dos imigrantes europeus de origem germânica que passaram a desenvolver esta atividade na região do Vale do Rio Itajaí. Neste período a produção estava concentrada nas mãos de pequenos produtores rurais. No decorrer dos anos 80 a indústria se volta para o Oeste Catarinense e finalmente nos anos 90, esta região se consolida como pólo agro-industrial, com 33 indústrias de leite inspecionadas (SOUZA, 2008). Entre 1996 e 2006 o crescimento da produção na região foi de 157%. Segundo Stock et al. (2008), esse crescimento se deu, não apenas pelo aumento no número agregado de vacas (6,3% ao ano), mas especialmente por incrementos na produtividade média por vaca, em 3,4% ao ano. E este fato é constatado ao analisar que o Estado apresenta a maior produção de litros de leite por vaca/ano, no Brasil.

Em Santa Catarina, a região Oeste – onde se encontra a região de Xanxerê, local da realização deste estudo – é responsável por quase três quartos da produção estadual de leite, concentrando 58% dos produtores estaduais. Estes produtores possuem 63% do rebanho leiteiro que, em 2006, responderam por 73% da produção do estado (IBGE). A Figura 1 e o Quadro 1

contextualizam a produção leiteira na região de Xanxerê, Santa Catarina e Brasil, no ano de 2007.

QUADRO 1 – Produção de leite em 2007 – Brasil, Santa Catarina e Região de Xanxerê.

	Vacas ordenhadas	Quantidade (1000 litros)	Produtividade (litros/vaca/ano)
Brasil	21 122 273	26 133 913	1 237
Santa Catarina	803 864	1 865 568	2 321
Região de Xanxerê	54 798	191 258	3 490

Adaptado de dados do IBGE.



FIGURA 1 – Mapa de Santa Catarina – Regional. Região de Xanxerê, localizada no Oeste do Estado.

2.2 Mastite Bovina

A mastite bovina é a inflamação do tecido mamário. É caracterizada por alterações físico-químicas e bacteriológicas do leite, por alterações patológicas da glândula mamária, evidenciadas pelo aumento de células somáticas do leite e alterações do tecido glandular mamário (DOMINGUES, 1996; RADOSTITS et al., 2007). É classificada quanto à forma de apresentação em clínica e

subclínica e quanto à forma de transmissão, em contagiosa e ambiental (MENDONÇA et al., 1999). Langenegger et al (1981) relatam que a forma subclínica é mais prejudicial que a forma clínica, pela falta de sintomas ou sinais, determinando perdas econômicas maiores devido à frequência de persistência do processo.

Os agentes etiológicos da mastite contagiosa necessitam do animal para a sobrevivência, pois se multiplicam na glândula mamária, canal do teto ou sobre a pele. A mastite é transmitida de uma vaca infectada para outra sadia, principalmente, durante a ordenha (COSTA, 1998; PRESTES et al., 2003). As mastites contagiosas se caracterizam por apresentar alta incidência de casos subclínicos, tendência a cronicidade e alta contagem de células somáticas (CCS).

Os métodos de detecção de mastite clínica e subclínica mais utilizados na sala de ordenha são o teste da caneca telada e o *California Mastitis Test* (CMT), respectivamente. O teste da caneca telada ou de fundo escuro deve ser realizado a cada ordenha nos primeiros jatos de leite. A visualização dos grumos no leite decorrente de alterações por depósitos de leucócitos permite o diagnóstico de formas clínicas de mastite. O contraste do fundo negro da caneca com os grumos facilita a visualização de alterações e o diagnóstico precoce (FURLONG e RIBEIRO, 2006). O CMT, idealizado por Schalm e Noorlander (1957), é capaz de detectar o processo inflamatório na glândula mamária e é internacionalmente aceito para diagnosticar a mastite subclínica a campo (COSTA et al., 1996). Campos (2000) acrescenta que este é um bom teste preditivo positivo.

Além da diminuição na produção leiteira, o leite mastítico representa um sério problema tecnológico para as indústrias beneficiadoras por possuírem um número aumentado de células somáticas, além de outras alterações físico-químicas (PRESTES et al., 2003) que determinarão diminuição no rendimento industrial.

Há que se considerar ainda os aspectos de saúde pública, pois o leite pode ser veículo de microrganismos potencialmente patogênicos ao homem,

seja pelo seu consumo direto “in natura”, seja pela ingestão de certos tipos de alimentos produzidos a partir do leite contaminado (DOMINGUES et al., 1998).

2.3 *Staphylococcus* spp e *Staphylococcus aureus*

Sabe-se que o principal problema que afeta os rebanhos leiteiros, mundialmente, é a mastite, freqüentemente de origem bacteriana (COSTA et al., 1992 e 1995; LANGONI et al., 1995 e 1998; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1999). Os *Staphylococcus* sp são os agentes etiológicos mais isolados em mastites (SANTOS et al., 1993; BRITO et al., 2002; RABELLO, 2003; ALMEIDA, 2005; CUNHA et al., 2006). Nesse gênero, a espécie *Staphylococcus aureus* é a mais prevalente em infecções de vacas leiteiras (WATTS, 1988; BRAMLEY et al., 1996; BRITO et al., 1999; WAAGE et al., 1999; BRITO et al., 2001; FREITAS et al., 2005).

O gênero *Staphylococcus* compreende diversas espécies e subespécies, que se encontram amplamente distribuídas na natureza, sendo principalmente encontrados na pele e membranas mucosas de aves e mamíferos (KLOOS e BANNERMAN, 1999). Desde a sua proposição em 1884 por Rosenbach, o gênero *Staphylococcus* tem sido classificado dentro da família Micrococcaceae. Foi somente na última década, com o avanço da biologia molecular, estudos genéticos, perfis de ácidos graxos, composição da parede celular e, principalmente, estudos com RNA ribossômico 16S que o gênero *Staphylococcus* foi incluído numa nova família: Staphylococcaceae (GARRITY e HOLT, 2001). Atualmente já são 40 espécies descritas dentro do gênero (BANNERMAN, 2003; EUZÉBY, 2007), a maioria coagulase-negativa.

Os estafilococos 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 crescer em meio contendo 10% de cloreto de sódio. São microrganismos mesófilos, com temperatura de desenvolvimento de 7 a 48°C, e pH de 4.0 a 10.0 (KLOOS e BANNERMAN, 1999).

Os estafilococos crescem rapidamente na maioria dos meios bacteriológicos. As colônias em meios sólidos são redondas, lisas, elevadas e brilhantes, com 2 a 3 mm de diâmetro, de coloração branca a amarelo-dourado, apresentando ou não halo de hemólise ao redor (QUINN et al., 2004). A capacidade de se desenvolver em meios contendo alta concentração de NaCl, além de possuírem certa tolerância ao telurito de potássio e cloreto de lítio são aproveitadas para o preparo de meios seletivos (CUNHA, 2007). À microscopia, apresentando a forma de cocos, cujo diâmetro varia de 0,8 a 1,0 μm , e arranjos semelhantes a cachos de uva, embora as células possam estar isoladas.

As espécies coagulase positivas *Staphylococcus intermedius* e coagulase variáveis *Staphylococcus hyicus* são particularmente importantes na medicina veterinária e junto com os *Staphylococcus aureus* são patógenos oportunistas em animais (KLOOS e BANNERMAN, 1999). Dentre as diferentes provas bioquímicas que podem ser utilizadas para a diferenciação destas espécies, estes mesmos autores propõem uma chave simplificada com os testes de produção de acetoina, utilização anaeróbica do manitol e produção de β -galactosidase.

O *Staphylococcus aureus* é positivo no teste DNase, hemolítico, fermentador de manitol e maltose, sensível à novobiocina e resistente à polimixina B (QUINN et al., 2004). O principal meio seletivo utilizado é o Baird Parker, onde *S. aureus* apresentam colônias negras, circundadas por um halo de precipitação (interno) e outro transparente (externo), quando típicos.

2.4 Aspectos Epidemiológicos da Mastite por S. aureus

A mastite causada por *Staphylococcus aureus* pode resultar em infecção que persiste por toda a vida do animal, considerando-se que as infecções estafilocócicas são caracterizadas pela habilidade em colonizar o tecido mamário e pela sobrevivência da bactéria no interior das células epiteliais. A persistência desta infecção é associada com algum tipo de prejuízo ao sistema imune, mediado por fatores tanto do hospedeiro quanto do agente (MATSUNAGA et al., 1993), o que contribui para a habilidade desta bactéria

em estabelecer infecções crônicas (BANNERMAN et al., 2004). Estes mecanismos de virulência contribuem para a baixa taxa de cura das mastites por este agente (SUTRA e POUTREL, 1994) devido também à sua elevada resistência aos antibióticos (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

S. aureus, de acordo com vários pesquisadores, é o principal agente infeccioso da mastite bovina (NADER-FILHO et al., 1983; NADER-FILHO et al., 1985; COSTA, 1998; LANGONI et al., 1998; MOTA et al., 2004), causador de mastite contagiosa de maior importância e de maior ocorrência em rebanhos mundiais (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). Coerentemente, é também, o microrganismo mais frequentemente isolado do leite cru (ZECCONI e HAHN, 2000).

Animais portadores podem constituir fonte de infecção permanente, permitindo a persistência de *S. aureus* durante toda a fase de lactação (FERREIRA et al., 2006). Brabes et al. (1999) relatam que em levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, *S. aureus* está presente em cerca de 50% das infecções da glândula mamária dos bovinos leiteiros.

S. aureus no indivíduo sadio é considerado um microrganismo comensal das narinas anteriores, pele úmida, boca e intestino. Porém, estes microrganismos apresentam propriedades que lhes permite uma rápida colonização e posterior invasão por meio de pequenas lesões na pele e mucosas, sendo que nas mastites, as mãos dos ordenhadores são consideradas como principais vias de transmissão (KLOOS, BANNERMAN, 2003; RODOLPHO, 2002).

Os quartos mamários infectados, a pele do úbere e dos tetos são os principais sítios de localização de *S. aureus*. Entretanto este agente pode ser isolado em outros locais, tanto em vacas e novilhas quanto no alimento, na sala de ordenha e nos bocais das ordenhadeiras, ressaltando a importância do manejo durante a ordenha na prevenção de sua transmissão (CUNHA et al., 2006; FERREIRA et al., 2006).

A aderência aos bocais das ordenhadeiras por *Staphylococcus* spp ocorre devido ao fato deste microrganismo ser capaz de produzir um mucopolissacarídeo extracelular amorfo (filme) que permite a agregação

bacteriana, levando à formação de um verdadeiro filme biológico. A produção do biofilme favorece a colonização desta bactéria nas superfícies plásticas e nos tecidos do hospedeiro (especialmente o epitélio da glândula mamária) e esta aderência é controlada por interações hidrofóbicas entre as bactérias e estas superfícies (NOVAK, 1999; MELO, 2008).

Estudos sobre a prevalência de *S. aureus* vêm sendo conduzidos mundialmente desde o início dos estudos sobre as mastites. Sua prevalência nas propriedades leiteiras é muito variada e dependente da adoção individual de medidas de controle e profilaxia das mastites, especialmente das contagiosas. Em levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, está presente em cerca de 50% das infecções da glândula mamária dos bovinos leiteiros (BRABES et al., 1999). Estima-se que 50 a 100% das propriedades estejam infectadas (RADOSTITIS et al., 2007).

No Brasil a prevalência de mastites por *S. aureus* tem sido investigada em várias regiões do país e reportada como alta, principalmente nas propriedades onde medidas de controle e prevenção de patógenos contagiosos são precárias. Mota et al. (2004) verificaram uma prevalência de 52,16% de amostras de leite positivas para *S. aureus* no estado de Pernambuco. Ferreira (2004) encontrou 77 estirpes de *S. aureus* isoladas de 40 vacas da raça holandesa, com mastite subclínica, no estado de São Paulo. Este mesmo autor encontrou quatro padrões distintos de *S. aureus* resistentes aos antimicrobianos e nove padrões de ribotipos diferentes em uma mesma propriedade, mostrando assim a heterogeneidade genética deste agente nas mastites bovinas.

Almeida et al. (2005), em propriedades em Minas Gerais, analisaram amostras provenientes de 96 rebanhos, sendo que a maior frequência de isolamento foi de *S. aureus* (64,55%). Costa et al. (2005) estudaram amostras de 87.039 glândulas mamárias de animais de 148 propriedades leiteiras nos estados de Minas Gerais e São Paulo, isolando em 8,1% *Staphylococcus* sp (55% coagulase positivos).

Magalhães et al. (2005) analisaram amostras de leite de vacas pertencentes a rebanhos de várias regiões do Estado do Rio de Janeiro entre

os anos de 2000 e 2004 e, de um total de 388 microrganismos identificados, o gênero *Staphylococcus* foi o de maior frequência no isolamento (30,7%). No interior de São Paulo, Zafalon et al. (2005) encontraram uma prevalência de 44,7% de estafilococos coagulase positiva dentre os microrganismos isolados.

Santos (2006), em Minas Gerais, ao analisar 134 amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica recorrentes, encontrou 90,24% de prevalência de *S. aureus*. No sul de Minas Gerais, Pereira et al. (2007) avaliaram a ocorrência de mastite subclínica em 31 rebanhos, verificando que entre as 2.368 vacas foram isolados 35,57% de *Staphylococcus* coagulase positivos. No Rio Grande do Sul, Gomes et al. (2007) encontraram uma prevalência de 29,2% de *S. aureus* em 21.271 amostras de leite de quartos mamários com mastite clínica ou subclínica, no período de 1972 a 2007.

Para reduzir o risco da presença de *S. aureus* e de outros microrganismos indesejáveis no leite cru é necessário implementar medidas para diminuir a prevalência das infecções mamárias. Deste modo, cabe aos setores de captação de leite das usinas e aos serviços de extensão, incrementarem o desenvolvimento das atividades de orientação e apoio aos produtores, com a finalidade de aprimorar as técnicas de produção e obtenção do produto, com destaque para os seguintes aspectos, segundo Oliveira et al. (1999): realização de testes periódicos para o diagnóstico individual de casos de mastite clínica nas vacas leiteiras; colheita de amostras e identificação laboratorial dos agentes infecciosos envolvidos nos casos de mastite; descarte do leite de vacas acometidas com infecções causadas por bactérias do gênero *Staphylococcus*, bem como de outros agentes infecciosos de importância em saúde humana; tratamento adequado dos quartos afetados com antimicrobianos, respeitando-se o intervalo de carência recomendado para a utilização do leite; limpeza e desinfecção criteriosas dos tetos dos animais, antes e depois da ordenha; provisão de quantidades suficientes de água potável para os diversos processos de obtenção do leite; e, manutenção dos cuidados gerais de higiene do estábulo leiteiro, incluindo a limpeza e desinfecção das instalações da sala de ordenha, ordenhadeiras e utensílios. Com relação às teteiras, a desinfecção após a ordenha de cada vaca é particularmente eficiente para o controle de *S. aureus* (FONSECA, 2000).

2.5 Resíduos de antibióticos e Delvotest[®]

Segundo o *National Mastitis Council Research Committee Report* (2004) o tratamento da mastite é a causa mais comum de resíduos de antibióticos no leite, e que o consumo destes resíduos poderia induzir variantes resistentes.

A principal fonte de resíduo de antibióticos no leite é o tratamento intramamário. É comum que somente o leite do quarto tratado seja descartado, mas pela circulação sangüínea e difusão entre as glândulas, já foi verificada a presença de resíduos também nos quartos não tratados de animais tratados por via intramamária (COSTA et al., 2000).

O leite dos animais com mastite difere, em composição e propriedades, do leite de animais sadios, podendo inclusive afetar a eliminação de antibióticos. O tempo de eliminação do antibiótico em quartos com mastite pode ser maior do que em quartos saudáveis (COSTA et al., 1999; RAIA et al., 1999). Raia (2001) verificou haver alta correlação entre o nível de ocorrência de mastite clínica e a presença de resíduo no leite armazenado em tanques resfriadores de propriedades leiteiras nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Este pesquisador refere que somente a informação do fabricante do medicamento quanto ao período de carência, algumas vezes, não é suficiente para garantir um leite livre de resíduo.

Os principais fatores que podem afetar a taxa de excreção e a presença de antibióticos no leite são a quantidade de leite produzida pelo animal e o intervalo de tempo entre o tratamento e a ordenha, os tipos de antibióticos e veículos utilizados, as vias de administração e as doses administradas (COSTA et al., 1999; RAIA Jr, 2006). Outro fato que vem determinando uma crescente preocupação é a recomendação internacional do tratamento preventivo com antimicrobianos no pré-parto, mesmo em primíparas, o que merece ser avaliado também como potencial fonte de resíduo de antimicrobiano no leite (COSTA et al., 2004).

A abordagem tradicional de controle de resíduos de antibióticos no leite preconiza a análise de amostras colhidas nas plataformas das usinas ou no tanque de armazenagem de leite nas propriedades rurais. Segundo a Instrução Normativa 51 de 2002 (MAPA), que trata sobre a legislação atual do leite e

seus derivados, o controle e monitoramento de resíduos de antimicrobianos é de responsabilidade dos laticínios ou indústria captadora.

Os testes de triagem mais utilizados são os de inibição do crescimento microbiano e testes rápidos específicos para determinados grupos de substâncias. O Delvotest[®] é um teste rápido de inibição do crescimento e da produção de ácido pelo microrganismo *Bacillus stearothermophilus* variedade *calidolactis*. É um teste simples, sensível e rápido. Seu uso é recomendado no programa de segurança da qualidade do leite e da carne existente nos EUA (CULLOR et al., 1994).

2.6 Sistema Petrifilm[®]

Diversos métodos bioquímicos têm sido utilizados para diferenciar os microrganismos provenientes de mastites. Os métodos de cultura que consistem do isolamento e testes bioquímicos destas cepas, são laboriosos e requerem no mínimo dois a três dias para a liberação do diagnóstico, e isto os torna limitados (CREMONESI et al., 2006).

O sistema *Petrifilm[®] Staph Express Count System* é um teste mais rápido que as metodologias clássicas para identificação e contagem de *Staphylococcus* em amostras de alimentos. Como não se baseia na produção de coagulase, o sistema provê o resultado em apenas 27 horas da incubação da amostra (SANT'ANA et al., 2002; TASSINARI et al., 2006). O “kit” *Petrifilm[®] Staph Express Count System* consiste em uma placa de contagem e um disco. A placa de contagem é um cartão de papel quadriculado revestido de polietileno e recoberto com nutrientes desidratados em um gel hidrossolúvel frio, constituído por meio de Baird-Parker modificado (meio seletivo e diferencial para *Staphylococcus aureus*, inclui em sua composição telurito de potássio e cloreto de lítio). O disco contém azul de toluidina, o qual facilita a visualização de deoxirribonuclease (DNase). Ao adicionar a amostra em teste (um mL) na placa de contagem, os nutrientes são imediatamente rehidratados, ocorre a solidificação do gel, após o que a placa estará pronta para ser incubada. Depois de transcorridas 24 horas de incubação a 37°C, conta-se o número de colônias vermelho-violetas, como sendo *S. aureus*. Na presença do

crescimento de colônias com outra coloração que não vermelho-violetas, adiciona-se o disco sobre a placa e incuba-se novamente por 3 horas a 37°C. Contam-se então as colônias que apresentarem um halo rosado *pink*, como sendo *S. aureus* (SIRBENAGEL et al., 2003).

