

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA E DA FORMAÇÃO DE
BIOFILMES POR ESTAFILOCOCOS EM MICRO-USINA DE
BENEFICIAMENTO DE LEITE**

Suzy Sviech dos Santos

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA E DA FORMAÇÃO DE
BIOFILMES POR ESTAFILOCOCOS EM MICRO-USINA DE
BENEFICIAMENTO DE LEITE**

Suzy Sviech dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Antonio Nader Filho

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – UNESP, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária - Medicina Veterinária Preventiva.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2009

Santos, Suzy Sviech dos
S237i Investigação da presença e da formação de biofilmes por
 estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite / Suzy Sviech
 dos Santos. – – Jaboticabal, 2009
 xv, 57 f. : il. ; 28 cm

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
 Orientador: Antonio Nader Filho
 Banca examinadora: Angela Cleuza F. B. de Carvalho, Luiz
 Francisco Zafalon
 Bibliografia

 1. Biofilmes. 2. Qualidade do leite. 3. *Staphylococcus* spp. 4.
 Usina de beneficiamento de leite. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade
 de Ciências Agrárias e Veterinárias.

 CDU 619:614.31:637.12

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



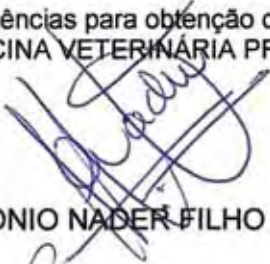
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

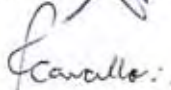
TÍTULO: INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA E DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR ESTAFILOCOCOS EM MICRO-USINA DE BENEFICIAMENTO DE LEITE.

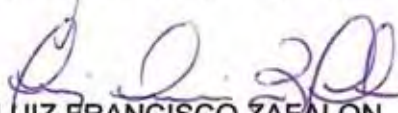
AUTORA: SUZY SVIECH DOS SANTOS

ORIENTADOR: Dr. ANTONIO NADER FILHO

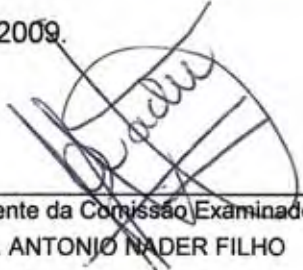
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MEDICINA VETERINÁRIA área de MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA pela Comissão Examinadora:


 Dr. ANTONIO NADER FILHO


 Dra. ANGELA CLEUSA DE FÁTIMA BANZATTO DE CARVALHO


 Dr. LUIZ FRANCISCO ZAFALON

Data da realização: 14 de julho de 2009.


 Presidente da Comissão Examinadora
 Dr. ANTONIO NADER FILHO

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SUZY SVIECH DOS SANTOS – nascida aos 17 de maio de 1973, na cidade de Curitiba – PR, é Medica Veterinária formada pela Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Centro de Ciências Agroveterinárias, em dezembro de 2002. Durante a graduação fez monitoria e estágios em diversas áreas, entre elas fez estágio no projeto de gado leiteiro da referida universidade. Em março de 2007 ingressou no programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal-SP, onde desenvolveu o projeto de pesquisa como bolsista da CAPES, e auxílio financeiro de pesquisa da FAPESP, além de outros trabalhos na mesma área.

Mensagem

*“A voz de Deus nos diz constantemente: uma falsa ciência faz um homem ateu, mas
uma verdadeira ciência leva o homem a Deus.”*

Voltaire

“O temor do Senhor é o princípio da ciência.”

Provérbios 1:7 – Bíblia Sagrada

Dedico

A Deus, porque d'Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas!

Aos meus pais Leopoldo e Darcy por terem investido em minha educação, por me deixarem “voar”, por dobrarem os seus joelhos e orarem a Deus por mim, por simplesmente me amarem.

Aos meus irmãos, sobrinhas, cunhados e sogros pelos gestos de carinho e palavras de apoio sempre.

Família, tempero da vida!

E muito especialmente ao meu marido, Márcio, pelo incentivo, puxões de orelha, carinho, amor e seu apoio incondicional mesmo tendo que ficarmos distantes por vários dias. Sorrimos sim! Muitas foram também as lágrimas nesse período, mas o Senhor nos tem sustentado!

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu refúgio, alento e paz nas dificuldades. Alegria presente nas minhas conquistas. Senhor e Salvador da minha vida. Motivo da minha existência e meu companheiro pra sempre e eternamente! “Teus, ó Senhor, são a grandeza, o poder, a glória, a majestade e o esplendor, pois tudo o que há nos céus e na terra é teu. Teu, ó Senhor, é o reino; tu estás acima de tudo. A riqueza e a honra vêm de ti; tu dominas sobre todas as coisas. Nas tuas mãos estão a força e o poder para exaltar e dar força a todos. Agora, nosso Deus, damos-te graças, e louvamos o teu glorioso nome.” 1Crônicas 29:11-13 – Bíblia Sagrada (NVI).

Ao **Prof. Dr. Antonio Nader Filho** pelo respeito e amizade, pela orientação e por ter apostado em mim. O privilégio de ter sido sua orientada foi uma benção de Deus!

Aos **Profs. Drs. Oswaldo Durival Rossi Júnior e Angela Cleuza F. B. de Carvalho** pelo apoio, colaboração, amizade e paciência durante a execução desse trabalho.

Ao pesquisador **Dr. Luiz Francisco Zafalon** da EMBRAPA Sudeste, São Carlos-SP, pela participação e inestimável colaboração na banca de defesa.

Aos meus **pais Leopoldo e Darcy** pelo exemplo de vida, caráter e persistência. Amor incondicional!

Ao meu **marido Marcio** por tudo que representa, é e faz por mim. Torna meus dias mais coloridos. Meu porto seguro! Benção de Deus na minha vida! Amo você pra sempre!

Aos meus **irmãos Márcia, Cristiane e Leandro** por terem acreditado sempre em mim e me incentivado.

Às minhas lindas **sobrinhas Dálety, Fabilly, Pâmelly, Vitória e Eduarda** que suavizaram essa caminhada com suas brincadeiras e sorrisos.

Aos meus **cunhados Marília, Eric, Fabiano, Milena, Marcel e Rebeca** pelo apoio em gestos e palavras e pelo carinho de irmãos.

Aos **sogros Jairo e Miriam** por terem me adotado como filha desde o primeiro dia.

As amigadas que surgiram durante esse período e espero que perdurem: **Maria Izabel (Belzoca queridona)**, não há palavras pra dizer o quanto você foi importante nessa conquista! **Poliana**, você fez de mim sua discípula de biofilme! **Luciano**, obrigada pela sua disposição em ajudar e seu sorriso sempre! **Viviane**, obrigada pelo apoio.

Ainda agradeço também a **Mônica, Fernanda (Joaninha), Thais, Cláudia, Laryssa, Kelly** e a cada um que, talvez com um simples sorriso, fez a diferença em meus dias.

A **Sra. Cristina Mazza Cavichioli** e sua filha **Celina** por me receberem como membro da família enquanto morei em sua casa. E a **Flávia** pelo convívio e carinho de irmã.

Meire e Roberta por me acolherem em seu apartamento e a conseqüente amizade que brotou.

Aos **demais professores** do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pelo agradável convívio e ensinamentos.