2.7 Reação em Cadeia da Polimerase

A biologia molecular tem contribuído, recentemente, em diversos aspectos no diagnóstico da mastite bovina, a partir de amostras individuais ou compostas de leite. Esta técnica permite a identificação de microrganismos em animais carreadores ou em estágios iniciais da doença, apresentando elevada sensibilidade e especificidade (RIFFON et al., 2001). Os métodos de biologia molecular também têm sido empregados para a pesquisa de patógenos em leite UHT e em derivados lácteos (CHÓTAR et al., 2006; GANDRA, 2006). Há diversos estudos disponíveis sobre a utilização da técnica de PCR para a identificação e genotipagem dos agentes causadores de mastite, bem como dos genes codificadores de toxinas (MARTINEAU et al., 1998; CREMONESI et al., 2005; FOURNIER et al., 2008).

Em função das limitações da metodologia convencional, protocolos para a detecção rápida de patógenos, baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido amplamente estudados e descritos (JAYARAO et al., 1991; FORSMAN et al., 1997; GHADERSOHI et al., 1997; KHAN et al., 1998; HIROSE et al., 2001; KIM et al., 2001; PHUEKTES et al., 2001; RIFFON et al., 2001; DALY et al., 2002; MEIRI-BENDEK et al., 2002; HUYGENS et al., 2006).

Vários estudos utilizando a PCR têm sido desenvolvidos para a identificação dos patógenos da mastite, e têm-se mostrado bastante úteis para esta finalidade, devido à sensibilidade e rapidez, possibilitando o monitoramento de cepas e o estudo taxonômico molecular (PEREIRA et al., 2002). O uso da PCR no diagnóstico da mastite bovina fornece uma opção promissora para a rápida identificação bacteriana e, conseqüentemente, permite a tomada de medidas mais efetivas para a resolução do problema (CREMONESI et al., 2006). A detecção de *Staphylococcus aureus* por técnicas biomoleculares dispense menor tempo e é mais sensível quando comparada

aos métodos usuais (BRAKSTAD et al., 1992; FORSMAN, 1997; KHAN, 1998; KIM et al, 2001; PHUEKTES et al., 2001; RIFFON, 2001; FERREIRA, 2004; FERREIRA et al., 2006; HUYGENS, 2006; YANG et al., 2007; FOURNIER et al., 2008; MELO, 2008).

A introdução da biologia molecular estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura para o diagnóstico microbiano. Entre as vantagens pode-se destacar o maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de se trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (SILVA e GANDRA, 2004).

Objetivos

3 - Objetivos

1. Avaliar a ocorrência de *Staphylococcus aureus* nos rebanhos estudados.
2. Avaliar a correlação entre fatores de manejo e a ocorrência de *S. aureus* em amostras de leite oriundas de tanques de expansão.
3. Avaliar a viabilidade da utilização da reação em cadeia da polimerase ou do cultivo microbiológico no sistema Petrifilm® na detecção de *S. aureus* como teste diagnóstico no leite dos tanques, comparados ao cultivo microbiológico em Baird-Parker.
4. Avaliar a presença de resíduos de antibióticos no leite dos tanques, com o uso do Delvotest®; correlacionando-a com os resultados das provas microbiológicas e da prova da reação em cadeia da polimerase.

Material e Métodos

4 - Material e Métodos

4.1 Dados das propriedades

Foram colhidas amostras de leite do tanque de 50 (cinquenta) propriedades leiteiras da região oeste do Estado de Santa Catarina, a mais importante bacia leiteira deste Estado (Figuras 2, 3 e 4). As propriedades possuem características diversas no tocante à raça bovina explorada, número de animais em lactação e manejo. O critério de seleção da propriedade foi baseado na utilização de tanque de expansão para o armazenamento do leite produzido.

Foi realizada uma coleta de dados padrão em todas as propriedades utilizadas no experimento, onde se verificou:

- 1) Produção total de leite/dia;
- 2) Média de produção animal/dia;
- 3) Ordenha canalizada(sim ou não);
- 4) Condições de higiene da sala de ordenha e equipamentos (ruim, boa);
- 5) Teste de detecção de mastite clínica (tamis);
- 6) Teste de detecção de mastite subclínica (CMT);
- 7) Uso de *pré-dipping*;
- 8) Uso de *pós-dipping*;
- 9) Histórico recente de mastite clínica (últimos 15 dias);
- 10) Tratamento de mastite clínica;
- 11) Uso de antibiótico à secagem;
- 12) Descarte de leite dos animais em tratamento de mastite;
- 13) Assistência Veterinária (serviço público, particular).



FIGURA 2 - Propriedade leiteira localizada na região oeste de Santa Catarina



FIGURA 3 - Gado leiteiro criado em propriedade localizada na região oeste de Santa Catarina



FIGURA 4. Sistema de ordenha canalizado, em propriedade leiteira localizada na região oeste de Santa Catarina.

4.2 Colheita das amostras

Foram realizadas duas colheitas com intervalo de 30 dias, totalizando duas amostras por propriedade de leite em cada umas das 50 (cinquenta) propriedades leiteiras, amostras estas provenientes do leite produzido em cada propriedade no período máximo de 48 horas, perfazendo assim um total de 100 amostras de leite. Cada amostra foi colhida em frascos coletores universais esterilizados, diretamente do tanque de expansão, após o conteúdo do mesmo ter sido agitado por no mínimo cinco minutos.

As amostras foram mantidas em caixa isotérmica com gelo e, em seguida aliquotadas em 20 microtubos de 1,5mL cada, e posteriormente congeladas até seu processamento no laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastite – NUPEMAS – FMVZ/UNESP Botucatu. As amostras foram armazenadas em quantidade maior do que a necessária para a realização das provas, por medida de segurança.

Foram utilizados os seguintes volumes de cada amostra de leite: 0,1mL para a análise microbiológica padrão, 1,0mL para a análise microbiológica em Petrifilm, 1,0mL para a reação em cadeia da Polimerase (conforme instruções do fabricante do kit de extração de DNA) e 0,1mL para o Delvotest. Para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), foram utilizados 0,1mL.

Para a contagem de células somáticas (CCS), foram colhidas amostras de leite em frascos plásticos próprios, contendo conservante (bronopol).

4.3 Análise microbiológica

4.3.1 Detecção Microbiológica de *S. aureus* clássica – padrão ouro

O Ágar Baird Parker (ABP) é o meio recomendado pela American Public Health Association (APHA), Food and Drug Administration (FDA) e pela IN62 (BRASIL, 2003) para o isolamento de *S. aureus* em alimentos. Este meio utiliza a habilidade que o *S. aureus* possui de se desenvolver na presença de telurito de potássio, glicina, cloreto de lítio e polimixina, que são agentes seletivos. Suas características diferenciais baseiam-se na redução do telurito de potássio à telureto de potássio, produzindo colônias negras e a capacidade de hidrolisar gema de ovo, formando halos ao redor das colônias (LANCETTE e BENNET, 2001).

Para a contagem do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *S. aureus* foram cultivados 0,1 mL de cada amostra de leite em placas contendo 20 mL de ágar Baird-Parker (BP), espalhando-se o inóculo com o auxílio de alça de Drigalski estéril. As placas foram incubadas em condições de aerobiose à temperatura de 37°C por até 72 horas, com observação do desenvolvimento microbiano a cada 24 horas, bem como contagem das UFC. Caso não fosse possível a contagem, procediam-se diluições a 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , cultivando 0,1 mL de cada diluição, incubando e procedendo como descrito anteriormente.

Contagem das colônias presuntivas: FONTE Seleccionavam-se as placas com 20 a 200 colônias e contavam-se as colônias típicas de *S. aureus*: colônias circulares, pretas, pequenas, lisas, convexas, rodeadas por uma zona

opaca e/ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca (Figura 4). Colônias atípicas eventualmente eram identificadas, apresentando-se cinzentas, sem um ou ambos os halos típicos.

Confirmação das colônias típicas: Foram selecionadas cinco colônias típicas e, havendo menos que cinco, todas eram utilizadas para caracterização. Se a placa apresentasse colônias suspeitas de mais de um tipo, ou seja, típicas e atípicas, selecionava-se pelo menos cinco de cada tipo, ou um número proporcional à distribuição dos diferentes tipos na placa (Figura 5).

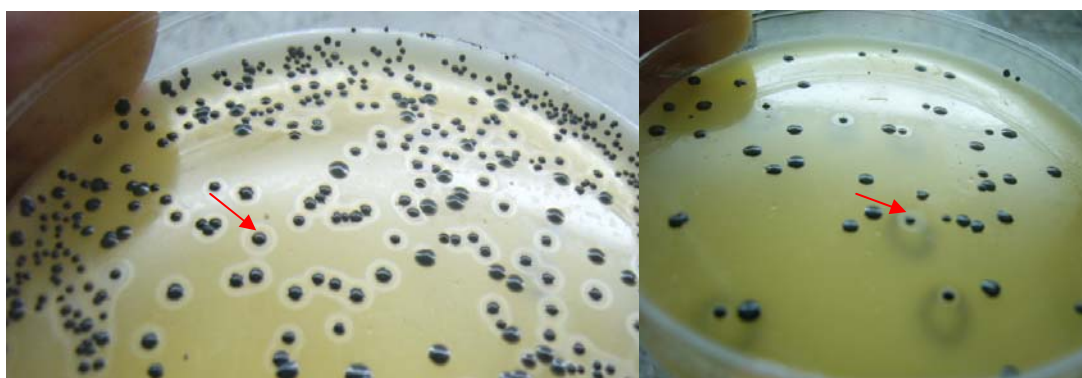


FIGURA 5. Exemplo de colônias típicas (setas) em Ágar Baird-Parker. As colônias pretas são circundadas por um halo de precipitação (interno) e outro transparente (externo)

Os halos ao redor das colônias de estafilococos coagulase positivos podem algumas vezes não ser observados, em virtude da presença de cepas não lipolíticas. Nem todas as cepas de *S.aureus* têm a capacidade de hidrolisar a gema do ovo (LANCETTE e BENNET, 2001). Cepas isoladas de alimentos desidratados ou congelados, que foram estocados por longos períodos, freqüentemente desenvolvem uma coloração menos negra que as colônias típicas e podem ter aparência rugosa e textura seca (FDA, 2001). Desta forma, enfatiza-se mais uma vez a importância de se fazer amostragem de colônias típicas e atípicas para posterior confirmação das colônias de estafilococos coagulase positiva.

O número de UFC/mL foi calculado em função do número de colônias típicas e/ou atípicas obtidas, fator de diluição e porcentagem de colônias confirmadas.

4.3.1.1 Caracterização das amostras de *S. aureus*

Todas as colônias selecionadas foram semeadas em caldo BHI (infusão cérebro-coração) e incubadas por 24 horas a 37°C. Estas amostras foram posteriormente semeadas em ágar-sangue bovino a 5% e incubadas a 37°C por 24 horas, quando se observavam as características das colônias, como formato, textura, coloração e hemólise (Figura 6).



FIGURA 6. Ágar sangue bovino apresentando diferentes linhagens de *Staphylococcus* sp., hemolíticas e não hemolíticas, isoladas de amostras de leite de tanques de expansão.

As colônias sugestivas de microrganismos do gênero *Staphylococcus* foram submetidas à coloração de Gram. As colônias classificadas como cocos Gram-positivos foram submetidas à prova da catalase. As colônias com reação catalase positiva foram semeadas em caldo BHI e incubadas por 24 horas a 37°C, sendo então submetidas à prova de coagulase lenta, com plasma de coelho (MAC FADDIN, 1976; APHA, 2001). As estirpes catalase e coagulase positivas foram submetidas à prova para verificação da produção de acetoina (caldo MRVP – Oxoid, Hampshire, Inglaterra) para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus intermedius*.

As estirpes produtoras de acetoina foram testadas quanto à utilização ou não da maltose e trealose (MAC FADDIN, 1976; MURRAY ET AL., 1999; APHA, 2001), para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus schleiferi* subespécie *coagulans*.

Os isolados bacterianos foram classificados como *Staphylococcus aureus* quando, após apresentar crescimento em Baird Parker, se apresentaram como cocos Gram positivos, reação positiva à catalase e coagulase, produção de acetoina e utilização de maltose e trealose (HOLT ET AL., 1994) (Figura 7).

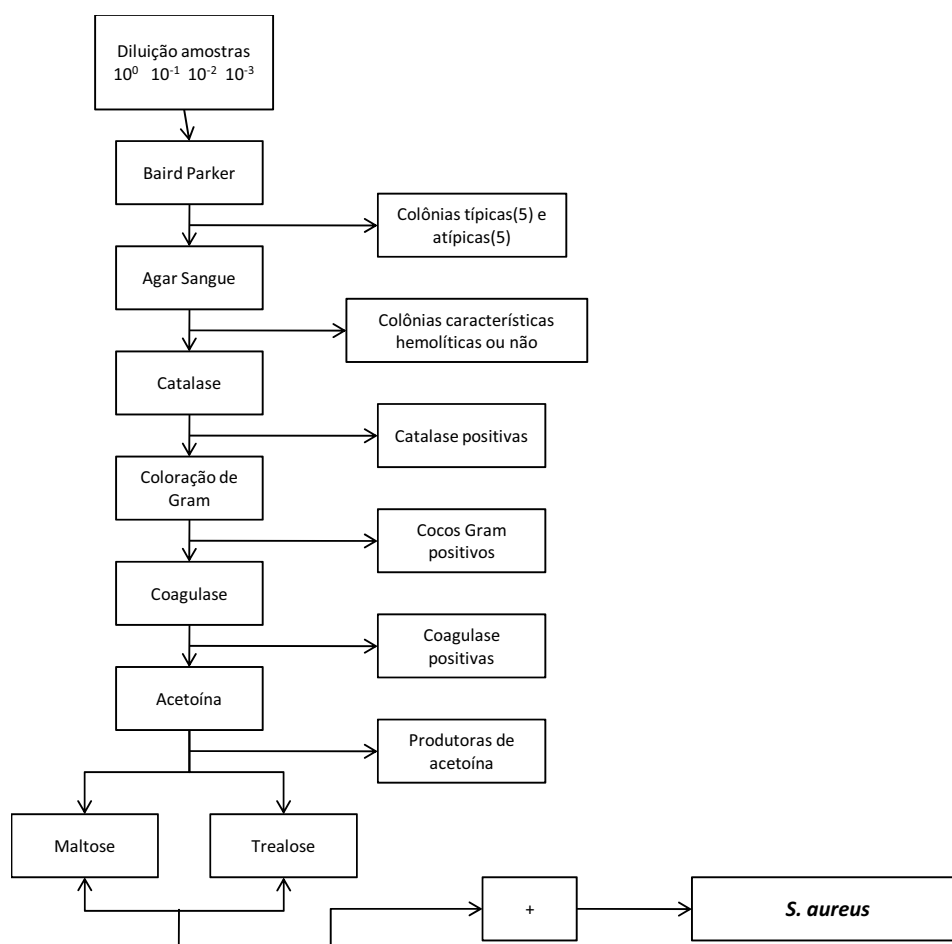


FIGURA 7 - Fluxograma da detecção microbiológica de *S. aureus* clássica – padrão ouro, das amostras de leite de tanques de expansão

4.3.1.1.1 Teste de coagulase livre em tubo

O teste de coagulase em tubos detecta a coagulase livre (extracelular) (BANWART, 1983). Em tubos de vidro estéreis (13mmx100mm), aliquotaram-se 0,5mL de plasma de coelho e 0,5mL de cultura pura de colônias sugestivas de *Staphylococcus*, crescidas após 24 horas de cultivo em caldo BHI. Os tubos foram inclinados suavemente, sem agitar, e incubados a 37°C em banho-maria.

Analísaram-se os tubos quanto à formação do coágulo, após 1 hora de incubação em banho-maria e, sucessivamente, a cada uma hora, até completar 4 horas. Foram consideradas positivas as estirpes que coagularam o plasma, formando um coágulo visível (Figura 8) (MAC FADDIN, 1976).

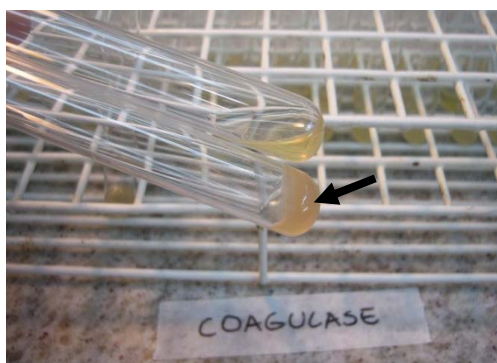


FIGURA 8. Exemplo de resultado positivo (seta) no teste de coagulase livre em tubo.

4.3.1.1.2. Teste da Catalase

Com uma alça de semeadura flambada, retirou-se uma colônia pura de *Staphylococcus* (após 24h de cultivo). Em seguida, realizou-se esfregaço em lâmina de vidro. Adicionou-se uma gota de água oxigenada (H_2O_2) a 3% sobre o esfregaço. As estirpes que apresentaram imediata liberação de gás, com produção de pequenas bolhas, foram consideradas positivas (MAC FADDIN, 1976).

4.3.1.1.3. Teste para verificar a produção de acetoina (Voges-Proskauer)

As estirpes de estafilococos foram inoculadas em tubos contendo caldo de cultivo MRVP e incubadas a 37°C por 48 horas. Após a incubação, adicionou-se 0,6mL de solução de α -naftol a 5% e 0,2mL de solução de

hidróxido de potássio a 40% em cada tubo. Após agitação, realizou-se a leitura. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram coloração vermelha em até 15 minutos pós-inoculação (Figura 9) (MAC FADDIN, 1976).

Segundo Koneman (2006) a produção de acetoína (Teste de Voges-Proskauer) é útil para diferenciar a espécie de *S. aureus*, que é acetoína-positiva, de outras espécies coagulase positivas (*S. intermedius* e *S. hyicus*), que são acetoína-negativas.

Vários autores citam a utilização do Teste de Voges-Proskauer como um método de fácil execução e baixo custo, na identificação de *S. aureus* (BRITO et al., 2002; CAPURRO et al., 1992; GANDRA et al., 2005; ROBERSON et al., 1992).



FIGURA 9. Exemplo de resultado positivo (seta) no teste de produção de acetoína.

4.3.1.1.4. Teste da utilização dos carboidratos (maltose e trealose)

As estirpes produtoras de acetoína foram testadas quanto à utilização de maltose e trealose (Vetec, Rio de Janeiro), para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus schleiferi* subespécie *coagulans*.

Os testes foram realizados em Ágar-Base Vermelho de Fenol (Oxoid, Hampshire, Inglaterra), suplementado com 1% do respectivo carboidrato. Inoculou-se o microrganismo a ser testado e incubou-se a 37°C por até 24 horas. O resultado era considerado positivo na presença de multiplicação do microrganismo com viragem do pH do meio de cultura (vermelho para

amarelo), e negativo quando havia multiplicação do microrganismo sem viragem de cor. (MAC FADDIN, 1976; MURRAY et al., 1999; APHA, 2001).

4.3.2 Detecção microbiológica de *S. aureus* - *Petrifilm*[®] *Staph Express Count System*

Para a contagem do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *S. aureus*, foi utilizado *Petrifilm*[®] *Staph Express Count System* (3M – EUA). Cada amostra foi utilizada em estado puro e a partir das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} (Figura 10). Adicionou-se 1 mL de cada amostra e de suas respectivas diluições sobre as placas, distribuindo-se uniformemente com um difusor específico, e incubou-se a 37°C por 24 horas.



FIGURA 10 - Diluição das amostras, placas de Petri com Baird Parker e placas Petrifilm

Colônias com coloração vermelho-violácea foram identificadas como *S. aureus* (Figura 11A.). Nas colônias que apresentaram coloração diferente (não vermelho-violáceas), adicionou-se o disco com DNase sobre a placa, incubando-se novamente a 37°C por até 3 horas. Contaram-se as colônias que apresentaram um halo rosado *pink*, como *S. aureus* (Figura 11B).

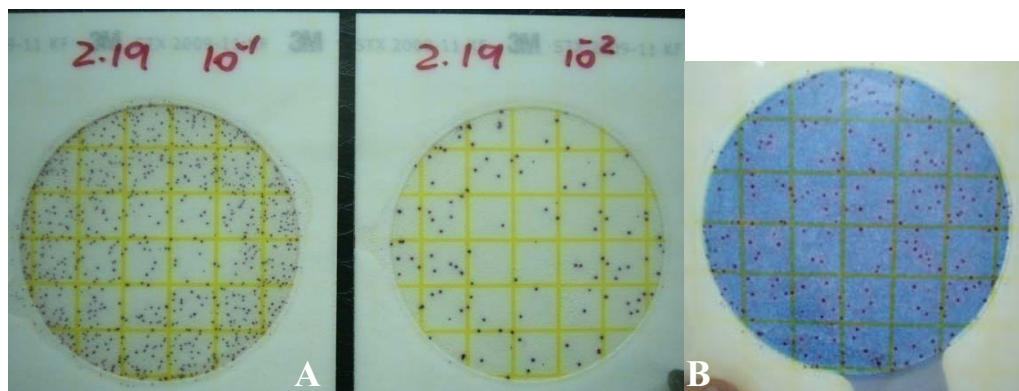


FIGURA 11. A. Colônias de *S. aureus* isoladas em *Petrifilm® Staph Express Count System* (3M – EUA), a partir de amostras de leite em diferentes diluições. B. Colônias de *S. aureus* apresentando halo rosado pink, identificadas após incubação com disco de DNase.

4.4 *Amostra bacteriana padrão de S. aureus – controle positivo*

A amostra de *S. aureus* padrão (ATCC 2592), utilizada para controle positivo e para realização da sensibilidade analítica das provas de cultivo microbiológico e da PCR, em solução salina e leite (contaminação experimental do leite e solução salina), foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, do Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – IB/UNESP Botucatu-SP.

4.4.1 Contaminação experimental da solução salina e cultivo microbiológico

A amostra padrão foi cultivada em ágar sangue bovino a 10% e, após um período de incubação de aproximadamente 36 horas, as colônias de *S. aureus* foram transferidas com auxílio de alça de platina para tubo de vidro contendo 5mL de solução salina estéril, até ser obtida uma turvação correspondente ao valor 1,0 da escala de MacFarland.

Após homogeneização em vórtex, 0,5mL foram transferidos a um tubo de vidro com 4,5mL de solução salina estéril. A partir destes, foram obtidas as diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Um mL de cada uma destas diluições e da solução inicial foram semeadas em placas *Petrifilm® Staph Express Count*

System e em placas de cultivo contendo agar Baird-Parker . Após incubação por 24 horas a 37°C foi observado o desenvolvimento bacteriano em estado puro e, feita sua quantificação, o resultado foi multiplicado pelo valor correspondente a cada diluição.

4.4.2 Contaminação experimental do leite e cultivo microbiológico

Da solução obtida no item 4.4.1, após homogeneização em vórtex por 20 segundos, 0,5mL foram transferidos a um tubo de vidro contendo 4,5mL de leite UHT (*Ultra High Temperature*), sabidamente negativo tanto ao diagnóstico microbiológico quanto ao molecular para *S. aureus*. A partir deste, o mesmo volume de 0,5mL foi transferido subsequentemente a outros tubos contendo 4,5mL de leite estéril, até atingir a diluição de 10^{-3} .

O cultivo microbiológico e a contagem bacteriana foram procedidos da mesma forma descrita no item 4.4.1.

4.5 Contagem de Células Somáticas (CCS)

Foram utilizados para colheita das amostras de leite dos tanques de expansão, frascos plásticos adequados, contendo conservante (bronopol). Este conservante apresenta formato de pastilha que, em contato com o leite, forma uma mistura de coloração róseo-clara. As amostras colhidas permaneceram sob refrigeração a 4°C por, no máximo, até cinco dias da colheita, para a realização das análises. Os resultados de CCS foram fornecidos pelo laboratório de controle de qualidade do laticínio onde o leite das propriedades avaliadas era processado.

4.6 Detecção de resíduos de antibióticos

As análises para detecção de resíduos de antimicrobianos foram realizadas utilizando-se um *kit* comercial, conforme as recomendações do fabricante (*Delvotest*[®]: *DSM Food Specialties Dairy Ingredients, The Netherlands*). Este é um teste de difusão que mede a inibição do crescimento bacteriano. É apresentado em ampolas contendo meio de cultura sólido com indicador de pH e *Bacillus stearothermophilus* variedade *calidolactis* na forma esporulada. Este teste é indicado para o diagnóstico dos principais grupamentos de antimicrobianos disponíveis em medicina veterinária.

Este teste é capaz de detectar antibióticos β -lactâmicos, sulfas, aminoglicosídeos, além de substâncias como dicromato de potássio e iodo, entre outras. É um teste para triagem e levantamento qualitativo aprovado pelo FDA, reconhecido e aprovado pelo AOAC, desde 1982. É recomendado, pelo *Codex Alimentarius* e pela Anvisa para este tipo de análise, tendo sido validado pelo MAPA, desde 1984 (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2001).

A amostra de 0,1mL de leite foi adicionada à ampola fornecida pelo produto. A ampola foi incubada em banho-maria a 64°C por aproximadamente três horas. Após este período, realizou-se a leitura, que se baseia na alteração da coloração do indicador. Na ausência de resíduos de antimicrobianos ocorre a multiplicação bacteriana, produção de ácido e alteração da cor original do indicador (de púrpura para amarelo). Na presença de resíduos de antimicrobianos a multiplicação bacteriana é retardada ou inibida, ocorrendo inibição ou acidificação pobre do meio (tonalidade púrpura a azulada) (Figuras 12 e 13).

Utilizou-se como controle negativo uma amostra de leite UHT (*Ultra High Temperature*) e, como controle positivo, uma amostra de leite UHT (*Ultra High Temperature*) adicionado de 0,006 UI de penicilina/mL de leite.



FIGURA 12. Padrões de coloração para leitura da detecção de resíduos de antibióticos em amostras de leite, pelo *Delvotest*®.

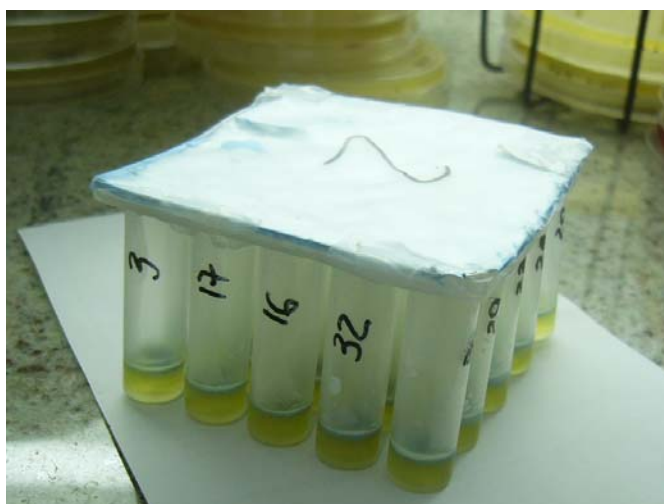


FIGURA 13. Leitura do *Delvotest*®: na ausência de resíduos de antimicrobianos ocorre a multiplicação bacteriana, produção de ácido e alteração da cor original do indicador (de púrpura para amarelo).

4.7 Técnica de biologia molecular para a pesquisa de S. aureus

Todos os procedimentos referentes ao diagnóstico molecular deste experimento foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo em Pesquisas em Zoonoses – NUPEZO – FMVZ/UNESP Botucatu.

4.7.1 Pesquisa de DNA de *S. aureus* no leite de amostras de tanque de expansão

4.7.1.1 Protocolo de Extração dos ácidos nucleicos a partir de leite bovino

As 100 amostras de leite colhidas foram mantidas em temperatura ambiente para descongelamento, até atingirem aproximadamente 20°C.

A extração do DNA a partir das amostras de leite foi realizada utilizando-se kit comercial, *Milk Bacterial DNA Isolation Kit* (Norgen Biotek Corporation) segundo as instruções do fabricante (Anexo 1). A escolha deste kit, que é específico para amostras de leite, se baseou na eliminação de substâncias interferentes, tais como gordura, sais, etc., que poderiam prejudicar a eficácia da PCR.

4.7.1.2 Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a detecção de *S. aureus*

Os *primers* espécie-específicos utilizados para a amplificação do *S. aureus* foram escolhidos de acordo com os resultados de MARTINEAU *et al.* (1998) que identificaram um fragmento de 108pb específico de *Staphylococcus aureus*, e desenvolveram os primers Sa442-1 e Sa422-2 com as características descritas no Quadro 2.

QUADRO 2. Sequência das bases, localização dentro dos genes, e tamanhos previstos dos produtos amplificados pelos primers *Staphylococcus aureus* - específicos.

Primer	Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3')	Localização no gene	Tamanho do produto amplificado (pb)
Sa442-1	AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	5-34	442
Sa442-2	CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATACAACA	83-112	442

Fonte: MARTINEAU *et al.*, 1998

4.7.1.3 Amplificação do DNA de *S. aureus*

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5mL em volumes totais de 50mL, contendo 20pmol de cada *primer* (Quadro 1), 2,5U de *Taq* DNA polimerase, 200mM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM de MgCl₂ e 5mL da amostra. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo, pela substituição do ácido nucléico por água. A incubação foi realizada em termociclador *Eppendorf*, empregando-se inicialmente os parâmetros descritos por Johnson *et al.* (1991) com algumas modificações propostas por Cunha *et al.* (2006), que consistem

de: um primeiro ciclo a 94°C por quatro minutos, desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento dos *primers* a 55°C e extensão a 72°C por um minuto e 30 segundos. Posteriormente procedeu-se um segundo ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento dos *primers* a 53°C e extensão a 72°C por um minuto e 30 segundos. No terceiro ciclo a temperatura de anelamento foi reduzida para 51°C, seguido por mais 37 ciclos com estes últimos parâmetros. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por sete minutos antes de resfriar à 4°C.

4.7.1.4 Visualização do produto amplificado

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado em solução de brometo de etídio (5µ/mL) (SAMBROOK et al., 1989), e imerso em tampão Tris-Borato-EDTA (0,04M Tris-Borato, 1mM EDTA). A corrida foi realizada em voltagem adequada às dimensões de cada gel (1 a 10V/cm²).

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada por transiluminação do gel em luz ultravioleta (Figura 14). A avaliação comparativa dos fragmentos foi realizada com um padrão de marcador molecular de 100 pares de bases, disposto no gel juntamente com todas as amostras analisadas em cada eletroforese. A documentação foi realizada com o auxílio de uma câmara Kodak Digital Science DC40[®].

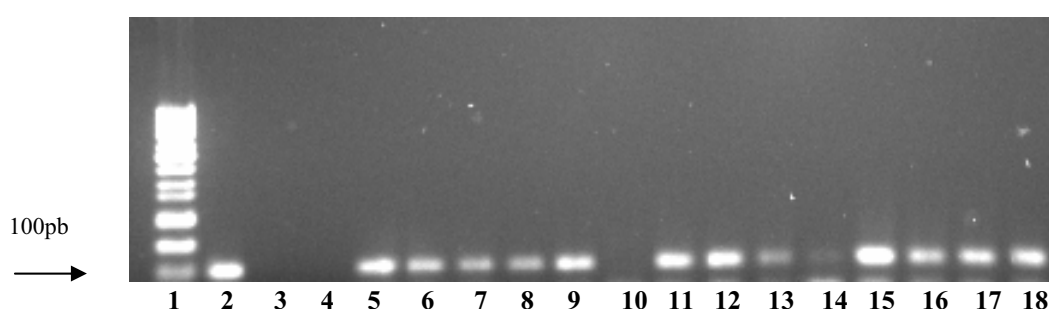


FIGURA 14. Visualização dos produtos amplificados em gel de agarose a 1,5%.

- 1: Padrão de peso molecular (100pb).
- 2: Controle positivo (ATCC *S. aureus* 14458B).
- 3: Controle negativo da extração de DNA (água miliQ).
- 4: Controle negativo da PCR (mixPCR).
- 5, 6, 7, 8 e 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18: amostras positivas (PM= 108pb).
- 10: amostra negativa.
- 14: amostra positiva com menor quantidade de DNA.

4.7.1.5 Pesquisa de DNA de *S. aureus* em solução salina e leite, experimentalmente contaminados

A solução salina e o leite, experimentalmente contaminados, assim como suas diluições, foram submetidas à extração dos ácidos nucleicos, amplificação do DNA bacteriano e visualização do produto amplificado utilizando-se técnicas idênticas às descritas anteriormente.

4.7.1.6 Controles

Foram tomados os devidos cuidados para se evitar a contaminação de utensílios e equipamentos de laboratório com o material genético (DIEFFENBACH et al., 1995). As amostras foram extraídas, amplificadas e visualizadas na mesma sequência. A inclusão de um controle negativo foi realizada a cada quatro amostras extraídas e a cada quatro amplificações, durante todo o experimento, para prevenir riscos de resultados falso positivos em todas as reações. Controles positivos também foram utilizados em todas as reações.

Análises Estatísticas

5 - Análises Estatísticas

A prova microbiológica clássica foi utilizada como padrão ouro. Foi utilizado o teste do Qui-quadrado, para avaliar a significância entre os testes; o coeficiente de Kappa, para determinar a concordância entre os testes, bem como os valores de sensibilidade e especificidade, e os valores preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN). Estas análises foram realizadas utilizando os programas de computador SAS (2002) e TestDiag (Cálculos Estatísticos Básicos para Testes Diagnósticos) (GODOY et al., 1999).

A comparação na contagem de colônias foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, com resumo descritivo em mediana e quartis, bem como pela correlação de Spearman (MACKINNON, 2000).

Todas as análises foram realizadas considerando o nível de significância de 5% (MEDRONHO, 2004).

Resultados e Discussão

6 – Resultados e Discussão

6.1. Características das propriedades avaliadas e frequências de *S. aureus* segundo parâmetros epidemiológicos

A Tabela 1 apresenta a distribuição das propriedades segundo manejo de ordenha e condutas profiláticas e terapêuticas além das associações dessas características com a presença de *Staphylococcus aureus*, em meio Baird-Parker.

Em média, cada propriedade produziu 684,26 litros de leite e produção mediana de 260 enquanto a média de produção de leite diária por animal, foi de 17,26 litros (mediana de 16,5). Tratam-se, portanto, de propriedades de médio porte. Apesar de menos da metade das 50 propriedades avaliadas apresentarem sistema de ordenha canalizado, verificou-se que em torno de 60% apresentavam condições satisfatórias de higiene na sala de ordenha, bem como realizavam medidas profiláticas no tocante à mastite, tais como realização de CMT, *pré-dipping*, *pós-dipping*, além da terapia/profilaxia de vacas secas. Destaca-se ainda a preocupação com o descarte do leite pós-tratamento contra mastite (100% das propriedades realizavam o descarte). Estas condutas são, em sua grande maioria, orientadas por médicos veterinários públicos, que estão presentes em 80% das propriedades visitadas, demonstrando característica peculiar da região estudada.

A frequência da utilização de antimicrobiano específico à secagem (64%), verificada no presente estudo, ainda é inferior à observada em países desenvolvidos. Jayarao et al (2004), avaliando 126 rebanhos leiteiros nos EUA, verificaram que frequência de tratamentos de vacas à secagem foi de 88%. No Brasil, especialmente em propriedades de pequeno porte, a terapia/profilaxia da vaca seca não é realizada como rotina de manejo. Os animais são retirados da produção sem qualquer tipo de tratamento, o que pode levar à presença de leite residual, contribuindo para a multiplicação de patógenos contagiosos e/ou ambientais nos quartos mamários. Com efeito, os animais apresentam mastite clínica já no início da próxima lactação.

Tabela 1 – Estimativa da associação entre características da fazenda/rebanho e isolamento de *Staphylococcus aureus*, em meio Baird-Parker.

Características Fazenda/rebanho	% de fazendas com S. <i>aureus</i> isolado	<i>p</i>[*]
Produção de leite		
Menos que 400L/dia (n=29)	10,3%	0,231
De 400 a 1.000L/dia (n=12)	25,0%	
Acima de 1.000L/dia (n=9)	33,3%	
Sistema de ordenha		
Não canalizada (n=29)	10,3%	0,140
Canalizada (n=21)	28,6%	
Sala de ordenha higienizada		
Insatisfatoriamente (n=16)	25,0%	0,442
Satisfatoriamente (n=34)	14,7%	
Realização da prova de Tamis		
Não (n=25)	12,0%	0,463
Sim (n=25)	24,0%	
Realização de CMT		
Não (n=20)	5,0%	0,067
Sim (n=30)	26,7%	
Prática de <i>pré-dipping</i>		
Não (n=21)	14,3%	0,716
Sim (n=29)	20,7%	
Prática de <i>pós-dipping</i>		
Não (n=21)	4,8%	0,061
Sim (n=29)	27,6%	
Ocorrência de mastite		
Não (n=21)	14,3%	0,716
Sim (n=29)	20,7%	
Realização de tratamento para mastite		
Não (n=18)	11,1%	0,459
Sim (n=32)	21,9%	

n: Total de fazendas

(*) Teste exato de Fisher.

Nove fazendas tiveram *Staphylococcus aureus* isolado em meio Baird-Parker.

Além das características levantadas da Tabela 1, observou-se também que cerca de 64% das propriedades utilizam de antimicrobiano específico à secagem, todas descartam o leite após o tratamento com antimicrobianos e 80% delas recebem assistência veterinária com profissional público.

De acordo com o teste exato de Fisher e devido às condições do presente estudo, o uso da regra de decisão $p < 0,05$ exige cautela. Baseando-se nos resultados deste teste, encontram-se indícios de que a presença de *S. aureus* esteja associada à realização de CMT e à prática de *pós-dipping* em relação às demais características por apresentarem os menores valores de *p*.

Deve-se considerar, entretanto, que tais dados devem-se provavelmente a uma situação inversa, em que a adoção de condutas de manejo que visam o controle de mastite esteja determinando estes resultados.

As propriedades com menor volume de produção de leite diária foram as que apresentaram maior número de culturas negativas para *S. aureus*. Fagundes (2006) obteve resultados semelhantes, com 182 culturas negativas para o agente em 194 amostras avaliadas, de propriedades leiteiras com produção inferior a 400 litros de leite por dia, em Minas Gerais. A autora relata que propriedades pequenas e grandes, por apresentarem menor volume de leite e melhores condições de produção, respectivamente, não seriam consideradas um risco de veiculação de *S. aureus* pelo leite. Os dados encontrados no presente estudo contradizem em parte esta informação, pois 5 das 9 propriedades com produção acima dos 1.000 litros diários apresentaram isolamento do agente, o que representa 55,5%.