Aos **funcionários** do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, em especial **Liliana Biondi Naka (Lila)** e **Waldemar Dibelli Jr. (Diba)**, pela paciência em ensinar, carinho e respeito com que me trataram.

A **CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

A **FAPESP** – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro.

Agradecer sem correr o risco de omitir ninguém é um desafio! Por isso aqui agradeço a todos que sabem que direta ou indiretamente tiveram participação nessa conquista. Estarão todos em meu coração para sempre!

“Em todo o tempo ama o amigo e na angústia nasce o irmão.”

Provérbios 17:17 – Bíblia Sagrada

SUMÁRIO

Assunto	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Caracterização da micro-usina de beneficiamento de leite.....	17
4.2 Obtenção das amostras.....	19
4.3 Preparo das diluições das amostras e padrões estabelecidos.....	19
4.4 Isolamento, contagem e identificação das estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp.....	20
4.4.1 Teste da Catalase.....	21
4.4.2 Teste da Coagulase livre em Tubo.....	21
4.5 Extração do DNA.....	21
4.6 Amplificação de DNA cromossomal pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i>	22
4.7 Visualização de biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura	23
4.7.1 Suporte para adesão bacteriana	23

4.7.2 Obtenção do Inóculo	23
4.7.3 Análise de imagem por microscopia eletrônica de varredura	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1 Presença de <i>Staphylococcus</i> spp nas superfícies, tubulações e leite da micro-usina estudada.....	25
5.2 Ocorrência dos genes <i>icaA</i> e <i>icaD</i> , potencialmente formadores de biofilme, nas estirpes isoladas na micro-usina estudada	33
5.3 Ocorrência de adesão de <i>estafilococos</i> coagulase positivo, <i>estafilococos</i> coagulase negativo em superfície de aço inoxidável	37
6. CONCLUSÃO	43
7. REFERÊNCIAS	44

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Página
1. Distribuição das 41 estirpes de estafilococos coagulase-positivos e negativos, de acordo com o ponto de colheita, em Micro-usina de Beneficiamento de leite do Estado de São Paulo, 2008.....	25
2. Médias geométricas das contagens de estafilococos coagulase-positivos e negativos isolados em superfícies de equipamentos de micro-usina de beneficiamento de leite do Estado de São Paulo, antes e após o processo de higienização, 2008.....	27
3. Médias geométricas de estafilococos coagulase-positivos e negativos isolados a partir do leite cru contido em instalações de uma micro-usina de beneficiamento de leite do Estado de São Paulo, 2008.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Imagem de gel de eletroforese após reação de PCR, com as estirpes isoladas de <i>Staphylococcus</i> spp demonstrando a presença dos genes <i>icaA</i> . CN = Controle Negativo.....	34
2. Imagem de gel de eletroforese após reação de PCR, com as estirpes isoladas de <i>Staphylococcus</i> spp demonstrando a presença dos genes <i>icaD</i> . CN = Controle Negativo.....	35
3. Eletromicrografia de células aderidas em superfície de aço inox AISI 304 de estirpes isoladas de tanque de recepção antes da higienização: (A) estafilococos coagulase-negativo; (B) estafilococos coagulase-positivo.....	37
4. Eletromicrografia de células aderidas em superfície de aço inox AISI 304 de estirpes isoladas de tanque de estocagem de leite cru antes da higienização: (A) estafilococos coagulase-negativo; (B) estafilococos coagulase-positivo.....	38
5. Eletromicrografia de células aderidas em superfície de aço inox AISI 304 de estirpes isoladas: (A) estafilococos coagulase-negativo de tanque de estocagem de leite cru após a higienização; (B) estafilococos coagulase-positivo de tanque de estocagem de leite pasteurizado antes da higienização.....	38

6. Eletromicrografias de células aderidas em superfície de aço inox AISI 304 de estirpes isoladas da tubulação da máquina de envase antes da higienização: estafilococos coagulase-positivo.....	39
7. Eletromicrografias de células de estafilococos coagulase-positivo aderidas em superfície de aço inox AISI 304 de estirpes isoladas da tubulação da máquina de envase após a higienização.....	39
8. Eletromicrografias de células aderidas em superfície de aço inox AISI 304 de estirpes de estafilococos coagulase-negativo isoladas de: (A) Tanque de recepção; (B) Tanque de estocagem de leite cru; (C) Leite envasado.....	40

INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA E DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR ESTAFILOCOCOS EM MICRO-USINA DE BENEFICIAMENTO DE LEITE.

RESUMO: O leite é um alimento altamente nutritivo e excelente substrato para a multiplicação de microrganismos. Os estafilococos estão entre os principais contaminantes do leite, seja em decorrência da mastite ou de falhas de higienização. A contaminação do leite pode favorecer a adesão bacteriana sobre superfícies com a formação de biofilmes, cujos fragmentos podem se desprender e contaminar o produto durante o processo de beneficiamento, o que representa um risco à saúde do consumidor. Tendo isto em foco, objetivou-se o presente estudo, em uma micro-usina do Estado de São Paulo, a fim de investigar a presença e formação de biofilme por *Staphylococcus* spp, antes e após o processo de higienização. Colheu-se o total de 60 amostras por meio de suabes, antes e após o processo de higienização, das superfícies do tanque de recepção, do tanque de estocagem de leite cru, da tubulação de saída do pasteurizador, do tanque de estocagem de leite pasteurizado, e da tubulação da máquina de envase. Foram colhidas, ainda, amostras de leite no tanque de recepção, no tanque de estocagem de leite cru, na tubulação de saída do pasteurizador e amostras de leite envasado, assim como das embalagens plásticas vedadas e vazias, utilizadas para o envase do leite pasteurizado. Dentre 41 estirpes de *Staphylococcus* spp isoladas, 16 (39,0%) mostraram-se positivas na prova da coagulase, enquanto que 25 (61,0%) foram negativas. Por meio de análise genotípica, com a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pode-se observar que, dentre as 16 estirpes coagulase positivas, quatro (25%) apresentavam o gene *icaA* e 16 (100%) possuíam o gene *icaD*. Dentre as 25 estirpes coagulase negativas, 11 (44%) possuíam o gene *icaA* e 25 (100%) possuíam o gene *icaD*. Visualizou-se, por meio da microscopia eletrônica de varredura, o início de adesão bacteriana e a formação de biofilme por parte de todas as estirpes isoladas. Pelos resultados obtidos foi possível evidenciar o risco potencial à saúde do consumidor representado pela presença de estirpes de estafilococos

decorrente da matéria prima contaminada, ou por deficiências na higienização, com formação de biofilme pelos microrganismos.

Palavras-chaves: biofilmes, contaminação bacteriana, genes *icaAD*, qualidade do leite, usina de beneficiamento de leite, *Staphylococcus* spp

INVESTIGATION OF THE PRESENCE AND FORMATION OF BIOFILMS BY STAPHYLOCOCCUS IN A MILK PROCESSING MICRO-DAIRY.

ABSTRACT: Milk is a highly nutritious food and excellent substrate for the multiplication of microorganisms. Staphylococci are one of the major contaminants of milk whether due to mastitis or hygiene failures in cleaning. Milk contamination may encourage bacterial adherence on surfaces with the formation of biofilms, whose fragments can detach and contaminate the product during beneficial processing, which represents a health risk to the consumers. With this in focus as the objective of this present study, to investigate the presence and formation of biofilm of *Staphylococcus* spp before and after the cleaning process in a micro-dairy plant in São Paulo State. A total of 60 swab samples were collected before and after the cleaning process from the reception tank surfaces, the raw milk storage tank storage, the pasteurizer outlet pipe, the pasteurized milk storage tank, and the filling machine. Further samples were collected of the milk in the receiving tank, the raw milk storage tank, from the pasteurizer outlet pipe, and packaged milk, as well as the empty sealed plastic packaging used for packaging the pasteurized milk. Of the 41 strains of isolated *Staphylococcus* spp, 16 (39.0%) indicated positive in the coagulase test, while 25 (61.0%) were negative. Through genetic analysis, using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, it was observed that within the 16 strains of coagulase-positive, four (25%) presented the gene *icaA* and 16 (100%) had the gene *icaD*. Of the 25 strains of coagulase-negative, 11 (44%) had the gene *icaA* and 25 (100%) had the gene *icaD*. It was seen using a scanning electron microscope the start of bacteria adhesion and the formation of biofilm for all the isolated strains. From the obtained results it was possible to see evidence to the potential risk to the health of the consumer represented by the presence of strains of staphylococcus arising from the contaminated raw material or from deficiencies in hygienic cleaning, with formation of microorganisms' biofilms.

Keywords: biofilms, bacterial contamination, genes *icaAD*, milk quality, milk processing dairy, *Staphylococcus* spp

1. INTRODUÇÃO

A higiene na indústria de alimentos é tema de constantes estudos e programas, pois falhas nos procedimentos de higienização favorecem a aderência de resíduos aos equipamentos e superfícies, de modo a se transformarem em potencial fonte de contaminação e substrato para a multiplicação de microrganismos.

Na indústria de laticínios, a formação de biofilmes dentro da linha de produção eleva a carga microbiana e, muitas vezes, contamina com patógenos os alimentos devido ao eventual desprendimento de porções aderidas. Desta maneira, podem colocar em risco a saúde do consumidor, além de ocasionar prejuízos financeiros à indústria, em decorrência da diminuição da vida de prateleira dos produtos alimentícios.

O leite, devido a sua composição, é considerado um dos alimentos mais ricos nutricionalmente, sendo um ótimo substrato para a multiplicação de microrganismos. A higienização das tubulações nas indústrias se mostra de fundamental importância para a manutenção da qualidade sensorial e microbiológica do produto.

As estirpes de *Staphylococcus* spp, potencialmente produtoras de enterotoxinas, quando presentes no leite beneficiado, podem evidenciar uma possível contaminação pós-processamento oriunda do contato humano pela pele, boca ou nariz com o alimento processado. Sob determinadas condições, os microrganismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam crescimento celular. Essa multiplicação dá origem a colônias e quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, está formado o biofilme.

Os biofilmes são depósitos onde os microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, denominados glicocálix. Existem vários fatores relacionados à formação de biofilmes, dentre os quais destacam-se as características físico-químicas do material sobre o qual estão aderidos e expressão de fatores de virulência por parte dos microrganismos, como a produção de cápsula exopolimérica e fímbrias.

Em um biofilme os microrganismos estão mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos, como os sanificantes usados nos procedimentos de higienização. Os sanificantes utilizados na indústria, em testes laboratoriais dentro das condições indicadas pelos fabricantes, conseguem ser aprovados em testes como suspensão e diluição de uso, alcançando até 5 reduções decimais após 30 segundos de contato a 20°C. Mas em meios de cultivos, sólidos ou líquidos não há formação de glicocálix, fundamental ao processo de adesão, o que pode resultar em falsos resultados de eficiência.

Diante do exposto justifica-se a realização desta investigação, uma vez que a detecção de estirpes de *Staphylococcus* spp potencialmente formadoras de biofilme antes e após a higienização dos equipamentos, da indústria beneficiadora de leite, pode representar um fator de risco de intoxicação para o consumidor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O leite é considerado um dos alimentos mais ricos nutricionalmente devido à sua composição protéica, de vitaminas e sais minerais, podendo ser consumido na forma original ou como derivados (queijos, iogurtes, manteiga e sobremesas). Além disso, esse alimento pode ser veículo de várias bactérias patogênicas (MOURA et al., 1993; SILVA et al., 2000; FRANCO et al., 2000).

O leite obtido assepticamente contém, aproximadamente, entre 10^2 a 10^3 UFC de microrganismos mesófilos/mL, entretanto, o leite recém ordenhado em condições inadequadas pode apresentar uma carga bacteriana mais elevada, entre 5×10^3 a 5×10^4 UFC mesófilos/mL, compreendendo os contaminantes procedentes de várias fontes (HAYES, 1993). Essa grande concentração de microrganismos se desenvolve ao usar o leite como substrato (EVANGELISTA, 1992). A contagem bacteriana total do leite pode aumentar significativamente quando em contato com equipamentos nos quais a limpeza e sanitização são deficientes, pois os microrganismos proliferam nos resíduos de leite presentes em recipientes, borrachas, junções e qualquer outro local onde ocorra seu acúmulo (SILVA, 2006^b).

De acordo com *Center For Disease Control* nos EUA, as bactérias são responsáveis pela ocorrência de cerca de 70% dos surtos e 95% dos casos de toxinfecções alimentares (ANDRADE et al., 2003). PEREIRA & PEREIRA (2005) citam que, de acordo com dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, a intoxicação alimentar estafilocócica corresponde a aproximadamente 4,5% das doenças alimentares de origem bacteriana, sendo responsável por 1753 hospitalizações e duas mortes a cada ano.

FREITAS (1995) relata que utensílios e equipamentos contaminados participam do aparecimento de aproximadamente 16% dos surtos. Segundo dados do *Food and Drug Administration* (FDA), agência que regulamenta os setores de alimentos e medicamentos nos Estados Unidos da América do Norte, aproximadamente dois terços das etiologias confirmadas de toxinfecções veiculadas por alimentos estão diretamente

associadas a contaminações microbiológicas ocorridas em indústrias, principalmente de origem bacteriana (FDA, 1997).

As doenças de origem alimentar são desenvolvidas por múltiplas falhas, como refrigeração inadequada, manipuladores infectados, processo térmico insuficiente, contaminação cruzada, higiene incorreta, utilização de sobras ou uso de produtos clandestinos (GUIMARÃES & ANDRADE, 2008). Alimentos de origem animal, especialmente o leite e seus derivados, aparecem associados a surtos de toxinfecção alimentar, representando um problema de saúde pública (VIEIRA, 2007).

Os microrganismos patogênicos e deterioradores podem contaminar o leite em qualquer uma das etapas de produção, beneficiamento, distribuição e consumo. Práticas inadequadas de manejo, higienização deficiente de equipamentos em sala de ordenha, conservação inadequada e higienização deficiente de equipamentos de beneficiamento tornam o leite suscetível a contaminação (FRANCO et al., 2000). As máquinas de envase de leite pasteurizado já foram confirmadas como importante fonte de contaminação desse alimento, contribuindo para sua deterioração e conseqüente diminuição da vida de prateleira (SALUSTIANO, 2007). NADER FILHO et al. (1989) sugere a possibilidade de contaminação do produto entre a saída do pasteurizador e o envase, em função da provável ocorrência de falhas de higienização dos equipamentos que entram em contato com o leite.