O sistema de ordenha que apresentou maior número de culturas negativas para *S. aureus*, no presente estudo, foi a não canalizada, diferente do que foi verificado por Fagundes (2006), em rebanhos leiteiros de Minas Gerais. A pesquisadora detectou maior ocorrência de *S. aureus* entre os animais que foram ordenhados em sistema balde ao pé, sugerindo que estas propriedades possuíam maior risco de veicularem o patógeno e apresentarem maior contaminação inicial do leite cru, do que em propriedades com sistema de ordenha canalizado. Por outro lado, deve-se considerar que o sistema de ordenha é uma fonte importante de contaminação do leite, como reportado por Guerreiro et al. (2005). Uma das propriedades avaliadas por estes autores apresentava sistema de ordenha mecânica canalizada, com resultado inicial de contaminação microbiana elevada no leite de mistura, muito maior do que o observado na propriedade com ordenha manual rudimentar. Estes resultados indicam que o nível tecnológico utilizado na ordenha não implica, necessariamente, em um leite com melhor qualidade microbiológica e sim em mais um item a ser considerado como possível agente de contaminação bacteriana. No presente estudo, esta hipótese se confirmou, havendo 28% de isolamentos de *S. aureus* em propriedades com ordenha canalizada.

Apesar de existirem condições satisfatórias de higiene na sala de

ordenha de 35 propriedades avaliadas, em seis (18%) houve isolamento de *S. aureus* no tanque de expansão, indicando infecção pelo patógeno nos respectivos rebanhos. Deve-se ressaltar que a adequada higienização da sala de ordenha auxilia na redução da contaminação por patógenos ambientais. *S. aureus* é um microrganismo cujo caráter de transmissão é contagioso, sendo facilmente veiculado pelas mãos dos ordenhadores e por utensílios de ordenha, como teteiras, panos, entre outros.

Por outro lado, em condições insatisfatórias de higiene na sala de ordenha, a possibilidade de transmissão de microrganismos contagiosos também é evidenciada. Em 20% das propriedades com deficiências de higiene, *S. aureus* foi isolado do leite de mistura.

A prática de *pré-dipping* visa, principalmente, a redução da contaminação de pele dos tetos por patógenos ambientais. No presente estudo não houve diferença estatística entre a realização do *pré-dipping* e o isolamento de *S. aureus* no leite de mistura. Resultados estatisticamente semelhantes foram obtidos por Fagundes (2006).

O maior número de isolamentos de *S. aureus* em propriedades que realizam a prática de *pós-dipping*, que visa a redução de contaminação da pele do teto por microrganismos contagiosos, pode indicar que o anti-séptico utilizado não estivesse em concentração adequada para o fim, ou mesmo que o tempo de ação não fosse suficiente para auxiliar no controle de *S. aureus*. Há que se considerar ainda a possibilidade de contaminação, pelo microrganismo, dos equipamentos de ordenha que, em sistema canalizado, também pode contribuir para a contaminação do leite do tanque de expansão. Provavelmente o que determinou o indício (menores valores de *p*) de que a presença de *S. aureus* esteja associada à prática de *pós-dipping* deve-se ao fato de que as propriedades que possuem uma maior ocorrência de mastites clínicas ou sub-clínicas, procuram estabelecer medidas de manejo que possibilitem um maior controle da enfermidade, entre estes o *pré* e *pós-dipping*, assim como a realização das provas do tamis e CMT.

Neste contexto, *S. aureus* apresenta extrema importância, na medida em que possui grande capacidade de invasão dos adenômeros mamários e

fagócitos, o que permite sua instalação em todo tecido glandular, com formação de tecido fibroso nos focos da infecção, dificultando o acesso dos antimicrobianos convencionais. Na maioria das propriedades leiteiras, no Brasil, o tratamento dos casos de mastite clínica é realizado de maneira aleatória, ou seja, sem embasamento pelo antibiograma. Sendo assim, muitas vezes o antimicrobiano utilizado, apesar de apresentar amplo espectro de ação, é administrado de maneira inadequada, ou não contém o princípio ativo mais indicado para o tratamento contra *S. aureus*.

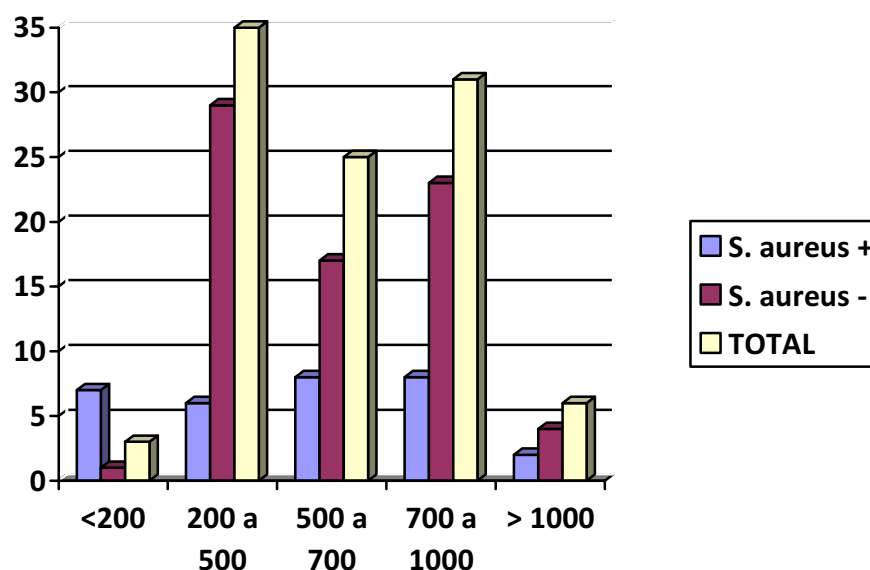
A CCS no leite de animais individuais ou de tanque é uma ferramenta valiosa na avaliação do nível de mastite subclínica no rebanho, na estimativa das perdas quantitativas e qualitativas de produção do leite e derivados, como indicativo da qualidade do leite produzido na propriedade e para estabelecer medidas de prevenção e controle da mastite.

A contagem de células somáticas é influenciada por vários fatores, mas especialmente pela presença de infecções intramamárias, tornando-se um indicador bastante confiável de sanidade da glândula mamária. Outros fatores que podem interferir na CCS são a época do ano, raça, estágio de lactação, produção de leite, número de lactações, estresse causado por deficiências no manejo, problemas nutricionais, efeito rebanho, condições climáticas e doenças intercorrentes (OSTRENSKY, 1999; VIANA, 2000).

Segundo Kitchen (1981), o leite obtido de quartos mamários de animais sadios contém de 50 a 200 mil células/mL. Na dependência da severidade e extensão da infecção e, do tipo de microrganismo envolvido, as contagens podem variar de 200 a 5.000×10^3 células/mL de leite (EBERHART et al., 1982).

Na Figura 15 estão apresentados os resultados de isolamento de *S. aureus* de acordo com a CCS. De acordo com o teste exato de Fisher, não houve evidência para concluir sobre a existência de uma associação significativa do ponto de vista estatístico entre CCS e a presença de *Staphylococcus aureus*, em meio Baird-Parker.

FIGURA 15. Frequência de isolamento de *Staphylococcus aureus*, em meio Baird-Parker, a partir de amostras de leite de tanques de expansão, agrupados de acordo com a CCS (cél/s/mL x 10³).



p = 0,282 (teste exato de Fisher)

cél/s/mL: células por mililitro de leite; n: número de amostras. Mediana da CCS: 599.479 (447.155; 789.828).

(+) isolamento de *S. aureus* (cultura positiva)

(-) ausência de isolamento de *S. aureus* (cultura negativa)

No presente estudo, o maior número de isolamentos de *S. aureus* ocorreu em amostras com CCS entre 500.000 a 1.000.000 de células/mL, corroborando os dados obtidos por Voltolini et al. (2001), que estudaram a dinâmica da CCS ao longo da lactação, em rebanhos do Paraná. De 97 amostras que apresentaram CCS superior a 500.000 células/mL, isolaram-se 16 patógenos, sendo 8 representados por estafilococos coagulase positivos, classificação na qual *S. aureus* está inserido. Haas et al. (2004) também verificaram uma correlação positiva entre elevados valores de CCS, por longos períodos de tempo, com a maior frequência de isolamento de *S. aureus* em rebanhos leiteiros na Alemanha. Em estudo realizado por Green et al. (2004), a elevada CCS, bem como a maior taxa de infecção por *S. aureus* esteve marcadamente presente em vacas recém-paridas que apresentavam mastite clínica. Jayarao et al. (2004) também verificaram que em rebanhos com infecção por *S. aureus*, o leite de mistura apresentava CCS entre 250.000 a 400.000 células/mL.

Considerando a IN 51 do MAPA (BRASIL, 2002), o limite máximo permitido de CCS para leite de mistura é de 750.000 células/mL. Apesar da

maioria das amostras avaliadas (63%) terem apresentado resultados satisfatórios de CCS de acordo com a legislação, 37% apresentaram valores de CCS superiores a 700.000 células/mL, sendo 6% com CCS maior que 1.000.000 células/mL, indicando sérios problemas de mastite entre os animais em produção.

6.2. Resultados de UFC

Nas Tabelas 2 e 3 estão apresentadas, respectivamente, as freqüências de isolamento e os valores de mediana e quartis de UFC de *S. aureus*, segundo os testes diagnósticos utilizados, a partir de 100 amostras de leite (divididas em duas coletas) obtidas dos tanques de expansão.

TABELA 2. Freqüências de detecção de *S. aureus* em 100 amostras de leite obtidas de tanques de expansão de propriedades leiteiras do oeste de Santa Catarina, segundo os três métodos diagnósticos utilizados.

Método	Freqüência amostras (%)
Cultivo microbiológico em ágar Baird-Parker	26c
Cultivo microbiológico em <i>Petrifilm</i> ® <i>Staph Express Count System</i>	89a
Reação em cadeia pela polimerase (<i>primers</i> Sa441 e Sa442)	61b

Os resultados dos métodos avaliados seguidos por diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente pelo teste do qui-quadrado, com 5% de significância.

TABELA 3. Valores de mediana e quartis de UFC detectados pelo método de cultivo em meio Baird-Parker e pelo *Petrifilm*® *Staph Express Count System*, comparados pelo Teste de Mann-Whitney.

UFC Baird-Parker	0 (0;18,5) b
UFC <i>Petrifilm</i>	310 (80;895) a

Resultados seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney, com $P < 0,001$.

O método tradicional de cultivo em meio Baird-Parker (BP), considerado como padrão-ouro, detectou o menor número de amostras positivas para *S. aureus*. As 26 amostras positivas detectadas por este método foram obtidas a partir do leite dos tanques de expansão de 21 rebanhos. Portanto, a prevalência de *S. aureus* nos rebanhos estudados foi de 42%.

A técnica de Petrifilm® apresentou maior sensibilidade analítica, detectando 89 amostras positivas, com 26 confirmadas positivas pelo método de cultivo em BP. Os valores de sensibilidade e especificidade das técnicas diagnósticas, em comparação ao teste ouro, são apresentados na Tabela 4.

TABELA 4. Correlação entre os valores de UFC detectados pelo método de cultivo em meio Baird-Parker e pelo *Petrifilm® Staph Express Count System*.

	BP (-)	BP (+)	<i>p</i> (*)
	PF (+)	PF (+)	
	(n = 27)	(n = 17)	
UFC Petrifilm	210 (90; 800)	1060 (400; 2200)	0,011

BP: Baird-Parker; PF: Petrifilm; (-): negativo para *S. aureus*; (+): positivo para *S. aureus*;

(*): significância estatística - Teste de Mann-Whitney. Resumo descritivo em mediana e quartis.

Correlação de Spearman entre UFC pelo BP e UFC pelo PF: $\wedge p=0,50$; $p=0,40$.

Mediana de UFC detectada pelo método de cultivo em Baird-Parker: 192 (100; 576).

Mediana de UFC detectada pelo método de *Petrifilm® Staph Express Count System*: 425 (110; 1425).

Considerando os resultados de UFC, houve uma correlação positiva entre os dados obtidos pelos métodos Baird-Parker (BP) e Petrifilm®, como apresentado na Tabela 3, ou seja, na medida em que aumenta o número de UFC detectado pelo BP, também aumenta o número de UFC identificado pelo método Petrifilm®. Estes dados corroboram os encontrados por Ingham et al. (2003), que compararam o meio BP e o Petrifilm® para contagem de *S. aureus* em amostras de alimentos naturalmente ou artificialmente contaminados, inclusive leite cru. Os pesquisadores verificaram ótima correlação estatística entre ambos métodos utilizados.

A média de UFC detectada em amostras de leite de tanques de expansão, por cultivo em Baird-Parker, no presente estudo, foi de 68,6 UFC/mL, bastante inferior à média detectada por Jayarao et al. (2004), que

obtiveram média de 4.320 UFC/mL, pelo mesmo método, em amostras de leite de mistura de rebanhos leiteiros nos Estados Unidos.

Conforme os valores de UFC detectados pelo método BP (mediana de 192 UFC/mL), bem como os resultados de UFC obtidos pelo método Petrifilm® (mediana de 425 UFC/mL), observa-se que a média foi certamente influenciada pelas 18 amostras (18%) que ficaram acima de 1×10^6 . Esse tipo de resultado pode ser encontrado com frequência na literatura nacional. No Paraná foram encontradas contagens médias de $7,5 \times 10^6$ UFC.mL em amostras de leite cru (BELOTI et al., 1999). Um estudo conduzido por Moraes et al. (2005) constatou que 25% das propriedades leiteiras avaliadas apresentavam contagens de UFC acima dos padrões exigidos pela legislação. Ao analisar 210 amostras de leite cru, Nero et al. (2005) encontraram 48,6% do total de amostras com contagem bacteriana acima do sugerido pela legislação: 21,3% na região de Viçosa (MG), 47,6% na região de Londrina (PR), 56,0 na região de Pelotas (RS) e 68,0% na região de Botucatu (SP). Outro estudo em Minas Gerais obteve 83% dos 24 rebanhos avaliados em concordância com a legislação vigente (ARCURI et al., 2006).

Das 400 UFC selecionadas como típicas e atípicas no Baird-Parker, 162 demonstraram-se coagulase positivas, sendo que 53 destas foram positivas ao teste de maltose e trealose, sendo então caracterizadas bioquimicamente como sendo realmente *S. aureus* (Tabela 5).

Os efeitos deletérios às bactérias presentes nas amostras submetidas ao congelamento poderia explicar os resultados microbiológicos negativos. Porém, segundo Langoni et al. (2008, dados ainda não publicados), o processo de congelamento do leite não interfere na multiplicação dos agentes causadores de mastite, como *S. aureus*. Esta informação está de acordo com relatos de outros pesquisadores (SCHUKKEN et al., 1989; MURDOUGH et al., 1996), que também não observaram nenhum efeito do congelamento na recuperação de amostras de *S. aureus*. Alguns autores citam inclusive que após introduzirem o congelamento de amostras de leite como padrão de coleta para os produtores que enviavam material ao laboratório, houve redução no número de amostras com contaminantes. Indicam porém, ser necessário um protocolo detalhado para avaliação dos resultados destas culturas (SOL et al., 2002). De forma

contraditória, Villanueva et al. (1991), observaram um aumento da positividade para *S. aureus* em amostras congeladas por 23 dias.

TABELA 5. Resultado da prova da coagulase e açúcares (maltose e trealose) nas colônias típicas e atípicas selecionadas em Baird-Parker.

Nº de colônias coagulase +	162 b
Nº de colônias coagulase –	238 a
Total de colônias selecionadas	400
P=0,001	X ² =14,44
Nº de colônias maltose e trealose +	53 b
Nº de colônias maltose e trealose –	347 a
Total de colônias selecionadas	400
P<0,0001	X ² =216,09
Nº de colônias maltose e trealose +	53 b
Nº de colônias maltose e trealose –	109 a
Total de colônias coagulase +	162
P<0,0001	X ² =19,358

Resultados seguidos de letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste do Qui Quadrado.

Um aspecto a ser considerado em relação à taxa de isolamento de *S. aureus* nas amostras de leite, é que muitas vezes esta bactéria tem padrão intermitente de eliminação, além do fato de encontrar-se geralmente dentro de células, sobretudo leucócitos e neutrófilos, o que dificulta o seu isolamento (RISTOW e PEREZ JUNIOR, 2005). Assim, a probabilidade de detectar esse agente através de cultura de uma única amostra composta de leite de vacas com mastite subclínica é de apenas 58 a 63%, segundo Godden et al. (2002). Estes autores afirmam que as amostras compostas de leite determinam um efeito de diluição do leite pelos quartos mamários não infectados, mas que a sensibilidade aumenta para 94 a 95% se duas ou três amostras consecutivas forem coletadas ao longo de um período.

6.3. Resultados da pesquisa de resíduos de antimicrobianos

Em nenhuma das 100 amostras de leite analisadas foram detectados resíduos de antimicrobianos, pelo método *Delvotest*®. Estes resultados

indicam que a prática de descarte do leite, após tratamento contra mastite, é realmente realizada em todas as propriedades avaliadas, conforme informações obtidas pela aplicação do questionário epidemiológico (Tabela 1).

A preocupação com a qualidade da matéria-prima, pelas indústrias de laticínios, tem sido constantemente intensificada. A presença de resíduos de antimicrobianos no leite reduzem o rendimento da produção dos derivados lácteos, além de oferecerem extremo risco à saúde pública. Com efeito, as indústrias têm utilizado testes diagnósticos bastante sensíveis para a detecção de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite de tanques de expansão, adotando medidas punitivas aos produtores.

Uma das propostas do presente estudo era correlacionar a presença de resíduos de antibióticos no leite com os resultados das provas microbiológicas e da prova da reação em cadeia da polimerase. No entanto, devido à ausência de resíduos nas amostras avaliadas, não foi possível estabelecer nenhuma correlação com os resultados das provas diagnósticas utilizadas.

No Brasil, vários estudos revelaram diferentes resultados quanto à incidência de resíduos no leite. Melo Filho (1969) avaliou o leite consumido em São Paulo, encontrando em torno de 2% das amostras positivas para resíduos de penicilina. Em Belo Horizonte, Silva e Sena (1984) encontraram resíduos de 4,1% no leite tipo B e 3,2% no tipo A. Em Fortaleza, Albuquerque et al. (1996) encontraram que 69,7% das amostras de leite analisadas possuíam resíduos, sendo que 28% tratavam-se de penicilina. Outro estudo encontrou 50% de positividade, e destes, 34% tratavam-se de resíduos de antibióticos beta-lactâmicos (NASCIMENTO et al., 2001). Leme e colaboradores (2004) encontraram 0,66% de amostras de leite positivas à presença de antimicrobianos pelo Delvotest. Recentemente, Ribeiro et al. (2009), encontraram resíduos de antibióticos no leite de animais oriundos de propriedades com *status* orgânico.