A presença de *Staphylococcus aureus* em um alimento se interpreta, em geral, como um indicativo de contaminação a partir da pele, da boca e das fossas nasais dos manipuladores dos alimentos, no entanto o material e equipamentos sujos e as matérias primas de origem animal podem ser a fonte de contaminação. Quando se encontra um grande número de estafilococos em um alimento, significa, em geral, que as práticas de limpeza e desinfecção e o controle de temperatura não foram, em algum ponto, adequados (ICMSF, 1996). Quando os processos higiênico-sanitários não são adequados, bactérias poderão contaminar o leite, colocando em risco a saúde do consumidor. Nesse aspecto, é crescente a preocupação com a qualidade desse produto de alto valor nutritivo e tão importante na dieta das pessoas (PEREIRA et al., 2006). As falhas ocorridas durante o processo de beneficiamento, aliadas às elevadas

temperaturas de conservação do produto no comércio varejista, são fatores que contribuem significativamente para a comercialização de um produto com qualidade microbiológica inferior à estabelecida pelos referidos padrões legais (NADER FILHO, 1996).

De acordo com TIRADO & SCHIMIDT (2001) em se tratando do cenário epidemiológico mundial, *S.aureus* são considerados a terceira mais relevante causa de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). A sua principal fonte de entrada na cadeia de leite é por meio da matéria-prima contaminada, visto que microrganismos desta espécie estão entre os agentes etiológicos da mastite bovina (CREMONESI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007).

O *Staphylococcus aureus* é um dos principais responsáveis e provavelmente o agente mais isolado em casos de mastite, enquanto a infecção da glândula mamária por estafilococos coagulase-negativa é de alta incidência e longa duração, e pode afetar a composição e a produção do leite. Esses fatores justificam a atenção dada a esses microrganismos como agentes etiológicos da mastite bovina (AMARAL et al, 2003).

Sabe-se que a ausência da realização diária das análises físico-químicas, enzimáticas e microbiológicas, além de impossibilitar a avaliação da qualidade do leite pasteurizado distribuído ao consumo, inviabiliza a rápida identificação e imediata correção das prováveis falhas no processo de beneficiamento (NADER FILHO, 1997, citado por PARO et al. 2003).

Além disso, outra importante fonte de contaminação, ao longo do fluxo de produção seriam os funcionários, haja vista a possibilidade de serem reservatórios naturais desta bactéria. ANDRÉ et al. (2008) em pesquisas sobre a prevalência de *S. aureus* em uma unidade de produção de leite e derivados em Goiás, Brasil, detectaram que 75% de funcionários, de um total de 140, apresentavam este microrganismo em suas mãos.

De acordo com FRANCO & LANDGRAF (1996) e VANDERZANT & SPLITTSTOESSER (1992), citados por OLIVEIRA (2005), os estafilococos apresentam-se na forma de cocos Gram-positivos, isolados ou agrupados em cachos, pares ou tétrades. São anaeróbios facultativos, com maior crescimento sob condições aeróbias,

não esporogênicos, produtores usuais de catalase e imóveis. São bactérias mesófilas apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7° a 47,8°C, mas as enterotoxinas são produzidas entre 10 e 46°C, com ótimo entre 40°C e 45°C. As bactérias deste gênero são tolerantes a concentrações de 10 a 20% de NaCl e a nitratos. Crescem em valores de atividade de água inferiores aos considerados mínimos para as bactérias não-halófilas. O valor mínimo de atividade de água (Aa) considerado é de 0,86, no entanto, em condições ideais, o desenvolvimento é possível em Aa de 0,83. Esse microrganismo cresce na faixa de pH entre 4 e 9,8, com ótimo entre 6 e 7.

O gênero *Staphylococcus* está subdividido em 40 espécies, que se dividem de acordo com a síntese ou não da enzima coagulase, sendo a maioria, coagulase negativas, com exceção do *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini* (BANNERMAN et al., 2003; KWOK & CHOW, 2003).

Os estafilococos formam um importante grupo de bactérias que podem ser isolados de várias áreas da superfície cutânea, incluindo canais foliculares, aberturas das glândulas sudoríparas, o lume dos folículos sebáceos e sobre a superfície ou debaixo das escamas epiteliais em descamação. Além destas áreas, podem ser isolados das mucosas da faringe, conjuntivas, boca, glândulas mamárias e tratos intestinal, geniturinário e respiratório, áreas nas quais estas bactérias são consideradas habitantes secundários (KEIM, 2005).

Em relação a alimentos, os estafilococos são importantes pelas seguintes razões: primeiro, porque sua presença pode indicar deficiência de processamento ou condições higiênicas inadequadas do processo; segundo, porque suas enterotoxinas, uma vez presentes no alimento, poderão causar intoxicação alimentar (GANDRA, 2006)

Na intoxicação alimentar estafilocócica, os sintomas ocorrem entre duas e quatro horas após a ingestão da toxina pré formada no alimento e os mais comuns são vômito, náuseas, dores abdominais e diarreia (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989). Alguns indivíduos podem não apresentar todos os sintomas associados à doença e, em casos mais graves, dor de cabeça, contrações musculares e mudanças transitórias na pressão sanguínea e na pulsação podem acontecer. Os casos de óbito são raros, embora a reposição de eletrólitos possa ser necessária para compensar a perda de

fluídos pela diarreia e vômito. Porém, existem registros de morte por intoxicação estafilocócica entre idosos, crianças e pessoas severamente debilitadas (HALPIN-DOHNALEK & MARTH, 1989; ICMSF, 1996).

Até recentemente, considerava-se que a produção de enterotoxinas era restrita à espécie coagulase-positiva *Staphylococcus aureus*, porém, VALLE *et al.* (1990) descreveram que outros estafilococos produtores de coagulase como *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius* também possuíam essa característica. Outro estudo evidenciou que espécies coagulase-negativas como *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus sciuri* e *Staphylococcus lentus* são também capazes de produzir toxinas em condições laboratoriais (PEREIRA *et al.*, 2001).

PEREIRA *et al.* (2001) cita dados de literatura que relatam, de maneira exígua, mas consistente, dois episódios de intoxicação alimentar nos quais estafilococos não produtores de coagulase foram evidenciados. O primeiro teve lugar no Japão com a participação de 40 estudantes, onde o agente causal foi igualmente detectado nas fezes e em superfícies de pratos utilizados em lanche do hotel (OMORI & KATO, 1959). O segundo, no qual 145 comensais manifestaram a doença, *S. epidermidis* produtor de “SEA” (enterotoxinas estafilocócicas) foi detectado na carne consumida e também em lesões secas de impetigo presentes nas mãos de um manipulador, caracterizando o primeiro registro de detecção de enterotoxina sintetizada a partir de espécie não produtora de coagulase (BRECKINRINDGE & BERGDOLL, 1971).

No Brasil, foi verificado um surto de intoxicação estafilocócica associado a estafilococos coagulase-negativa no leite cru (CARMO *et al.*, 2002). Portanto, a contagem desses microrganismos não deve ser ignorada nas investigações de surtos de toxinfecções alimentares (ATAIDE, 2006).

Ao ser examinada a produção de toxinas superantigênicas em 136 estafilococos coagulase-negativos isolados de lesões cutâneas em humanos, encontrou-se nove espécies que produziram uma ou mais enterotoxinas. Isolou-se enterotoxina estafilocócica B (SEB) em três estirpes de *Staphylococcus caprae*, uma de

Staphylococcus hominis e uma de *Staphylococcus kloosii*. A enterotoxina estafilocócica C (SEC) foi isolada de uma estirpe de *Staphylococcus hominis*, a associação de SEB e TSST1 (toxina da síndrome do choque tóxico) de *Staphylococcus chromogenes* e a associação de SEC e TSST1 de *Staphylococcus caprae* (AKIYAMA, et al., 2000). Em estudo de 272 estafilococos coagulase-negativo isolados da pele e do leite de cabras sadias, foram encontradas 60 amostras enterotoxigênicas (VALLE et al., 1990), o que justifica a preocupação em se diagnosticar a presença de estafilococos coagulase-negativo também em usina de beneficiamento de leite.

Apesar das indústrias, cozinhas e órgãos reguladores trabalharem pela produção e sistemas de processamentos que garantam que todos os alimentos sejam seguros e saudáveis, a isenção completa de perigos ou riscos é um objetivo inatingível. A segurança dos alimentos e saúde do consumidor estão relacionadas a níveis de riscos e perigos biológicos que a sociedade considera razoáveis, por não executarem sistema ou programas que previnam a segurança e qualidade dos consumidores (SILVA, 2006^b).

A monitoração e avaliação da efetividade da higienização em ambientes de produção de alimentos constituem um ponto crítico no controle de qualidade higiênico-sanitária. As consequências de um controle ineficiente de higiene podem levar a intoxicações alimentares, perdas totais de lotes produzidos e interrupção de processos de produção (HAYES, 1993). Segundo FEIJÓ et al (2002), a adoção de tecnologias que objetivam promover uma higienização eficiente dos equipamentos é uma necessidade das indústrias de laticínios. Assim, para garantir e manter a qualidade do leite torna-se necessário o monitoramento do processo de higienização, para evitar a formação de biofilmes e instituir ações corretivas, quando necessário.

A importância da higienização dos equipamentos e superfícies consiste na limpeza e sanitização. Do ponto de vista bacteriológico, a limpeza do equipamento consiste principalmente na eliminação da maior quantidade possível de resíduos de alimentos disponíveis para o desenvolvimento dos microrganismos e a sua sanitização consiste em destruir a maior parte dos microrganismos das superfícies (HOFFMANN et al., 2002).

BERNARDI et al.(2007) cita que algumas espécies de estafilococos coagulase-negativo produzem um muco ou *slime* (polissacarídeo extracelular) que permite a bactéria aderir às superfícies, sendo importante para a colonização. A produção de *slime* é considerado um fator de virulência, facilitando a aderência e a formação do biofilme. MARQUES (2005) relata que a adesão microbiana ocorre devido à deposição de microrganismos em uma superfície de contato onde se fixam e iniciam o seu desenvolvimento. Essa multiplicação celular dá origem a colônias e, quando a massa celular é suficiente para agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos, estabelece-se o biofilme. Entretanto, as operações de higienização são freqüentemente negligenciadas ou realizadas de forma inadequada. E uma higienização inadequada de superfície na linha de produção em laticínios pode levar ao depósito de microrganismos e à sua aderência, com conseqüente formação de biofilmes (SALUSTIANO, 2007).

Propriedades físico-químicas das superfícies usadas na indústria de alimentos e dos microrganismos influenciam na adesão bacteriana (OLIVEIRA et al., 2003). As propriedades das superfícies mais importantes para o processo de adesão de microrganismos são hidrofobicidade, carga elétrica e rugosidade. O aço inoxidável é o material escolhido para superfícies de trabalho na maioria das indústrias de alimentos, devido a diversas propriedades como força mecânica, resistência a corrosão e durabilidade. O acabamento ou o polimento do aço inoxidável são, ainda, características importantes desse material para seu emprego em equipamentos na área de produção de alimentos (HAYES, 1993).

CABEÇA (2006) cita que as superfícies de aço inoxidável utilizadas em plantas e equipamentos de manipulação, estocagem ou processamento de alimentos, são reconhecidas como as principais fontes de contaminação microbiana. A contaminação dos alimentos ocorre quando o alimento entra em contato com as superfícies contaminadas ou via exposição a aerossóis originados dessas superfícies.

Um procedimento de limpeza eficaz contra células em biofilmes deve ser capaz de interromper ou dissolver a matriz de substâncias poliméricas extracelulares, permitindo que os agentes desinfetantes possam ter acesso a células viáveis (HOOD & ZOTTOLA, 1995). Assim sendo, sem dúvida o mais vantajoso é a prevenção da adesão

bacteriana em superfícies da indústria de laticínios. Pela aplicação e procedimentos de higienização adequados e seu monitoramento, é possível a redução na perda de produtos por deterioração microbiana garantindo as especificações de qualidade destes (WIRTANEN et al., 1996; FORSYTHE, 2002).

Deve ser conferida uma atenção maior às bactérias que se fixam na superfície do equipamento e resistem ao fluxo do alimento, pois são elas que irão apresentar maior resistência à remoção durante a higienização do equipamento (FIGUEIREDO, 2000). Além disso, segundo MAFU et al. (1990), defeitos na superfície do material fornecem proteção contra a remoção das bactérias.

Um procedimento efetivo de higienização, em casos de biofilmes precisa solubilizar ou dissolver a matriz de exopolissacarídeo do biofilme, para que o agente sanitizante possa ter acesso às células viáveis (CHMIELEWSKI & FRANK, 2003).

Em relação ao leite e seus derivados, SILVA (2006^a) enfatiza a dificuldade de remoção dos resíduos destes produtos, pois são resíduos bastante complexos, compostos de substâncias orgânicas (gorduras, proteínas e açúcares) e minerais e que aderem às superfícies dos equipamentos e utensílios de forma bastante resistente. A remoção desses resíduos deve ser realizada imediatamente após o término do uso de equipamentos e realização de operações, para evitar a formação de depósitos persistentes e de difícil remoção. A limpeza e higienização ineficientes das superfícies têm como consequência a precipitação dos resíduos minerais que formam incrustações (formação de pedras do leite). Os resíduos orgânicos resultantes da higienização inadequada, além de fornecerem nutrientes para o crescimento das bactérias, impedem a ação dos sanificantes químicos. Os resíduos também favorecem a formação de biofilme, que diminuem a eficiência dos equipamentos, além de serem uma grande fonte de contaminação microbiológica.

Os biofilmes são constituídos de bactérias, as quais estão aderidas a qualquer superfície, que por sua vez são envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos, ou seja, são depósitos onde os microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza protéica ou polissacarídica, denominados glicocáx (COSTERTON et al., 1999). De acordo com FLACH et al. (2005) biofilmes são

agregados de microrganismos embebidos em uma matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada contendo exopolissacarídeos e pequenos canais, abertos por entre as microcolônias. Este tipo de organização é extremamente vantajoso a todas as espécies de microrganismos, por fornecer proteção contra adversidades como desidratação, colonização por bacteriófagos e favorecer resistência a antimicrobianos (GILBERT et al., 2003).