Jayarao et al. (2004), avaliando a qualidade do leite de tanques de expansão de propriedades na Pensilvânia, aplicaram questionário epidemiológico aos produtores, e verificaram que, em aproximadamente 5% das propriedades, foram detectados resíduos de antimicrobianos no leite de

mistura, nos últimos seis meses até a data da entrevista. Este fato reforça o risco representado à saúde pública, presente mesmo em países com produção tecnificada e intensa fiscalização governamental.

6.4. Acurácia da PCR e do Petrifilm com relação ao cultivo em Baird-Parker

Na Tabela 6 estão apresentados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia, coeficiente Kappa e valor de p, para os métodos de *Petrifilm® Staph Express Count System* e PCR, em comparação ao cultivo em meio Baird-Parker (padrão-ouro).

TABELA 6. Avaliação da acurácia dos métodos *Petrifilm® Staph Express Count System* e PCR, frente ao cultivo tradicional, em meio Baird-Parker (padrão-ouro).

Método	(nt/np/nte) ⁽¹⁾	Sens ⁽²⁾ (%)	Esp ⁽³⁾ (%)	Vpp ⁽⁴⁾ (%)	Vpn ⁽⁵⁾ (%)	Ac ⁽⁶⁾ (%)	Kappa ⁽⁷⁾	p ⁽⁸⁾
Petrifilm	(100/26/89)	100,0	14,9	29,2	100,0	37,0	0,083	0,037
PCR	(100/26/61)	53,8	36,5	23,0	69,2	41,0	-0,067	0,385

(1) nt: total de exames; np: número de diagnósticos positivos para *S. aureus* pelo exame ouro; nte: total de exames positivos pelo exame teste;

(2) Estimativa da sensibilidade

(3) Estimativa de especificidade

(4) Valor preditivo positivo

(5) Valor preditivo negativo

(6) Acurácia

(7) Coeficiente Kappa

(8) p: coeficiente de significância estatística

Frente aos resultados encontrados pode-se afirmar que o Sistema Petrifilm é o método de maior sensibilidade para a detecção de *S. aureus* em amostras de leite de tanques (100%), enquanto a PCR revelou maior especificidade (36,5%), quando comparados ao cultivo em Baird-Parker (Tabela 16).

A análise de concordância entre o Baird Parker e o método Petrifilm revela um valor de kappa próximo de zero, indicando que esta concordância é muito baixa e deve-se provavelmente ao acaso. Quanto à PCR, como o valor de kappa é negativo, sugere que não houve concordância entre os testes. Baseado nestes resultados, dentro das condições do presente estudo, pode-se

afirmar que tanto o Petrifilm quanto o PCR não são testes adequados para identificar *S. aureus* em amostras de leite oriundas de tanques de expansão, quando comparados ao Baird Parker.

O petrifilm revela-se altamente sensível, mas sua baixa especificidade denota a possibilidade deste teste estar considerando todos os estafilococos coagulase positivos, e não exclusivamente *S. aureus*, como sugere também o vpp de 29,2%. Essa observação corrobora com os dados do estudo realizado por Santos (2008), que afirma que esta técnica torna impossível a diferenciação de colônias de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, indicando a necessidade de realização de outros testes para real identificação dos microorganismos e emissão de resultados de maior confiabilidade, uma vez que as espécies avaliadas se comportaram de forma similar.

Segundo Last (1998) e MacKinnon (2000), a sensibilidade e a especificidade são atributos intrínsecos do teste. No entanto, os indicadores do desempenho, quando aplicados em condição de campo, são modificados pela proporção de casos da doença no rebanho, ou seja, pela prevalência. Assim, para estimar a validade do instrumento em condições operacionais deve-se calcular os indicadores denominados valor preditivo positivo e valor preditivo negativo, cujos valores variam com a prevalência. Entende-se por valor preditivo positivo a probabilidade de um caso identificado com determinada ferramenta ou método, ser de fato positivo. Valor preditivo negativo é a probabilidade de um resultado negativo obtido, ser de fato negativo. Os resultados dessas variáveis, que são influenciados pela sensibilidade e especificidade do teste, estão, dessa forma, ligados à prevalência de 42% de *S. aureus* encontrada, nas condições do presente estudo.

Neste estudo, foram encontradas 16 propriedades leiteiras que apresentaram o agente somente na primeira ou na segunda coleta. Um aspecto importante a ser considerado é a eliminação intermitente do *S. aureus* pelo leite, devido a seus mecanismos de patogenicidade que permitem sua permanência nos tecidos da glândula (SEARS et al., 1990). Além deste fator, pode-se considerar a possibilidade da introdução de novos animais ao rebanho ou a secagem de vacas, que poderiam determinar a presença ou ausência da detecção na segunda coleta.

Finalmente, observa-se que os resultados da ocorrência de *S. aureus* encontrada no presente estudo, quer pelo cultivo microbiológico padrão ou Petrifilm, quer pela técnica de PCR, permite reafirmar a importância do agente nas mastites bovinas. Estes resultados auxiliam no delineamento de medidas profiláticas no manejo das propriedades e na conscientização de profissionais, técnicos e produtores da importância do controle de *S. aureus*. Tais medidas contribuiriam na redução do impacto da enfermidade no rebanho e, de forma mais abrangente, na qualidade do leite produzido no país.

Existem variações clonais de *S. aureus* dentro de rebanhos individuais, conforme citado por Young et al. (2001). Variações de imunidade dos hospedeiros e a presença de diferentes cepas da bactéria no rebanho podem favorecer o desenvolvimento de processos crônicos e co-residência destes microrganismos no úbere. Estes processos podem determinar redução na eficiência dos testes fenotípicos como o de coagulase ou produção de acetoina, por exemplo, espelhando a possível necessidade de uma abordagem diagnóstica microbiológica mais abrangente.

Entre as principais desvantagens da cultura microbiológica estão o número reduzido de patógenos na amostra ou a presença de leucócitos de casos clínicos (PHUEKTES et al., 2001). A cultura microbiológica do tanque pode não ser suficientemente sensível para detectar quartos mamários com ciclos intermitentes de dispersão bacteriana durante a lactação e glândulas subclínicamente infectadas com baixa carga microbiana (OLIVER et al., 2004).

Segundo IORIO et al. (2007), que encontraram 55,6% de amostras de estafilococos atípicos a pelo menos um dos testes utilizados, a presença de amostras atípicas pode ser demonstrada pela variação de resposta aos testes de fenotipagem microbiológica.

6.4.1. Petrifilm® (PSE)

A prevalência de *S. aureus*, segundo o método PSE, foi de 100%. Todas as propriedades analisadas no presente estudo apresentaram o isolamento do agente por este método, em pelo menos uma das coletas.

Este método apresentou 100% de sensibilidade, detectando 89 amostras positivas para *S. aureus*. Todas as 26 amostras positivas pelo padrão-ouro (BP) foram também positivas pelo PSE. Silva et al. (2005) também verificaram valores satisfatórios de sensibilidade do *Petrifilm Staph Express Count Plate*[®], frente ao método de cultivo tradicional em ágar sangue, para a detecção de *S. aureus* em amostras de leite de quartos mamários de rebanhos bovinos nos Estados Unidos. Os autores verificaram que PSE apresentou 87,5% de sensibilidade, enquanto que o cultivo tradicional apresentou 65,6% de sensibilidade.

Quanto à especificidade, neste estudo PSE apresentou resultado insatisfatório (14,9%), frente ao obtido por Silva et al. (2005), que verificaram especificidade de 96% pelo mesmo método. Segundo estes autores, a identificação do halo pink ao redor das colônias suspeitas, após a incubação com disco de DNase, pode contribuir para um grande número de resultados falso-positivos, sugerindo a necessidade de melhor padronização dos critérios de interpretação pelos técnicos que utilizam este produto para diagnóstico.

Dentre as instruções de uso do PSE está a indicação de que, se apenas colônias vermelho-violeta estiverem presentes na placa, estas devem ser contadas como *S. aureus*, estando o teste concluído por não haver necessidade do uso do disco de DNase do kit *Petrifilm*[™] *Staph Express*. Como a legislação vigente (Brasil, 2001) prevê a pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo, a utilização do disco de DNase presume a presença destas cepas na amostra. Portanto, se o disco não é aplicado à placa sob análise, não se pode classificar o microorganismo tendo como base apenas a coloração das colônias, uma vez que outros estafilococos coagulase positivo também podem se apresentar sob essa cor, além de não ser obtida sua qualificação quanto à produção das enzimas pesquisadas. Assim sendo, a confirmação da identidade dos microorganismos é necessária para obtenção de resultados mais precisos para a análise. Esta opinião é compartilhada por Silva et al. (2005), que confirmaram a presença de *S. aureus* em apenas 8 das 35 placas de PSE que continham somente colônias típicas deste microorganismo. Estes dados corroboram com os encontrados por Santos (2008), que observou que as colônias de *S. intermedius* e *S. hyicus* também apresentavam esta coloração, o

que indica a necessidade de realização de outros testes para liberação de resultados com maior grau de confiabilidade.

6.4.2. PCR

A técnica de PCR identificou 61 amostras positivas, sendo 14 também positivas pelo BP. A prevalência de *S. aureus*, segundo a PCR, foi de 82%, e 41 das propriedades analisadas apresentaram o isolamento do agente por este método, em pelo menos uma das coletas.

Apesar da PCR ter apresentado valores de sensibilidade de 53,8% e especificidade de 36,5%, há que se considerar que o padrão-ouro (BP), detectou somente 26 amostras positivas para *S. aureus*, enquanto que a PCR detectou 61 positivas. Graber et al. (2007) também verificaram que a PCR foi mais sensível do que a bacteriologia convencional, para detecção de *S. aureus* em amostras de leite de mastite clínica. A técnica biomolecular apresentou ainda 100% de especificidade. Além disso, os pesquisadores verificaram uma elevada correlação ($R=0,925$) entre a contagem de UFC em ágar e a PCR quantitativa. Resultados similares foram obtidos por Phuektes et al. (2001), quando a PCR se revelou significativamente mais sensível que o cultivo microbiológico na detecção de *S. aureus*, apresentando limiares de detecção de 10^4 UFC/mL.

Outras adaptações têm permitido o incremento da sensibilidade e especificidade da técnica de PCR para a detecção de *S. aureus* em amostras de leite. Kumar (2009) realizou o pré-enriquecimento de leite bubalino (adição de 4 mL de TSB e incubação por 12 horas antes da extração do DNA), para a realização de PCR para pesquisa de *S. aureus*, e de outros patógenos de mastite. O autor verificou que esta prática não só aumentou a sensibilidade da técnica, como também auxiliou na detecção de patógenos viáveis, eliminando a possibilidade de detectar bactérias contaminantes mortas, o que evitou a ocorrência de resultados falso-positivos.

Por outro lado, deve-se considerar que a PCR, assim como qualquer outra técnica diagnóstica, também pode falhar. O *primer* Sa442 (MARTINEAU et al., 1998), utilizado no presente estudo, pode não detectar algumas

linhagens de *S. aureus*, como relatado por Klaasen et al. (2003). Estes pesquisadores verificaram que, apesar de terem identificado *S. aureus* (cepa 550226) pelos métodos tradicionais, quando realizaram a PCR utilizando o *primer* Sa442, o resultado foi negativo. Após o seqüenciamento de parte do gene 16S rRNA (BOERLIN et al., 2003), foi comprovada a identificação de *S. aureus*. Os autores concluem que a utilização unicamente da PCR com *primer* Sa442 pode apresentar resultados falso-negativos. Com efeito, outras técnicas biomoleculares, para pesquisa de genes espécie-específicos, como o gene *nuc* (BRAKSTAD et al., 1992), têm sido apontadas como opções diagnósticas complementares. Yang et al. (2007) utilizaram a PCR para pesquisa do gene *nuc* em amostras de leite cru e derivados lácteos, verificando que a técnica apresentou 100% de sensibilidade em comparação ao método de cultivo tradicional em meio Baird-Parker.

Deve-se ressaltar, no entanto, que Martineau et al. (1998) realizaram a PCR a partir de linhagens bacterianas padrão e, no presente estudo, foram utilizadas amostras de leite compostas (de tanque de expansão), que poderiam conter interferentes, tais como gorduras, sais, contaminantes, entre outros, que prejudicariam a detecção de *S. aureus*. Por este motivo, para reduzir a presença destes interferentes, utilizou-se kit comercial para extração de DNA, específico para amostras de leite. Além disso, todas as amostras que resultaram negativas pela PCR foram retestadas, para confirmação do resultado. Apesar de todas as possibilidades de falha diagnóstica da PCR, ainda assim a técnica detectou um maior número de amostras positivas, em relação ao teste ouro (BP).

Conclusões

7 – Conclusões

1. A ocorrência de *S. aureus* nos rebanhos estudados na região oeste de Santa Catarina foi de 42%, pelo método de cultivo em Baird-Parker.
2. As condições de manejo de ordenha abordadas não apresentaram relação com a presença de *S. aureus* no leite das propriedades estudadas.
3. Os resultados obtidos com o uso do *Petrifilm Staph Express Count Plate*[®] e da reação em cadeia pela polimerase na detecção de *S. aureus* em amostras de leite oriundas de tanques de expansão foram diferentes ($p < 0,05$).
4. A análise estatística dos resultados encontrados neste estudo demonstrou que a reação em cadeia pela polimerase – utilizando os *primers* Sa442-1 e Sa442-2 - não apresenta limiares de sensibilidade, especificidade, vpp e vpn que justifiquem seu uso como método de detecção de *S. aureus* em amostras de leite oriundas de tanques de expansão, quando comparados ao cultivo microbiológico em Baird-Parker.
5. A análise estatística dos resultados encontrados neste estudo demonstrou que o método *Petrifilm Staph Express Count Plate*[®] não apresenta limiares de sensibilidade, especificidade, vpp e vpn que justifiquem seu uso como método de detecção de *S. aureus* em amostras de leite oriundos de tanques de expansão, quando comparados ao cultivo microbiológico em Baird-Parker. Inclusive, o baixo limiar de especificidade sugere que este método possa considerar também outros estafilococos coagulase positivos não *S. aureus*.
6. Não foram detectados resíduos de antimicrobianos nas amostras de leite dos 50 tanques de expansão, avaliadas pelo método Delvotest[®].

Referências

8. Referências

- ALBUQUERQUE, L.M.B.; MELO, V.M.M.; MARTINS, S.C.S. Investigações sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza – CR – Brasil. **Higiene Alimentar**. v.10. n.41, p.29-32, 1996.
- ALMEIDA, A.C.; MENDES, C.P.A.; SILVA, D.B. Fatores determinantes da ocorrência de mastite bovina, detectada em rebanhos através da análise de leite em latões. **Higiene Alimentar**. v.19, n.134, agosto 2005.
- ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ANGELO, F.F.; SOUZA, G.H. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. V.58, n.3, p.440-446, 2006.
- BANNERMAN, D.D.; PAAPE, M.J.; LEE, Z.W.; ZHAO, X.; HOPE, J.C.; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol**. v.11, p.463-472, 2004.
- BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P.R. et al. (Eds). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: American Society for Microbiology. p.384-404. 1999. **Semina: Cienc. Agric**. v.20, n.1, p.12-15, 1999.
- BOERLIN, P.; KUHNERT, P.; HUSSY, D.; SCHAELLIBAUM, M. Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p.767-771, 2003.
- BRABES, K. et al., Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Rev NAPGAMA**.v.3, p.4-11, 1999.
- BRAKSTAD, O.G.; AASBAKK, K.; MAELAND, J.A. Detection of *Staphylococcus aureus* by PCR amplification of the *nuc* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.7, p.1654-1660, 1992.
- BRAMLEY, A.J. J.S.; CULLOR, R.J.; ERSKINE, L.K.; FOX, R.J.; HARMON, J.S.; HOGAN, S.C.; NICKERSON, S.P.; OLIVER, K.L.; SMITH, L.M.; SORDILLO. 1996. Current Concepts of Bovine Mastitis. **National Mastitis Council**, 4th ed., Madison, Wisconsin, USA, 1996, 64p.
- BRASIL. Instrução Normativa 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... **Diário Oficial da União**, Seção I, p.13, 2002.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O . Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Juiz de Fora, v.51, n.2, p.129-135, 1999.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A . S.; CARMO, R. A . Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de

Staphylococcus aureus isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Juiz de Fora, v. 53, n.5, p.531-537, 2001.

BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G. M. M. de; BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n.1, p-79-82, 2002.

CAMPOS, M.M.C. Avaliação de mastite bovina enfocando o California Mastitis Test, diagnóstico microbiológico e sensibilidade in vitro. Ceará, **Universidade Federal do Ceará**. 2000. 105p.

CAPURRO, A.; CONCHA, C.; NILSSON, L.; ÖSTENSSON, K. Identification of coagulase-positive *Staphylococci* isolated from bovine milk. **Acta Veterinaria Scandinava**, v.40, p.315-321, 1999.

CHOTÁR, M.; VIDOVA, B.; GODANY, A. A development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. **Folia Microbiol.**, v.51, n.6, p.639-646, 2006.

COSTA, E.O.; RAIA, R.; WATANABE, E.T.; GARINO JUNIOR, F.; COELHO, V. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite de quartos sadios não tratados. **Rev. NAPGAMA**. v.3, n.4, p.14-17. 2000.

COSTA, E.O. et al. Portador: Um importante elo na epidemiologia de mastite infecciosa bovina. **Revista NAPGAMA**, v.8, n.1, 2005.

COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A. et al. Estudo etiológico da mastite bovina. **Rev Bras Med Vet**. v.17, p.156-158, 1995.

COSTA, E.O. et al., Presença de resíduos de antibióticos no leite de pequena mistura de propriedades leiteiras. **Rev. NAPGAMA**. v.2, n.1, p.10-13. 1999.

COSTA, E.O. **Importância da mastite na produção leiteira do país**. Revista de Educação Continuada do CRMV-SP, fasc.1, v.1, p.3-9, 1998.

COSTA, E.O.; CARCIOFI, A.C.; MELVILLE, P.A.; PRADA, M.S.; SCAHLCH, U.; PAULA, C.R.; CORREA, B. GAMBALE, W. *Prototheca* spp outbreak of bovine mastitis. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 13, 1992, Santiago. **Anais...** Santiago, 1992. p.92.

COSTA, E.O.; GARINO, F.; FAGUNDES, H.; RAIA, R.; ARCARO, J.P. MÁRMORE, C. Comparação do nível de ocorrência de infecções em novilhas de primeira cria em duas propriedades leiteiras e avaliação custo/benefício da antibioticoterapia. **Rev.NAPGAMA**. v.7, n.1, p.14-19. 2004.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; VIANI, F.C.; MASCOLLI, R.; OLIVEIRA, P.J. Mastite bovina: CMT versus microbiológico. **Hora Veterinária**, v.15, n.89, p.53-54, 1996.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Mol. Cel. Probes**, v.19, p.299-305, 2005.

- CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; Malferrari, G.; BIUNNO, I.; VIMERCATI, C.; MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M. Technical Note: improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. **J Dairy Sci.** v.89, p.163-169. 2006.
- CULLOR, J.S.; VAN EENENNAAM, A.; GARDNER, L.; PERANI, J.; DELLINGER, W.L.; SMITH, T.; THOMPSON, M.A.; PAYNE, L.; JENSEN, L.; GUTERBOCK, W.M. Performance of various tests used to screen antibiotics residues in milk samples from individual animals. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** v.77, p.862-870, 1994.
- CUNHA, M.L.R.S. *Staphylococcus aureus*: Toxinas e Saúde Pública. Palestra. In: **Anais...** IV Encontro de Pesquisadores em Mastites. Botucatu, SP. p.56-63, 2007.
- CUNHA, M.L.R.S., PERESI, E., CALSOLARI, R.A.O., ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.1, p.70-74, 2006.
- DALY, P., COLLIER, T. e DOYLE, S. PCR-ELISA detection of *Escherichia coli* in milk. **Letters In Applied Microbiology**, v.34, n.3, p.222-226. 2002.
- DIEFFENBACH, C.W.; DRAGON, E.A.; DVEKSLER, G.S. Setting up a PCR laboratory. In: DIEFFENBACH, C.W.; DVEKSLER, G.S. (Eds.) **PCR primer: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. p.7-16.
- DOMINGUES, P.F. Novas tendências no tratamento da mastite bovina. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES DA MASTITE BOVINA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2, 1996, Nova Odessa. **Anais...** Nova Odessa, 1996, p.33-43.
- DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H.; PADOVANI, C.R. Influence of subclinical bovine mastitis on Milk production. **Vet. Zootec.** v.10, p.99-106, 1998.
- EBERHART, R. J. Coliform mastitis. **Veterinary Clinical North American Large Animal Practice**, v.6, n.2, p.287-300, 1984.
- EUZÉBY, J.P. Listo f bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 1997, 47, 590-592. (Listo f Procaryotic Names with Standing in Nomenclature. Last full update March, 05, 2008. URL: <http://www.bacterio.net>)
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações na saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, n4, p.1315-1320, 2004.
- FAGUNDES, H. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7 em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2006. 107f.
- FERREIRA, L.M. **Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados dos casos de mastite subclínica bovina**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva), Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Jaboticabal-SP, 2004.

FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E; ZAFALON, L. F.; SOUZA, V. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p-1228-1234, 2006.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Food Safety and Applied Nutrition. BENNETT, R.W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: _____. **Bacteriological and Analytical Manual Online**. USA. 2001. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>>. Acesso em: 16 mar. 2008.

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

FORSMAN, P., TILSALATIMISJARVI, A. e ALATOSSAVA, T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. **Microbiology-Uk**, v.143, p.3491-3500. 1997.

FOURNIER, C.; KUHNERT, P.; FREY, J.; MISEREZ, R.; KIRCHHOFER, M.; KAUFMANN, T.; STEINER, A.; GRABER, H.U. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. **Res. Vet. Science**, v.85, n.3, p.439-448, 2008.

FURLONG, J.; RIBEIRO, A.C.C.L. **Controle da Mastite**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [MAPA]. EMBRAPA. 2006. Disponível em: <HTTP://agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_71_21720039240.html> Acesso julho 2008.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S.S. de A.; SILVA, D. R. da; SILVEIRA FILHO, V. M. da; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J. de; MOTA, R. A. Perfil de Sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto Biologia**, São Paulo, v. 72, n. 2, p.171-177, 2005.

GANDRA, E.A. **Multiplex PCR para a detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado**. Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006. 81p.

GANDRA, E.A.; SILVA, J.A.; MACEDO, M.R.P.; ARAÚJO, M.R. MATA, M.M.; SILVA, W.P. Biochemical differentiation among *S.aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* isolated from bovines with subclinical mastitis. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.1, p.75-81, 2005.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the manual. In: BOONE, D.R.; CSTENHOLZ, R.W. (Eds). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York: Springer-Verlag. v.1, p.119-166. 2001.

GHADERSOHI, A., COELEN, R. J. e HIRST, R. G. Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *Mycoplasma bovis*. **Veterinary Microbiology**, v.56, n.1-2, p.87-98. 1997.

GODOY, M.F.; BRAILE, D.M. **Cálculos Estatísticos Básicos para Testes Diagnósticos**. 1999. Disponível em: <http://www.braille.com.br/DOWNLOAD/TestDiag.xls> Acesso em 27/03/2008.

- GOMES, M.J.P.; DUARTE, M.P.M.B.; FERREIRA, T.; TORRES, H.M. Mastite bovina: microrganismos identificados em rebanhos leiteiros – RS, Brasil. **Anais... IV Encontro de Pesquisadores em Mastites**. Botucatu, SP. p.80, 2007.
- GRABER, H.U.; CASEY, M.G.; NASKOVA, J.; STEINER, A.; SCHAEREN, W. Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in bovine mastitic milk. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.4661-4669, 2006.
- GREEN, M.J.; GREEN, L.E.; SCHUKKEN, Y.H.; BRADLEY, A.J.; PEELER, E.J.; BARKEMA, H.W.; HAAS, Y.; COLLIS, V.J.; MEDLEY, G.F. Somatic cell count distributions during lactation predict clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.5, p.1256-1264, 2004.
- GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A.S.M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência Agrotécnica**, v.29, n.2, p.216-222, 2005.
- HAAS, Y.; VEERKAMP, R.F.; BARKEMA, H.W.; GROHN, Y.T.; SCHUKKEN, Y.H. Associations between pathogen-specific cases of clinical mastitis and somatic cell count patterns. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.95-105, 2004.
- HIROSE, K., KAWASAKI, Y., KOTANI, K., TANAKA, A., ABIKO, K. e OGAWA, H. Detection of mycoplasma in mastitic milk by PCR analysis and culture method. **Journal Of Veterinary Medical Science**, v.63, n.6, p.691-693. 2001.
- HUYGENS, F., INMAN-BAMBER, J., NIMMO, G. R., MUNCKHOF, W., SCHOONEVELDT, J., HARRISON, B., MCMAHON, J. A. e GIFFARD, P. M. *Staphylococcus aureus* genotyping using novel real-time PCR formats. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.10, p.3712-3719. 2006.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 10/10/2009.**
- INGHAM, S.C.; BECKER, K.L.; FANSLAU, M.A. Comparison of the Baird-Parker Agar and 3M Petrifilm Staph Express Count Plate Methods for Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Naturally and Artificially Contaminated Foods. **Journal of Food Protection**, v.66, n.11, p.2151-2155, 2003.
- IORIO, N.L.P.; FERREIRA, R.B.R.; SCHUENCK, R.P.; MALVAR, K.L.; BRILHANTE, A.P.; NUNES, A.P.F.; BASTOS, C.C.R.; SANTOS, K.R.N. Simplified and reliable scheme for species-level identification of *Staphylococcus* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.8, p.2564-2569, 2007.
- JAYARAO, B.M.; PILLAI, S.R.; SAWANT, A.A.; WOLFGANG, D.R.; HEGDE, N.V. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.10, p.3561-3573, 2004.
- JOHNSON, W.M., TYLER, S.D., EWAN, E.P., ASHTON, F.E., POLLARD, D.R., ROZEE, K.R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinic Microbiology**, v.29, n.3, p.426-430, 1991.

KHAN, M. A., KIM, C. H., KAKOMA, I., MORIN, E., HANSEN, R. D., HURLEY, W. L., TRIPATHY, D. N. e BAEK, B. K. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by use of polymerase chain reaction analysis. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, n.7, p.807-813. 1998.

KIM, C. H., KHAN, M., MORIN, D. E., HURLEY, W. L., TRIPATHY, D. N., KEHRLI, M., OLUOCH, A. O. e KAKOMA, I. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. **Journal Of Dairy Science**, v.84, n.1, p.74-83. 2001.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v.48, n. p.167-188, 1981.

KLAASSEN, C.H.W.; DE VALK, H.A.; HORREVORTS, A.M. Clinical *Staphylococcus aureus* isolate negative for the Sa442 fragment. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.9, p.4493, 2003.

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. p.264-282. 1999.

KUMAR, P.A. Evaluation of PCR test for detecting major pathogens of bubaline mastitis directly from mastitic milk samples of buffaloes. **Tropical Animal Health Production**. DOI 10.1007/s11250-009-9360-5. Publicação on line em 07/05/2009. Acesso em: 18/07/2009.

LANCETTE, G.A. & BENNET, R.W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* enterotoxins. In: DOWNES, F.P. & ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington D.C.: SHERIDAN, 2001. p.387-404.

LANGENEGGER, J.; VIANI, M.C.; BAHIA, M.G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio Grande do Sul, v.1, n.2, p.47-52, 1981.

LANGONI, H. **Etiologia da mastite bovina subclínica e clínica: perfil de sensibilidade microbiana, controle e repercussão na produção leiteira e na saúde pública**. 1995. 200f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LANGONI, H. et al. Aspectos etiológicos da mastite bovina. **Rev Bras Med Vet**. v.20, p.204-210, 1998.

LAST, J.M. A dictionary of Epidemiology. 2ed. New York: Oxford University Press, 1988.

LEME, F.B.P.; DIAS, R.A.; RAMOS E SILVA, E.O.T. et al. Presença de antimicrobianos em amostras de diferentes tipos de leite comercializados na cidade de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 1, 2004, Passo Fundo – RS. **Anais...** Passo Fundo, 2004. (CD Room)

MACFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. Baltimore, Md, 21208, USA, 1976.

MACKINNON, D.P. **Introduction to statistical mediation analysis**. New York: Routledge Academic, 2000. 488p.

MAGALHÃES H.; GONÇALVES, W.M.; LIBERAL, M.H.T.; SOUZA, R.M.; CARVALHO, L.S.; COUTINHO, C.E.R.; POMBO, C.R.; SILVA, S.C.; LOPES, L.L.S. Microrganismos isolados de mastites clínicas e subclínicas em rebanhos bovinos. **Higiene Alimentar**, v.19, n.130, 2005.

MARTINEAU, F., PICARD, F.J., ROY, P.H., OUELLETTE, M., BERGERON, M.G. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, n.3, p.618-623, 1998.

MATSUNAGA, T.; KAMATA, S.; KAKIICHI, N.; UCHIDA, K. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **J Vet Med Sci**. v.55, p.297-300, 1993.

MEIRI-BENDEK, I., LIPKIN, E., FRIEDMANN, A., LEITNER, G., SARAN, A., FRIEDMAN, S. e KASHI, Y. A PCR-Based Method for the Detection of *Streptococcus agalactiae* in Milk. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.7, p.1717-1723. 2002.

MEDRONHO, R.A. **Epidemiologia**. Editora Atheneu. 2004. 493p.

MELO FILHO, A. Penicilina no leite de consumo na cidade de São Paulo e riscos de sensibilização. **Revista Paulista de Medicina**, v.75, p.87-92, 2003.

MELO, P.C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina**. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) UNESP (Universidade Estadual Paulista), Campus de Jaboticabal. 2008.

MENDONÇA, C.L.; FIORAVANT, M.C.S.; SILVA, J.A.B.A Etiologia da mastite bovina. **Veterinária Notícias**, v.5, n.1, p.107-118, 1999.

MORAES, C.R.; FUENTEFRÍA, A.M.; ZAFFARI, C.B.; CONTE, M.; ROCHA, J.P.A.V.; SPANAMBERG, A.; VALENTE, P.; CORÇÃO, G.; COSTA, M. Qualidade microbiológica do leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Sci. Vet.** v.3, n.3, p.259-264, 2005.

MOTA, R.A. et al. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do estado de Pernambuco. **Revista NAPGAMA**. v.7, p.10-13, 2004.

MURDOUGH, P.A.; DEITZ, K.E.; PANKEY, J.W. Effects of freezing on the viability of nine pathogens from quarters with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.2, p.234-336, 1996.

NADER-FILHO, A., SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., ROSSI JR., O.D. **Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite tipo B. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.35, n.5, p.621-630, 1983.

NADER-FILHO, A., SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., ROSSI JR., O.D., CEMBRANELLI, E.M. **Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.5, n.2, p.53-56, 1985.

NMC - NATIONAL MASTITIS SOUNCIL. Current concepts of bovine mastitis.

NMC - NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Laboratory and Field Handbook on Bovine Mastitis**. Virginia: WD Hoard & Sons Co., 1999.

NASCIMENTO, G.G.F.; MASTRO, V.; CAMPOS, V.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba – SP. **Rev. Nutr.**, v.14, p.119-124, 2001.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL RESEARCH COMMITTEE REPORT. Bovine Mastitis Pathogens and Trends in Resistance to Antibacterial Drugs. In : **NMC Annual Meeting Proceedings**, p. 400-414, 2004.

NOVAK, F. R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina em leite humano ordenhado. Rio de Janeiro, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 1999. 102p.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO, J.P.A.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M.; Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** V.25, n.1, p.191-5, 2005.

OLIVER, S. P., GONZALEZ, R. N., HOGAN, J. S., JAYARAO, B. M. e OWENS, W.N. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. Verona, WI: National Mastitis Council. 2004.

OSTRENSKY, A. **Efeitos de ambiente sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça Holandesa no Paraná**. Curitiba, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

PEREIRA, M.S.V. et al. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. **J Appl Microbiol.** V.35, p.32-36, 2002.

PEREIRA, U.P. et al. Mastite subclínica em bovinos leiteiros no sul de Minas Gerais. **Anais...** IV Encontro de Pesquisadores em Mastites. Botucatu, SP. p.92, 2007.

PHUEKTES, P., MANSELL, P. D. e BROWNING, C. F. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1140-1148. 2001.

PRESTES, D.S.; FILATI, A.; CECIM, M.S. Suscetibilidade à mastite: Fatores que a influenciam – Uma revisão. **Revista Faculdade Zootecnia Veterinária e Agronomia**, Araguaiana, v.9, n.1, p.48-59, 2003.

QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. Elsevier: Spain, 2004. 648p.

RADOSTITS, O.M. et al. **Veterinary Medicine**. 10th ed. Saunders Elsevier. 2007. 2156p.

RAIA Jr., R.B. **Fatores fisiológicos, clínicos e farmacológicos, determinantes de resíduos de antimicrobianos no leite, avaliados em protocolos terapêuticos de mastite em bovinos leiteiros**. Tese. (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2006.

RAIA, R.B.; COSTA, E.O.; GARINO JR., F.; WATANABE, E.T.; THIERS, F.O.; GROF, M.R. Estudo da persistência de eliminação de resíduos de antibióticos

no leite após tratamento sistêmico e intramamário de mastite. **Rev. NAPGAMA**. v.2, n.1, p.4-8, 1999.

RAIA, R.B.Jr. **Influência da mastite na ocorrência de resíduos de antimicrobianos no leite**. 2001. 78p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.

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

RIFFON, R.; SAYASITH, K.; KHALIL, H.; DUBREUIL, P. DROLET, M.; LAGACÉ, J. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n.7, p.2584-2589, 2001.

RISTOW, L.E.; PEREZ JUNIOR, A.A. Mastite: interpretação dos resultados de análises microbiológicas e antibiograma (Parte II) **Rev. Tecn. Da Bov. De Leite**, v.1, n.3, p. 51-55, 2006.

ROBERSON, J.R.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive *Staphylococci*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.30, p.3217-3219, 1992.

RUEGG, P. Relationship between bulk tank milk somatic cell count and antibiotic residues. **NMC Annual Meeting Proceedings**, p.28-35, 2005.

SAMBROOK, J. FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3ed. New York: Cold Spring: Harbor Laboratory Press, 1989.

SANT'ANA, A.S. et al. Comparação entre os métodos rápidos Simplate TPC – CI e Petrifilm AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. **Cienc. Tecnol. Aliment.** v.22, n.1, p.60-64, 2002.

SANTOS, A.K.R. **Comparação entre os meios de cultura Baird-Parker, Bairdarker – RFP e Petrifilmtm Staph Express na detecção de *Staphylococcus* coagulase positivo em leite cru naturalmente contaminado e em leite esterilizado inoculado com culturas específicas**. Dissertação (Mestrado em Inspeção e Tecnologia em Produtos de Origem Animal) Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte - MG, 2008.

SANTOS, C.D.M. ***Staphylococcus* sp e enterobactérias isoladas de mastite recorrente em oito rebanhos da região de Uberlândia-MG: perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos**. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia - MG, 2006.

SCHALM, O.W. & NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.130, n.5, p.199-207, 1957.

SCHUKKEN, Y.H.; SMIT, J.A.H.; GROMMERS, F.J.; VAN DE GEER, D.; BRAND, A. Effect of freezing on bacteriologic culture of mastitis milk samples. *Journal of Dairy Science*, v.72, p.1900-1906, 1989.

SEARS, P.M.; SMITH, S.; ENGLISH, P.; HERER, P.S.; GONZALEZ, R.N. Shedding Pattern of *Staphylococcus aureus* from Bovine Intramammary Infections. *J. Dairy Sci.* v.73, p. 2785-2789, 1990.

SILVA, B.O.; CARAVIELLO, D.Z.; RODRIGUES, A.C.; RUEGG, P.L. Evaluation of Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples. *Journal of Dairy Science*, v.88, n.8, p.3000-3008, 2005.

SILVA, W.P., GANDRA, E.A. **Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos**. Revista Higiene Alimentar, v.18, n.122, p.32-40, 2004.

SILVA, T.J.P.; SENA, M.C. Prevalência de antibióticos no leite pasteurizado tipo B e Especial 3,2% de gordura consumidos em Belo Horizonte. *Rev. Inst. Latic. Candido Tostes*, v.39, n.235, p.7-12, 1984.

SIRBENAGEL, K.M.; JECHOREK, R.P.; CAVER, C.N. 3M Petrifilm Staph Express Count Plate Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Dairy Foods: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, v.86, n.5, p.963-970, 2003.

SOL, J.; SAMPIMON, O.C.; HARTMAN, E.; BARKEMA, H.W. Effect of preculture freezing and incubation on bacteriological isolation from subclinical mastitis samples. *Veterinary Microbiology*, v.85, p.241-249, 2002.

SOUZA, J.J. Cadeia produtiva de leite em Santa Catarina. In: Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Geociências. **XXIV SEMAGEO – Resumos**. 2008. Florianópolis. Disponível em: <<http://www.cfh.ufsc.br/~gnc/semageo%2024/resumo24.htm>> Acesso em 10/10/2009.

SUTRA, L.; POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* v.40, p.79-89. 1994.

STOCK, L.A.; CARNEIRO, A.V.; TESTA, V.M.; PESSOAS, N.S.; MATTOS, L.L. Estrutura da produção de leite de Santa Catarina. In.: ZOCCAL, R. (Ed.) **Boletim CBLeite**. Consórcio Brasileiro para Comparação de Modelos de Produção de Leite. Embrapa Gado de Leite. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, ano 2, n. 5, out/2008. p6-9.

TESSINARI, A.R.; NODA, P.K.; FRANCO, G.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. Na evaluation of 3M Petrifilm Staph Express Count System for enumerating coagulase-positive *Staphylococcus*. *Food Quality*, Dec/Jan 2006. Disponível em: <http://www.foodquality.com/mag/12012005/fq_12012005_IL1.htm> Acesso em 02/04/2008> Acesso em 15/04/2008.

VIANA, L. C. **Duração das infecções naturais por estafilococos coagulase negativos e contagem de células somáticas em vacas primíparas**. Londrina, 2000. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal), Universidade Estadual de Londrina.