BOARI (2008) cita que os biofilmes microbianos ocorrem naturalmente nos mais variados tipos de ambientes, sejam eles bióticos como tecidos vegetais e animais, ou abióticos, como rochas, metais e polímeros diversos. A opção por sua constituição está no fato de que estes, por meio da formação de micro-habitats, oferecem proteção aos indivíduos que dele fazem parte contra as intempéries e os estresses do meio ambiente.

Um biofilme pode ser monoespécie quando sua formação diz respeito a apenas um tipo de microrganismo, ou multiespécie, quando é encontrada mais que uma espécie na comunidade. Os biofilmes monoespécies ocorrem mais em tecidos orgânicos, como válvulas cardíacas, como consequência de processos infectivos. Em se tratando de outras superfícies, como aquelas empregadas em organizações do ramo alimentício, destacada atenção deve ser dada a biofilmes multiespécie (citado por BOARI, 2008).

A formação do biofilme é, conforme citação de CABEÇA (2006), uma estratégia de sobrevivência de microrganismos em um ambiente com condições adversas o que provoca uma alteração fenotípica de células planctônicas (vida livre) para a forma sésil (aderidas). Células crescidas em biofilme expressam propriedades distintas das células planctônicas, uma das quais é o aumento na resistência aos biocidas e agentes antimicrobianos (MOSTELLER & BISHOP, 1993; CABEÇA, 2006).

Quando células existem em um biofilme, elas podem vir a ser 10 - 1.000 vezes mais resistentes aos efeitos de agentes antimicrobianos químicos, como os desinfetantes utilizados por indústrias processadoras de alimentos (BERESFORD et al., 2001; MAH & O'TOOLE, 2001; CABEÇA, 2006). O aumento da resistência dos biofilmes aos desinfetantes tem dificultado a sua eliminação nos ambientes de

processamento de alimentos. A não eliminação desses biofilmes vem se tornando um fator preponderante em surtos de doenças transmitidas por alimentos causados por microrganismos patogênicos (CHMIELEWSKI & FRANK, 2003).

Várias reações podem acontecer para provocar a redução da sensibilidade de bactérias contidas em biofilme a desinfetantes, tais como: interação química entre o desinfetante e o próprio biofilme, modulação do microambiente, produção de enzimas degradantes e neutralizantes químicos e troca genética entre células em um biofilme (AUGUSTIN et al., 2004).

Existem várias teorias propostas para formação de biofilmes. A primeira teoria foi descrita por MARSHALL, et al. (1971) e ressalta que a adesão é um processo que ocorre em duas fases, na primeira fase, o processo é ainda reversível, em função do processo de adesão do microrganismo na superfície ocorrer por forças de Van der Waals e atração eletrostática. Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de material extracelular de natureza polissacarídica ou proteica, produzida pela bactéria, que é denominada matriz de glicocálix, que suporta a formação de biofilmes (MELO, 2008). O glicocálix é produzido após o processo de adesão superficial, e vai fornecer condições de adesão do peptideoglicano das bactérias Gram positivas e a parte externa da membrana externa das Gram negativas (PARIZZI, 1998).

Outra teoria sugere para a formação de biofilmes, cinco etapas que didaticamente podem ser colocadas na seguinte ordem: I) condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; II) transporte de células e nutrientes para o sítio de aderência; III) inicia-se o processo de adesão bacteriana, ainda reversível, por atração eletrostática; IV) crescimento celular, colonização e adesão irreversível; e, V) o biofilme apresenta alta atividade metabólica com liberação de células localizadas na periferia (DUDDRIDGE & PRITCHARD, 1983; CHARACKLIS & COOKSEY, 1983; CHARACKLIS, 1984 citados por MACEDO, 2001; SALUSTIANO, 2007).

O desprendimento de células bacterianas do biofilme é de fundamental importância. Biofilmes microbianos formados em equipamentos e instalações de indústrias alimentícias podem desprender-se e contaminar o alimento presente na

superfície ou, então, colonizar e iniciar um novo biofilme em uma nova superfície, proporcionando uma nova fonte de contaminação (NORWOOD & GILMOUR, 1999).

A proliferação das células para aderir e formar biofilme é mediada pela produção do polissacarídeo intercelular adesina (PS/A), um antígeno capsular que faz com que a bactéria tenha aderência na superfície. De acordo com ZIEBUHR et al. (1997) e HEILMANN & PETERS (2000), após a aderência inicial a uma superfície, a bactéria prolifera e acumula-se agrupada em multicamadas. A formação de multicamadas de células no biofilme está associada com a produção do outro polissacarídeo intercelular adesina (PIA). Tanto PIA e PS/A são estruturas similares com um carbono comum de β -1-6 poliglicosamina, mas diferem em substituição primária no agrupamento amina (VASUDEVAN et al, 2003). A síntese do polissacarídeo capsular-PS/A é mediada por um operon *ica* que uma vez ativado, um polissacarídeo de adesão intercelular-PIA é sintetizado (ARCIOLA et al., 2001; BERNARDI, 2005; GERKE et al., 1998; Mc KENNEY et al., 1998).

O *ica* locus consiste nos genes *icaADB* e *C* que codificam proteínas mediante a síntese de PIA e PS/A em espécies de estafilococos. (Mc KENNEY et al., 1998; CRAMTON et al., 1999). Por meio dos genes *icaA* e *icaD* tem sido relatado um significativo papel na formação de biofilmes em *S. aureus* e *S. epidermitis* (ARCIOLA et al., 2001). O gene *icaD* tem sido apontado como fundamental na máxima expressão do N-acetilglicosamina transferase, conduzindo a expressão fenotípica do polissacarídeo capsular (GERKE et al., 1998).

ARCIOLA et al. (2002) mostraram que técnicas moleculares para identificação dos genes *ica*, que codificam a síntese do *slime*, representa uma ferramenta muito importante para uma identificação acurada de estirpes virulentas formadoras de *slime*.

Nos últimos anos verificou-se um aumento significativo no desenvolvimento de métodos genéticos para detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Dentre esses, destaca-se a amplificação de seqüências do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) (BOER & BEUMER, 1999; MALORNY et al., 2002). A reação em cadeia da polimerase é uma técnica altamente sensível, por meio da qual, pequenas quantidades de seqüências de

DNA ou RNA específicas, podem ser enzimaticamente amplificadas a uma extensão tal, que uma quantidade suficiente de material fica disponível para alcançar o limiar do "sinal" para detecção (KONEMAM et al., 2001). Ela é utilizada para amplificar DNA para clonagem, detectar a presença de poucas quantidades de DNAs, e distinguir diferentes amostras de DNA (KREUZER & MASSEY, 2002).

A microscopia eletrônica é indicada para a avaliação da interação microbiana do biofilme. Este método preserva muito das estruturas associadas que se mantêm em um estado hidratado e viável. A fixação das amostras é mais indicada para a avaliação da interação microbiana na matriz do biofilme (MARQUES, 2005). ZOLTAI et al. (1981), em uma das primeiras pesquisas de aderência bacteriana a superfícies que entram em contato com alimentos, usaram um microscópio eletrônico de varredura para mostrar a aderência de *Pseudomonas fragi* e *Staphylococcus aureus* a superfícies de aço inoxidável e vidro. Segundo PIZZOLITTO (1997) o microscópio eletrônico de varredura mostra uma imagem tri-dimensional, e a superfície topográfica da amostra é revelada com nitidez.