- VILLANUEVA, M.R.; TYLER, J.W.; THURMOND, M.C. Recovery of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* from fresh and frozen bovine milk. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.198, p.398-400, 1991.
- VOLTOLINI, T.V.; SANTOS, G.T.; ZAMBOM, M.A.; RIBAS, N.P.; MÜLLER, E.E.; DAMASCENO, J.C.; ÍTAVO, L.C.V.; VEIGA, D.R. Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho. **Acta Scientiarum**, v.23, n.4, p.961-966, 2001.
- WAAGE, S., MORK, T., ROROS, A. AASLAND, D., HUNSHAMAR, A., ODGAARD, S. A. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. **Journal Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 712-719, 1999.
- WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 16, p. 41-66, 1988.
- WINN Jr, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Koneman Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas colorido**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1565p. 2006.
- YANG, Y., XU-DONG, S.; YAO-WU, Y.; CHUN-YU, K.; YING-JUN, L.; WEI, Z.; XIAO-YING, Z. Detection of *Staphylococcus aureus* in Dairy Products by Polymerase Chain Reaction Assay. **Agricultural Sciences in China**, v.6, n.7, p.857-862, 2007.
- ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Alterações da composição e da produção de leite oriundo de quartos mamários de vacas com e sem mastite subclínica de acordo com o estágio e o número de lactações. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.4, p.419-426, out./dez., 2005
- ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, v.345, p.15-18, 2000.

Anexo

ANEXO 1

Extração de DNA utilizando o Milk Bacterial DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corporation)

Preparação do lisado (bactérias Gram negativas)

- a. Aliquotar 1 mL da amostra de leite em microtubo.
- b. Centrifugar a 14,000 x g (~14,000 RPM) durante 2 minutos.
- c. Deprezar o sobrenadante invertendo o microtubo e remover levemente o depósito de gordura na extremidade do microtubo, utilizando pipeta de 200 µL ou suabe. Assegurar que o pellet não foi destacado.
- d. Adicionar 400 µL de solução de lise e 10 µL de Proteinase K ao pellet celular e homogeneizar bem por vórtex.
- e. Incubar o lisado a 55°C durante 30 minutos.

Preparação do lisado (bactérias Gram positivas)

- a. Aliquotar 1 mL da amostra de leite em microtubo.
- b. Centrifugar a 14,000 x g (~14,000 RPM) durante 2 minutos.
- c. Deprezar o sobrenadante invertendo o microtubo e remover levemente o depósito de gordura na extremidade do microtubo, utilizando pipeta de 200 µL ou suabe. Assegurar que o pellet não foi destacado.
- d. Ressuspender o pellet em 100 µL de tampão de digestão. Incubar a 37°C durante 30 minutos.

Nota: Assegurar que a lisosima foi adicionada ao tampão de digestão.

- e. Após incubação, adicionar 300 µL de solução de lise e 10 µL de Proteinase K reconstituída à mistura de digestão e homogeneizar bem por vórtex.
- f. Incubar o lisado a 55°C durante 30 minutos.

2. Ligação da amostra à coluna

- a. Após incubação, adicionar 40 µL de solução de ligação e 180 µL de 96-100% etanol à mistura de lise e homogeneizar por vórtex.
- b. Centrifugar a amostra por 10 segundos a 14,000 x g (~14,000 RPM). Uma pequena camada lipídica poderá se formar na superfície da fase aquosa.

Utilizando uma pipeta, cuidadosamente transferir a fase aquosa límpida para a coluna que deve estar montada no tubo de coleção.

c. Centrifugar o sistema com a coluna durante 4 minutos a 5,200 x g (~8,000 RPM) para ligar o DNA bacteriano. Se todo o líquido não passar pela coluna, centrifugar por mais 1 minuto a 14,000 x g (~14,000 RPM).

3. Lavagem da coluna

a. Aplicar 500 µL de solução de lavagem 1 à coluna e centrifugar por 3 minutos a 14,000 x g (~14,000 RPM).

Nota: Assegurar que apropriada quantidade de etanol foi acrescida à solução de lavagem 1.

b. Descartar o filtrado e remontar a coluna no tubo de coleção.

c. Aplicar 500 µL de solução de lavagem 2 à coluna e centrifugar novamente por 3 minutos a 14,000 x g (~14,000 RPM).

d. Assegurar que toda a solução de lavagem 2 passou pela coluna e que a coluna está seca. Centrifugar por mais um minuto se necessário.

e. Descartar o tubo de coleção com o filtrado.

4. Eluição do DNA

a. Transferir a coluna ao tubo de eluição de 1,7 mL.

b. Aplicar 100 µL de tampão de eluição à coluna e centrifugar a 2,600 x g (~6,000 RPM) por 2 minutos.

c. Centrifugar por mais 2 minutos a 14,000 x g (~14,000 RPM) para completar a eluição do DNA.

Trabalho Científico

Artigo a ser enviado à Revista Ciência Rural.

Normas para publicação

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, quando for necessário o uso, devem aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito, quando apropriado, que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.**

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, devem aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito, quando apropriado, que o trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e, que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas.** (Modelo .doc, .pdf).

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) ou Agradecimento (s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal, caso existam devem aparecer antes das referências. **Antes das referências deverá também ser descrito, quando apropriado, que o trabalho foi**

aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da instituição e que os estudos em animais foram realizados de acordo com normas éticas. (Modelo .doc, .pdf).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests ***Tribolium confusum*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Tenebrio molitor*** (Coleoptera: Tenebrionidae), ***Sitophilus granarius*** (Coleoptera: Curculionidae) and ***Plodia interpunctella*** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, nov. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000.

Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 800 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

13. Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).

14. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

15. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

16. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

Detecção de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite bovino oriundas de tanque de expansão: comparação entre o métodos Petrifilm®STX e PCR, frente ao método tradicional em meio Baird-Parker.

***Staphylococcus aureus* detection from bovine bulk tank samples: comparison between Petrifilm®STX and PCR, with the tradicional methodology in Baird-Parker.**

Deolinda Maria Vieira Filha Carneiro^I Paulo Francisco Domingues^{II} Marcella Zampoli Troncarelli^I Patrícia Yoshida Faccioli^I Bruna Lapenna Sanches Ferreira^I Hélio Langoni^{II}

RESUMO: A metodologia de referência para a detecção de *Staphylococcus aureus* em alimentos recomenda o uso do ágar Baird-Parker (BP). No entanto, outros meios diagnósticos, que fornecem resultados mais rapidamente, como o Sistema *Petrifilm Staph Express Count Plate*® (PSE) e a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), também estão disponíveis no mercado. Este estudo teve como objetivo comparar a técnica de cultivo microbiológico em BP e perfil bioquímico (padrão ouro) com o PSE e a PCR, na detecção de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite oriundas de tanques de expansão. Os resultados encontrados demonstraram que a PCR – utilizando os *primers* Sa442-1 e Sa442-2 - não apresentou limiares de sensibilidade, especificidade, vpp e vpn que justifiquem seu uso como método de detecção de *S. aureus* em amostras de leite oriundas de tanques de expansão, quando comparados ao cultivo microbiológico em BP. Resultados semelhantes foram obtidos com o uso do método PSE, cujo baixo limiar de especificidade sugeriu incluir também outros estafilococos coagulase positivos não *S. aureus*.

Palavras-chave: Baird-Parker, mastite bovina, PCR, petrifilm, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT: The reference methodology for *Staphylococcus aureus* detection recommends the use of the Baird-Parker agar (BP). However, others culture media may produce results in a

I. Núcleo de Pesquisas em Mastites (NUPEMAS), Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)/Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-000, Botucatu, São Paulo, Brasil. E-mail: deovet@yahoo.com.br. * Autor para correspondência.
II. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. FMVZ/UNESP/Botucatu, SP, Brasil.

shorter time, as *Petrifilm Staph Express Count Plate*[®] (PSE) and the Polymerase Chain Reaction (PCR). Thus, this study had the objectives to compare the efficiency of the fore cited methodology for the detection of *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk. The findings showed that PCR – using the primers Sa442-1 e Sa442-2 - not provided thresholds of sensitivity, specificity, VPP and VPN justifying their use as a method of detection of *S. aureus* in bulk tank milk samples, when compared to microbiological cultivation in BP. Similar results were obtained with the use of PSE method, whose low threshold of specificity suggested include also other staphylococci coagulase-positive not *S. aureus*.

Keywords: Baird-Parker, bovine mastitis, PCR, petrifilm, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Sabe-se que o principal problema que afeta os rebanhos leiteiros, mundialmente, é a mastite, freqüentemente de origem bacteriana. Os *Staphylococcus* sp são os agentes etiológicos mais isolados em mastites (ALMEIDA, 2005; BRITO et al., 2002). Nesse gênero, a espécie *Staphylococcus aureus* é a mais prevalente em infecções de vacas leiteiras (WATTS, 1988; BRAMLEY et al., 1996; WAAGE et al., 1999). Dentre os diversos tipos de microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos pelo leite e derivados, se destaca o *S. aureus*, e por isto torna-se fundamental sua pesquisa no leite destinado ao consumo humano.

Detecção Microbiológica de *S. aureus* em Baird-Parker – padrão ouro

O Ágar Baird Parker (BP) é o meio recomendado pela American Public Health Association (APHA), Food and Drug Administration (FDA) e pela IN62 (BRASIL, 2003) para o isolamento de *S. aureus* em alimentos. Este meio utiliza a habilidade que o *S. aureus* possui de se desenvolver na presença de telurito de potássio, glicina, cloreto de lítio e polimixina, que são agentes seletivos. Suas características diferenciais baseiam-se na redução do telurito de potássio à telureto de potássio, produzindo colônias negras e a capacidade de hidrolisar gema do ovo, formando halos ao redor das colônias (LANCETTE e BENNET,

2001). Posteriormente, as colônias suspeitas típicas e atípicas devem ser identificadas por uma série de provas bioquímicas.

Sistema Petrifilm® (PSE)

O *Petrifilm® Staph Express Count System* é um teste mais rápido que as metodologias clássicas para identificação e contagem de *Staphylococcus* sp. em amostras de alimentos. Como não se baseia na produção de coagulase, o sistema provê o resultado em apenas 27 horas da incubação da amostra (SANT'ANA et al., 2002). O “kit” PSE consiste em uma placa de contagem e um disco. A placa de contagem é um cartão de papel quadriculado revestido de polietileno e recoberto com nutrientes desidratados em um gel hidrossolúvel frio, constituído por meio de BP modificado (meio seletivo e diferencial para *Staphylococcus aureus*, inclui em sua composição telurito de potássio e cloreto de lítio). O disco contém azul de toluidina, o qual facilita a visualização de deoxirribonuclease (DNase). Ao adicionar a amostra em teste (um mL) na placa de contagem, os nutrientes são imediatamente rehidratados, ocorre a solidificação do gel, após o que a placa estará pronta para ser incubada. Depois de transcorridas 24 horas de incubação a 37°C, conta-se o número de colônias vermelho-violetas, como sendo *S. aureus*. Na presença do crescimento de colônias com outra coloração que não vermelho-violetas, adiciona-se o disco sobre a placa e incuba-se novamente por 3 horas a 37°C. Contam-se então as colônias que apresentarem um halo rosado *pink*, como sendo *S. aureus* (SIRBENAGEL et al., 2003).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A biologia molecular tem contribuído, recentemente, em diversos aspectos no diagnóstico da mastite bovina, apresentando elevada sensibilidade e especificidade (RIFFON et al., 2001). Em função das limitações da metodologia convencional, protocolos para a detecção rápida de patógenos da mastite, baseados na PCR têm sido amplamente estudados e descritos (KHAN et al., 1998; KIM et al., 2001; PHUEKTES et al., 2001; RIFFON et al.,

2001). O uso da PCR no diagnóstico da mastite bovina fornece uma opção promissora para a rápida identificação bacteriana e, conseqüentemente, permite a tomada de medidas mais efetivas para a resolução do problema (CREMONESI et al., 2006). Vários pesquisadores afirmam que a detecção de *Staphylococcus aureus* por técnicas biomoleculares despende menor tempo e é mais sensível quando comparada aos métodos usuais (BRAKSTAD et al., 1992; KHAN, 1998; KIM et al, 2001; PHUEKTES et al., 2001; RIFFON, 2001).

O propósito deste experimento foi testar e comparar dois métodos descritos como sendo de rápida execução, sensíveis e específicos para a detecção de *S. aureus* no leite, com o método tradicional de isolamento em meio BP, considerado padrão ouro.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL: Foram realizadas duas colheitas mensais de uma amostra de 50mL de leite em cada umas das 50 (cinquenta) propriedades leiteiras selecionadas, amostras estas provenientes do leite produzido por cada propriedade no período máximo de 48 horas, perfazendo assim um total de 100 amostras de leite. Cada amostra foi colhida em frascos coletores universais esterilizados, diretamente do tanque de expansão, após o conteúdo do mesmo ter sido agitado por no mínimo cinco minutos. As amostras foram mantidas em caixa isotérmica com gelo e, em seguida aliquotadas em 20 microtubos de 1,5mL cada, e posteriormente congeladas até seu processamento no laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastite – NUPEMAS – FMVZ/UNESP Botucatu.

MÉTODOS: 1. Ágar Baird-Parker (padrão ouro): Para a contagem do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de *S. aureus* foram cultivados 0,1 mL de cada amostra de leite (e suas diluições, a 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em placas contendo 20 mL de ágar BP, espalhando-se o inóculo com o auxílio de alça de Drigalski estéril. As placas foram incubadas em condições de aerobiose à temperatura de 37°C por 48 horas. As colônias presuntivas típicas e atípicas de estafilococos coagulase positiva foram contadas, considerando-se como

típicas, aquelas circulares, lisas, convexas, 2-3mm de diâmetro, negras com textura úmida, bordas esbranquiçadas e rodeadas por uma zona opaca e freqüentemente com um halo transparente duplo e como colônias atípicas, aquelas negras ou acinzentadas com um ou dois halos e também aquelas sem os halos. Foram selecionadas cinco colônias típicas e cinco atípicas, havendo menos que cinco, todas eram utilizadas para caracterização. Todas as colônias selecionadas foram semeadas em caldo BHI (infusão cérebro-coração) e incubadas por 24 horas a 37°C. Estas amostras foram posteriormente semeadas em ágar-sangue bovino a 5% e incubadas a 37°C por 24 horas, quando se observavam as características das colônias, como formato, textura, coloração e hemólise.

As colônias sugestivas de microrganismos do gênero *Staphylococcus* foram submetidas à metodologia cujo passo-a-passo está demonstrado na Figura 1. As colônias classificadas como cocos Gram-positivos foram submetidas à prova da catalase. As colônias com reação catalase positiva foram semeadas em caldo BHI e incubadas por 24 horas a 37°C, sendo então submetidas à prova de coagulase lenta, com plasma de coelho (MAC FADDIN, 1976). As estirpes catalase e coagulase positivas foram submetidas à prova para verificação da produção de acetoina (caldo MRVP – Oxoid, Hampshire, Inglaterra) para a diferenciação entre *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*. As estirpes produtoras de acetoina foram testadas quanto à utilização ou não da maltose e trealose (MAC FADDIN, 1976), para a diferenciação entre *S. aureus* e *S. schleiferi* subespécie *coagulans*. O número de UFC/g ou mL foi calculado em função do número de colônias típicas e/ou atípicas obtidas, fator de diluição e porcentagem de colônias confirmadas.

2. Petrifilm® Staph Express Count System: Cada amostra foi utilizada em estado puro e a partir das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Adicionou-se 1 mL de cada amostra e de suas respectivas diluições sobre as placas, distribuindo-se uniformemente com um difusor específico, e incubou-se a 37°C por 24 horas. Colônias com coloração vermelho-violácea

foram identificadas como *S. aureus*. Nas colônias que apresentaram coloração diferente (não vermelho-violáceas), adicionou-se o disco com DNase sobre a placa, incubando-se novamente a 37°C por até 3 horas. Contaram-se as colônias que apresentaram um halo rosado *pink*, como *S. aureus*. Após o período de incubação, procedeu-se a contagem, considerando-se colônias vermelhas ou azuis rodeadas por uma área rosada como positivas para estafilococos.

3. **PCR:** A extração do DNA a partir das amostras de leite foi realizada utilizando-se kit comercial, *Milk Bacterial DNA Isolation Kit* (Norgen Biotek Corporation) segundo as instruções do fabricante. A escolha deste kit, que é específico para amostras de leite, se baseou na eliminação de substâncias interferentes, tais como gordura, sais, etc., que poderiam prejudicar a eficácia da PCR. Os *primers* espécie-específicos utilizados para a amplificação do *S. aureus* foram escolhidos de acordo com os resultados de MARTINEAU *et al.* (1998) que identificaram um fragmento de 108pb específico de *Staphylococcus aureus*, e desenvolveram os primers Sa442-1 e Sa422-2. Utilizou-se uma amostra de *S. aureus* padrão (ATCC 2592), utilizada para controle positivo e para realização da sensibilidade analítica das provas de cultivo microbiológico e da PCR, em solução salina e leite.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método tradicional de cultivo em meio BP, considerado como padrão-ouro, detectou o menor número de amostras positivas para *S. aureus*. As 26 amostras positivas detectadas por este método foram obtidas a partir do leite dos tanques de expansão de 21 rebanhos. Portanto, a prevalência de *S. aureus* nos rebanhos estudados foi de 42%.

A técnica de PCR identificou 61 amostras positivas, sendo 14 também positivas pelo BP. A técnica de Petrifilm® apresentou maior sensibilidade analítica, detectando 89 amostras positivas, com 26 confirmadas positivas pelo método de cultivo em BP. A técnica PSE apresentou maior sensibilidade analítica, detectando 89 amostras positivas, com 26 confirmadas positivas pelo método de cultivo em BP (Tabela 1).

Considerando os resultados de UFC, houve uma correlação positiva entre os dados obtidos pelos métodos BP e PSE, ou seja, na medida em que aumenta o número de UFC detectado pelo BP, também aumenta o número de UFC identificado pelo PSE. Estes dados corroboram os encontrados por INGHAM et al. (2003), que compararam o meio BP e o PSE para contagem de *S. aureus* em amostras de alimentos naturalmente ou artificialmente contaminados, inclusive leite cru. Os pesquisadores verificaram ótima correlação estatística entre ambos métodos utilizados.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, acurácia, coeficiente Kappa e valor de p, para os métodos de PSE e PCR, em comparação ao cultivo em meio BP (padrão-ouro).

No presente estudo, o método PSE apresentou 100% de sensibilidade, detectando 89 amostras positivas para *S. aureus*. Todas as 26 amostras positivas pelo padrão-ouro (BP) foram também positivas pelo PSE. Silva et al. (2005) também verificaram valores satisfatórios de sensibilidade do PSE, frente ao método de cultivo tradicional em ágar sangue, para a detecção de *S. aureus* em amostras de leite de quartos mamários de rebanhos bovinos nos Estados Unidos. Os autores verificaram que PSE apresentou 87,5% de sensibilidade, enquanto que o cultivo tradicional apresentou 65,6% de sensibilidade.

Quanto à especificidade, PSE apresentou resultado insatisfatório (14,9%), frente ao obtido por Silva et al. (2005), que verificaram especificidade de 96% pelo mesmo método. Segundo estes autores, a identificação do halo pink ao redor das colônias suspeitas, após a incubação com disco de DNase, pode contribuir para um grande número de resultados falso-positivos, sugerindo a necessidade de melhor padronização dos critérios de interpretação pelos técnicos que utilizam este produto para diagnóstico. Os autores sugerem ainda que PSE é uma opção diagnóstica interessante, especialmente em rebanhos onde *S. aureus* seja o microrganismo de interesse.

Apesar da PCR ter apresentado valores de sensibilidade de 53,8% e especificidade de 36,5%, no presente estudo, há que se considerar que o padrão-ouro (BP), detectou somente 26 amostras positivas para *S. aureus*, enquanto que a PCR detectou 61 positivas. GRABER et al. (2006) também verificaram que a PCR detectou mais resultados positivos do que a bacteriologia convencional, para detecção de *S. aureus* em amostras de leite de mastite clínica. Resultados similares foram obtidos por PHUEKTES et al. (2001), quando a PCR se revelou significativamente mais sensível que o cultivo microbiológico na detecção de *S. aureus*, apresentando limiares de detecção de 10^4 UFC/mL.

Porém, a análise de concordância (Tabela 2) entre o BP e o PSE revela um valor de *kappa* próximo de zero, indicando que esta concordância é muito baixa e deve-se provavelmente ao acaso. Quanto à PCR, como o valor de *kappa* é negativo, sugere que não houve concordância entre os testes. Baseado nestes resultados, dentro das condições do presente estudo, pode-se afirmar que tanto o PSE quanto o PCR não são testes adequados para detectar *S. aureus* em amostras de leite oriundas de tanques de expansão, quando comparados ao BP.

O PSE revela-se altamente sensível, mas sua baixa especificidade denota a possibilidade deste teste estar considerando todos os estafilococos coagulase positivos, e não exclusivamente *S. aureus*, como sugere também o vpp de 29,2%. Essa observação corrobora com os dados do estudo realizado por Santos (2008), que afirma que esta técnica torna impossível a diferenciação de colônias de *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, indicando a necessidade de realização de outros testes para real identificação dos microorganismos e emissão de resultados de maior confiabilidade, uma vez que as espécies avaliadas se comportaram de forma similar.

Outras adaptações têm permitido o incremento da sensibilidade e especificidade da técnica de PCR para a detecção de *S. aureus* em amostras de leite. KUMAR (2009) realizou o

1 pré-enriquecimento de leite bubalino, para a realização de PCR para pesquisa de *S. aureus*, e
2 de outros patógenos de mastite. O autor verificou que esta prática não só aumentou a
3 sensibilidade da técnica, como também auxiliou na detecção de patógenos viáveis, eliminando
4 a possibilidade de detectar bactérias contaminantes mortas, o que evitou a ocorrência de
5 resultados falso-positivos.

6 Por outro lado, deve-se considerar que a PCR, assim como qualquer outra técnica
7 diagnóstica, também pode falhar. O *primer* Sa442 (MARTINEAU et al., 1998), utilizado no
8 presente estudo, pode não detectar algumas linhagens de *S. aureus*, como relatado por
9 KLAASEN et al. (2003). Estes pesquisadores verificaram que, apesar de terem identificado *S.*
10 *aureus* (cepa 550226) pelos métodos tradicionais, quando realizaram a PCR utilizando o
11 *primer* Sa442, o resultado foi negativo. Após o seqüenciamento de parte do gene 16S rRNA
12 (BOERLIN et al., 2003), foi comprovada a identificação de *S. aureus*. Os autores concluem
13 que a utilização unicamente da PCR com *primer* Sa442 pode apresentar resultados falso-
14 negativos. Com efeito, outras técnicas biomoleculares, para pesquisa de genes espécie-
15 específicos, como o *nuc* (BRAKSTAD et al., 1992), têm sido apontadas como opções
16 diagnósticas complementares. YANG et al. (2007) utilizaram a PCR para pesquisa do gene
17 *nuc* em amostras de leite cru e derivados lácteos, verificando que a técnica apresentou 100%
18 de sensibilidade em comparação ao método de cultivo tradicional em meio BP.

19 Deve-se ressaltar, no entanto, que MARTINEAU et al. (1998) realizaram a PCR a partir
20 de linhagens bacterianas padrão e, no presente estudo, foram utilizadas amostras de leite
21 compostas (de tanque de expansão), que poderiam conter interferentes, tais como gorduras,
22 sais, contaminantes, entre outros, que prejudicariam a detecção de *S. aureus*. Por este motivo,
23 para reduzir a presença destes interferentes, neste estudo utilizou-se kit comercial para
24 extração de DNA, específico para amostras de leite. Além disso, todas as amostras que
25 resultaram negativas pela PCR foram retestadas, para confirmação do resultado. Apesar de

1 todas as possibilidades de falha diagnóstica da PCR, ainda assim a técnica detectou um maior
2 número de amostras positivas, em relação ao teste ouro (BP).

3 O que pode explicar a baixa sensibilidade do BP, é justamente uma das principais
4 desvantagens de qualquer cultura microbiológica, que apresentam redução de sua
5 sensibilidade quando há um número reduzido de patógenos na amostra ou a presença de
6 leucócitos de casos clínicos (PHUEKTES et al., 2001). A cultura microbiológica do tanque
7 pode não ser suficientemente sensível para detectar quartos mamários com ciclos
8 intermitentes de dispersão bacteriana durante a lactação e glândulas subclanicamente
9 infectadas com baixa carga microbiana. Além disso, contaminantes ambientais também
10 representam problema para a interpretação dos resultados da cultura. Segundo IORIO et al.
11 (2007), que encontraram 55,6% de amostras de estafilococos atípicos a pelo menos um dos
12 testes utilizados, a presença de amostras atípicas pode ser demonstrada pela variação de
13 resposta aos testes de fenotipagem microbiológica.

14 O efeito deletério às bactérias presentes nas amostras submetidas ao congelamento
15 poderia explicar, em parte, os resultados microbiológicos negativos. Porém, segundo Langoni
16 (2009, dados ainda não publicados), o processo de congelamento do leite não interfere na
17 multiplicação de *S. aureus*. Esta informação está de acordo com relatos de outros
18 pesquisadores (MURDOUGH et al., 1996; SCHUKKEN et al., 1989), que também não
19 observaram nenhum efeito do congelamento na recuperação de amostras de *S. aureus*.

20 CONCLUSÃO

21 Nas condições deste estudo, pode-se afirmar que o método *Petrifilm Staph Express*
22 *Count Plate*® e a PCR (utilizando os *primers* Sa442-1 e Sa442-2) não apresentaram limiares
23 de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN que justifiquem seu uso como método de
24 detecção de *S. aureus* em amostras de leite oriundas de tanques de expansão, quando
25 comparados ao cultivo microbiológico em Baird-Parker. O baixo limiar de especificidade

1 apresentado pelo método *Petrifilm Staph Express Count Plate*[®], sugeriu incluir também
2 outros estafilococos coagulase positivos não *S. aureus*.

3 Finalmente, observa-se que os resultados de prevalência (42%) de *S. aureus* relatada
4 pelo presente estudo, permitem reafirmar a importância do agente nas mastites bovinas. Estes
5 resultados auxiliam no delineamento de medidas profiláticas no manejo das propriedades e na
6 conscientização de profissionais, técnicos e produtores da importância do controle de *S.*
7 *aureus*. Tais medidas contribuiriam na redução do impacto da enfermidade no rebanho e, de
8 forma mais abrangente, na qualidade do leite produzido no país.

9 AGRADecIMENTOS

10 À FAPESP pelo auxílio financeiro e ao CNPq pela bolsa de doutorado do primeiro
11 autor.

12 REFERÊNCIAS

13 ALMEIDA, A.C.; MENDES, C.P.A.; SILVA, D.B. Fatores determinantes da ocorrência de
14 mastite bovina, detectada em rebanhos através da análise de leite em latões. **Higiene**
15 **Alimentar**. v.19, n.134, agosto 2005.

16 BANNERMAN, T.L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that
17 grow aerobically. In: MURRAY, P.R. et al. (Eds). **Manual of Clinical Microbiology**.
18 Washington: American Society for Microbiology. p.384-404. 1999. **Semina: Cienc. Agric.**
19 v.20, n.1, p.12-15, 1999.

20 BOERLIN, P.; KUHNERT, P.; HUSSY, D.; SCHAELLIBAUM, M. Methods for
21 identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. **Journal of**
22 **Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p.767-771, 2003.

23 BRAKSTAD, O.G.; AASBAKK, K.; MAELAND, J.A. Detection of *Staphylococcus aureus*
24 by PCR amplification of the *nuc* gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, n.7, p.1654-
25 1660, 1992.

1 BRAMLEY, A.J. J.S.; CULLOR, R.J.; ERSKINE, L.K.; FOX, R.J.; HARMON, J.S.;
2 HOGAN, S.C.; NICKERSON, S.P.; OLIVER, K.L.; SMITH, L.M.; SORDILLO. 1996.
3 Current Concepts of Bovine Mastitis. **National Mastitis Council**, 4th ed., Madison,
4 Wisconsin, USA, 1996, 64p.

5 BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G. M. M. de; BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para
6 identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**,
7 Santa Maria, v. 32, n.1, p-79-82, 2002.

8 CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; Malferrari, G.; BIUNNO, I.; VIMERCATI, C.;
9 MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M. Technical Note: improved method for rapid
10 DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. **J Dairy Sci.** v.89, p.163-169. 2006.

11 FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E; ZAFALON. L. F.; SOUZA, V .
12 Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos
13 de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p-1228-1234, 2006.

14 GRABER, H.U.; CASEY, M.G.; NASKOVA, J.; STEINER, A.; SCHAEREN, W.
15 Development of a highly sensitive and specific assay to detect *Staphylococcus aureus* in
16 bovine mastitic milk. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.4661-4669, 2006.

17 INGHAM, S.C.; BECKER, K.L.; FANSLAU, M.A. Comparison of the Baird-Parker Agar
18 and 3M Petrifilm Staph Express Count Plate Methods for Enumeration of *Staphylococcus*
19 *aureus* in Naturally and Artificially Contaminated Foods. **Journal of Food Protection**,
20 v.66, n.11, p.2151-2155, 2003.

21 IORIO, N.L.P.; FERREIRA, R.B.R; SCHUENCK, R.P.; MALVAR, K.L.; BRILHANTE,
22 A.P.; NUNES, A.P.F.; BASTOS, C.C.R.; SANTOS, K.R.N. Simplified and reliable scheme
23 for species-level identification of *Staphylococcus* clinical isolates. **Journal of Clinical**
24 **Microbiology**, v.45, n.8, p.2564-2569, 2007.

1 JAYARAO, B.M.; PILLAI, S.R.; SAWANT, A.A.; WOLFGANG, D.R.; HEGDE, N.V.
2 Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. **Journal of Dairy**
3 **Science**, v.87, n.10, p.3561-3573, 2004.

4 KHAN, M. A., KIM, C. H., KAKOMA, I., MORIN, E., HANSEN, R. D., HURLEY, W. L.,
5 TRIPATHY, D. N. e BAEK, B. K. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by use of
6 polymerase chain reaction analysis. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, n.7,
7 p.807-813. 1998.

8 KIM, C. H., KHAN, M., MORIN, D. E., HURLEY, W. L., TRIPATHY, D. N., KEHRLI, M.,
9 OLUOCH, A. O. e KAKOMA, I. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus*
10 *aureus* nuc gene in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.1, p.74-83. 2001.

11 KLAASSEN, C.H.W.; DE VALK, H.A.; HORREVORTS, A.M. Clinical *Staphylococcus*
12 *aureus* isolate negative for the Sa442 fragment. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.9,
13 p.4493, 2003.

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

17 KUMAR, P.A. Evaluation of PCR test for detecting major pathogens of bubaline mastitis
18 directly from mastitic milk samples of buffaloes. **Tropical Animal Health Production**. DOI
19 10.1007/s11250-009-9360-5. Publicação on line em 07/05/2009. Acesso em: 18/07/2009.

20 LANCETTE, G.A. & BENNET, R.W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal*
21 enterotoxins. In: DOWNES, F.P. & ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the**
22 **microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington D.C.: SHERIDAN, 2001. p.387-
23 404.

24 MAC FADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**.
25 Baltimore, Md, 21208, USA, 1976.

1 MARTINEAU, F., PICARD, F.J., ROY, P.H., OUELLETTE, M., BERGERON, M.G.
2 Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus*
3 *aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, n.3, p.618-623, 1998.

4 MURDOUGH, P.A.; DEITZ, K.E.; PANKEY, J.W. Effects of freezing on the viability of
5 nine pathogens from quarters with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.2,
6 p.234-336, 1996.

7 PHUEKTES, P., MANSELL, P. D. e BROWNING, C. F. Multiplex polymerase chain
8 reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes
9 of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1140-1148. 2001.

10 RIFFON, R.; SAYASITH, K.; KHALIL, H.; DUBREUIL, P. DROLET, M.; LAGACÉ, J.
11 Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine
12 mastitis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.7, p.2584-2589, 2001.

13 SANT'ANA, A.S. et al. Comparação entre os métodos rápidos Simplate TPC – CI e Petrifilm
14 AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios
15 mesófilos em sorvetes. **Cienc. Tecnol. Aliment**. v.22, n.1, p.60-64, 2002.

16 SCHUKKEN, Y.H.; SMIT, J.A.H.; GROMMERS, F.J.; VAN DE GEER, D.; BRAND, A.
17 Effect of freezing on bacteriologic culture of mastitis milk samples. **Journal of Dairy**
18 **Science**, v.72, p.1900-1906, 1989.

19 SILVA, B.O.; CARAVIELLO, D.Z.; RODRIGUES, A.C.; RUEGG, P.L. Evaluation of
20 Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples. **Journal of Dairy**
21 **Science**, v.88, n.8, p.3000-3008, 2005.

22 SIRBENAGEL, K.M.; JECHOREK, R.P.; CAVER, C.N. 3M Petrifilm Staph Express Count
23 Plate Method for the Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Selected Dairy Foods:
24 Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v.86, n.5, p.963-970, 2003.

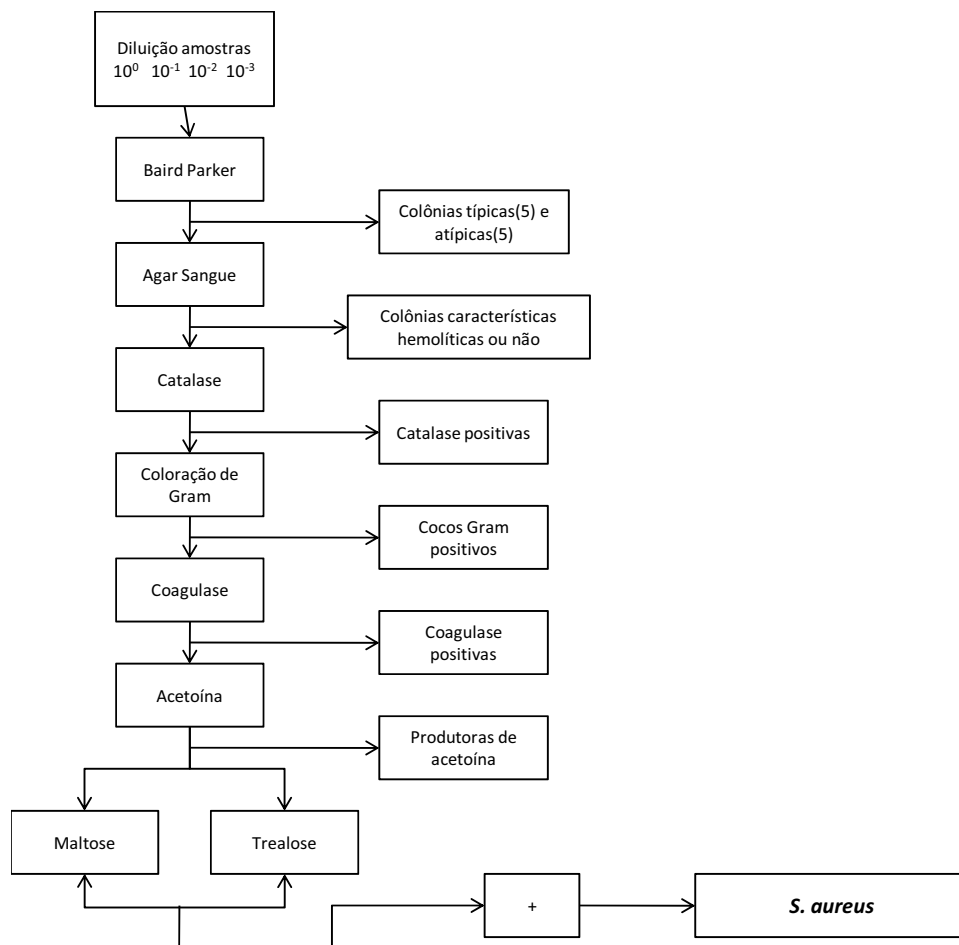
TESSINARI, A.R.; NODA, P.K.; FRANCO, G.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. Na
evaluation of 3M Petrifilm Staph Express Count System for enumerating coagulase-positive
Staphylococcus. **Food Quality**, Dec/Jan 2006. Disponível em:
<http://www.foodquality.com/mag/12012005/fq_12012005_IL1.htm Acesso em 02/04/2008>
Acesso em 15/04/2008.

WAAGE, S., MORK, T., ROROS, A. AASLAND, D., HUNSHAMAR, A., ODGAARD, S.
A. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 82,
n. 4, p. 712-719, 1999.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 16, p. 41-
66, 1988.

YANG, Y., XU-DONG, S.; YAO-WU, Y.; CHUN-YU, K.; YING-JUN, L.; WEI, Z.; XIAO-
YING, Z. Detection of *Staphylococcus aureus* in Dairy Products by Polymerase Chain
Reaction Assay. **Agricultural Sciences in China**, v.6, n.7, p.857-862, 2007.

1



2

3

FIGURA 1 - Fluxograma da detecção microbiológica de *S. aureus* clássica –

4

padrão ouro, das amostras de leite de tanques de expansão

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

TABELA 1. Frequências de detecção de *S. aureus* em 100 amostras de leite obtidas de tanques de expansão de propriedades leiteiras, segundo os três métodos diagnósticos utilizados.

Método	Frequência (%)
Cultivo microbiológico em ágar Baird-Parker	26
Cultivo microbiológico em <i>Petrifilm</i> [®] <i>Staph Express Count System</i>	89
Reação em cadeia pela polimerase (<i>primers</i> Sa441 e Sa442)	61

1
2 **TABELA 2.** Avaliação da acurácia dos métodos *Petrifilm® Staph Express Count System* e
3 PCR, frente ao cultivo tradicional, em meio Baird-Parker (padrão-ouro).

<i>Método</i>	<i>(nt/np/nte)⁽¹⁾</i>	<i>Sens⁽²⁾</i> (%)	<i>Esp⁽³⁾</i> (%)	<i>Vpp⁽⁴⁾</i> (%)	<i>Vpn⁽⁵⁾</i> (%)	<i>Ac⁽⁶⁾</i> (%)	<i>Kappa⁽⁷⁾</i>	<i>p⁽⁸⁾</i>
Petrifilm	(100/26/89)	100,0	14,9	29,2	100,0	37,0	0,083	0,037
PCR	(100/26/61)	53,8	36,5	23,0	69,2	41,0	-0,067	0,385

4 (1) nt: total de exames; np: número de diagnósticos positivos para *S. aureus* pelo exame ouro; nte: total de
5 exames positivos pelo exame teste; (2) Estimativa da sensibilidade ; (3) Estimativa de especificidade; (4) Valor
6 preditivo positivo; (5) Valor preditivo negativo; (6) Acurácia; (7) Coeficiente Kappa; (8) p: coeficiente de
7 significância estatística.