Os biofilmes têm importância em várias atividades, como o uso em estações de tratamento de águas ou de efluentes, removendo organismos patogênicos e reduzindo a quantidade de matéria orgânica; na produção de vinagre e de ácido cítrico; em aplicações farmacêuticas pela produção de metabólitos secundários e em processos biológicos, para a extração de metais a partir de minério. Em contrapartida, o crescimento indesejável de biofilmes tem impacto negativo em várias atividades, como, por exemplo: estragos em equipamentos devido a biocorrosão, contaminação de produtos alimentícios, perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, diminuição da transferência de calor, perdas de pressão em tubulações e, ou, em equipamentos e perdas significativas para a indústria, em âmbito geral (PIZZOLITTO et al., 2001, citado por CAIXETA, 2008).

A adesão e formação de biofilmes microbianos são indesejáveis sob diversos aspectos na indústria de alimentos. Os biofilmes podem diminuir a transferência de calor em trocadores de calor, diminuir o fluxo em tubulações, desencadear processos corrosivos e principalmente tornarem-se fontes de contaminação microbiana

(GERMANO & GERMANO, 2001), podendo trazer malefícios à saúde do consumidor (bactérias patogênicas) ou reduzindo o tempo de prateleira dos produtos (microrganismos deteriorantes) (FIGUEIREDO, 1999). No que se refere aos aspectos microbiológicos, a adesão pode constituir-se de microrganismos alteradores e/ou patogênicos, que resultam em sérios problemas de higiene, de saúde pública ou de ordem econômica.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral:

Investigar a presença e formação de biofilme por bactérias do gênero *Staphylococcus*, antes e após o processo de higienização, em superfícies de tanques e de tubulações, bem como em amostras de leite cru e pasteurizado em micro-usina de beneficiamento do leite.

3.2. Específicos:

- 3.2.1. Verificar a presença e o número de *Staphylococcus* spp em tanque de recepção, tanque de estocagem de leite cru, tanque de estocagem de leite pasteurizado, tubulações e em amostras de leite cru e pasteurizado.
- 3.2.2. Identificar as ocorrências dos genes *icaA* e *icaD*, responsáveis por sintetizar os polissacarídeos na formação de biofilmes, nas estirpes de *Staphylococcus* spp por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
- 3.2.3. Verificar a ocorrência de adesão de *Staphylococcus* spp em superfície de aço inoxidável por meio de microscopia eletrônica de varredura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização da micro-usina de beneficiamento de leite

A micro-usina de beneficiamento de leite em estudo, estabelecida há 17 anos no Estado de São Paulo, beneficiava o volume diário de 4.700 litros de leite, oriundo de 21 produtores fornecedores de matéria-prima.

Além do beneficiamento do leite, outros derivados lácteos eram produzidos: 500 litros por dia de bebida láctea, 200 litros por semana de iogurte, 70 Kg por semana de queijo minas frescal e 16 Kg por semana de ricota. A velocidade do pasteurizador era de 1.200 litros por hora, sendo, portanto, comum a matéria prima ficar estocada no tanque de estocagem de leite cru até completar o volume para o início da pasteurização.

A micro-usina era subordinada a fiscalização do SISP e recebia a assistência de um Médico Veterinário como Responsável Técnico.

A minoria dos 21 fornecedores de matéria-prima realizava algum tipo de controle de saúde do rebanho, enquanto que na micro-usina eram feitas diariamente no leite análise de redutase, crioscopia, alizarol e teor de cloretos no leite cru. Também eram realizados, uma vez ao mês, contagem bacteriana total, Contagem de Células Somáticas (CCS) e pesquisa de resíduos de antibióticos na Clínica do Leite - Piracicaba – SP.

A fonte de água utilizada para a limpeza e elaboração dos produtos era um poço semi-artesiano com 85 metros de profundidade e com 10 anos de existência. Com o objetivo de melhorar a qualidade da água utilizava-se diariamente um dosador de cloro líquido na caixa d'água com a dosagem fixada em 3 ppm, além de avaliação do pH.

Na própria usina o leite passava diariamente por análise da fosfatase alcalina e análise com Petrifilm® para presença de coliformes, e uma vez ao mês o proprietário da micro-usina enviava amostras ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UNESP de Jaboticabal, aonde se procedia a

realização das análises de coliformes totais e fecais, contagem de mesófilos, crioscopia, gordura e sólidos totais (testes microbiológicos e físico-químicos).

O protocolo de limpeza usado na micro-usina seguia as orientações do fabricante dos produtos de higienização, com algumas adaptações por parte do proprietário:

- 1º. A higienização dos tanques de recepção e de estocagem de leite cru era feita imediatamente após o processo de beneficiamento, sendo utilizado para tanto, água quente e detergente neutro de cozinha.
- 2º. Nos equipamentos de beneficiamento do leite primeiramente fazia-se um enxágüe com água fria para a retirada do resíduo de leite, em seguida aplicava-se o detergente (Hidróxido de Sódio mais aditivos), cuja indicação de diluição do fabricante era 100 a 200 mL para 10 litros de água, durante 20 minutos a 75°C a 80 °C, no entanto era utilizado na diluição de 500 mL em 50 litros de água na temperatura de 80°C por uma hora. Fazia-se então o enxágüe para a retirada do resíduo do produto com água fria.
- 3º. Logo em seguida aplicava-se desincrustante (Ácido Nítrico mais aditivos e veículo), cuja indicação do fabricante era a diluição de 2 litros do produto em 100 litros de água, com contato mínimo de 20 minutos. O proprietário utilizava a diluição de meio litro em 50 litros de água na temperatura de 65°C por um período de 40 minutos a uma hora, após o qual procedia-se o enxágüe para a retirada do resíduo do produto e limpeza manual dos tanques.
- 4º. A próxima etapa compreendia a aplicação de sanificante (Oxigênio Ativo mais Ácido acético mais coadjuvantes = Peróxido de Hidrogênio 200 volumes). A indicação do fabricante era a diluição de 15 a 20 mL do produto em 10 litros de água com contato de 10 a 15 minutos, e o proprietário utilizava a diluição de 500 mL em 50 litros de água, deixando até o dia seguinte nas tubulações, pasteurizador e embaladora, sendo que o enxágüe para a retirada do resíduo do produto era feito somente no

dia seguinte, depois fazia circular pelo circuito água quente e dava-se reinício a produção.

4.2. Obtenção das amostras.

Entre os meses de junho e outubro de 2008 foram colhidas amostras na micro-usina citada anteriormente. As colheitas foram realizadas após o término do processo de beneficiamento do leite e imediatamente após o término do processo de higienização. Assim, foram colhidas amostras por meio de suabes das superfícies do tanque de recepção, tanque de estocagem de leite cru e do tanque de estocagem de leite pasteurizado. Foram colhidas, também, amostras das paredes das tubulações de saída do pasteurizador e da máquina de envase.

Amostras de leite no tanque de recepção, no tanque de estocagem de leite cru, na tubulação de saída do pasteurizador e leite envasado, assim como amostras das embalagens plásticas vedadas e vazias utilizadas para o envase do leite pasteurizado, também foram colhidas. Ao final das colheitas obtiveram-se quatro amostras de cada ponto de colheita anteriormente citados, perfazendo o total de 60 amostras.

Para cada ponto de superfície foi usado um molde de plástico delimitando uma área de 100 cm² enquanto que para colheita das amostras das tubulações o suabe foi introduzido até a profundidade de 10 cm. Os suabes embebidos em água peptonada foram acondicionados em tubos de ensaio previamente esterilizados contendo 10 ml de água peptonada a 0,1% (SILVA et al. 1997), sendo mantidos em caixas de material isotérmico e com gelo, bem como as amostras de leite, e encaminhadas ao Laboratório de Análises de Produtos de Origem Animal e Água, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal/UNESP.

4.3. Preparo das diluições das amostras e padrões estabelecidos

No referido laboratório, a partir da solução de transporte dos suabes (10^0) e das amostras de leite, adicionava-se 1 mL em 9mL de água peptonada a 0,1%, obtendo-se assim uma diluição inicial de 10^{-1} . A partir desta diluição foi preparada uma diluição

decimal de 10^{-2} , empregando-se o mesmo diluente até a diluição de 10^{-3} para amostras de leite cru (SILVA et al, 1997).

No presente estudo estabeleceu-se como padrão desejável para tubulações e superfícies a ausência total de bactérias. Por outro lado, para amostras de leite seguiu-se o padrão estabelecido pela Instrução Normativa Nº 51 do Ministério da Agricultura e Pecuária (BRASIL, 2002) e Resolução RDC12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001), os quais também preconizam ausência de *Staphylococcus* spp em amostras de leite pasteurizado.

Para o cálculo dos valores encontrados nas superfícies dos tanques utilizou-se como base um molde de plástico com área interna de $10\text{ cm} \times 10\text{ cm} = 100\text{ cm}^2$ obtendo a proporção de 0,1 mL da amostra na diluição em água peptonada para cada 1 cm^2 .

Para as tubulações com 1,25 cm de raio e colhido com suabe até a profundidade de 10 cm, usou-se a fórmula matemática para o cálculo da área lateral do cilindro $= 2 \pi r h$ (DOLCE & POMPEO, 1996), obtendo-se o resultado de: área lateral $= 2 \times 3,14 \times 1,25 \times 10 = 78,5\text{ cm}^2$ sendo que em 1 mL a área seria $7,85\text{ cm}^2$, portanto a proporção de 0,127 mL da amostra na diluição em água peptonada para a área de 1 cm^2 .

Para a área da embalagem plástica de leite, a mesma após corte e a abertura, obtinha-se uma área de 672 cm^2 , portanto $67,2\text{ cm}^2$ para 1 mL e a proporção de 0,014 mL da amostra na diluição em água peptonada para cada 1 cm^2 .

4.4. Isolamento, contagem e identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp.

Das amostras previamente diluídas foram semeados 0,1mL sobre a superfície de placas de Petri com Agar de Baird-Parker (BP), em seguida, o inóculo era espalhado por toda a superfície do meio, com o auxílio de alça de Drigalski e posteriormente incubadas à temperatura de 35°C por 24 e 48 horas.

Os números de colônias contados foram multiplicados pelo fator 10 e, em seguida, pela recíproca da diluição correspondente a placa de contagem, obtendo-se assim o valor da contagem presuntiva de *Staphylococcus* spp.

As colônias características com cor negra brilhante foram submetidas à coloração de Gram, os cocos gram-positivos visualizados em forma de cachos com posterior realização das provas de catalase e coagulase lenta com plasma de coelho (APHA, 2001).

4.4.1. Teste da Catalase

Com uma alça de sementeira flambada retirou-se uma colônia pura de cultivo de *Staphylococcus* spp (24h cultivo). Logo após, foi feito um esfregaço em uma lâmina de vidro limpa. Adicionou-se uma gota de água oxigenada (H₂O₂) a 3% sobre o esfregaço na lâmina. As estirpes que apresentaram imediato borbulhamento (liberação de gás) foram consideradas positivas (MAC FADDIN, 1976).

4.4.2. Teste da Coagulase livre em Tubo

Em tubos de vidro estéreis (13x100mm), foram depositados 0,5 mL de plasma de coelho, diluídos 1:5. Adicionou-se também 0,3 mL de cultura pura de estirpe de *Staphylococcus* spp após 24 horas de cultivo em caldo BHI (Brain Heart Infusion) . Os tubos foram incubados, sem agitar, a 37°C em banho-maria, sendo analisados quanto à formação do coágulo após 1, 2, 3, 4 e 24 horas. Foram consideradas estirpes positivas aquelas que coagularam o plasma, formando um coágulo visível (MAC FADDIN, 1976).

4.5. Extração do DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada no Laboratório de Epidemiologia Molecular no departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (UNESP) utilizando o Kit GFX *illustra bacteria genomicPrep Mini Spin* (Amersham Biosciences) que contém uma solução de lise, solução de extração, solução de lavagem e colunas de GFX de purificação, além de ter sido feito um pré-tratamento com lisozima. Colônias de *Staphylococcus* spp foram retiradas com uma alça de sementeira de tubos de TSA (Trypticasein Soy Agar) e inoculadas à 37° C por 24 horas, em 1,5 mL caldo cérebro coração (BHI) em microtubos com volume de 2,0mL. Os microtubos contendo as colônias inoculadas no BHI foram centrifugados por 30 segundos a 14.000

rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se 40µL de tampão lisoizima (agitou-se em vortex até o total desprendimento do pellet). Foi adicionado 10µL de lisoizima e agitado em vortex. Os tubos permaneceram 15 minutos em temperatura ambiente, após os quais foram adicionados 10µL de Proteinase K e agitado em vortex. Os tubos foram incubados a 55° C por 15 minutos. Então foram adicionados 5µL de RNase e agitados, permaneceram 15 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 500µL da solução de extração, agitados e permaneceram 10 minutos em temperatura ambiente sendo agitados ocasionalmente. Toda mistura foi transferida para coluna GFX encaixada em um microtubo. Foram então centrifugadas a 8000rpm por 1 minuto. O líquido do tubo foi descartado e colocou-se novamente 500µL da solução de extração na coluna (Centrifugou-se a 8000 rpm por 1 minuto). O líquido foi descartado e depositado no tubo. Após o procedimento citado acima foram então adicionados 500µL da solução de lavagem na coluna GFX. Centrifugou-se à velocidade máxima de 12 a 16000rpm por 3 minutos. O líquido foi descartado dos tubos e transferidas as colunas para novos tubos de 1,5mL. Adicionou-se 200µL de tampão TE pré-aquecido a 70° C nas colunas encaixadas nos novos tubos e deixou-se por 1 minuto em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 8000 rpm por 1 minuto. Os microtubos coletores foram mantidos a -20° C até o momento do uso (MELO, 2008).

4.6. Amplificação de DNA cromossomal pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos genes *icaA* e *icaD*.

Os oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do *icaA* e *icaD* genes foram descritos do Gen Bank sequência do *ica* locus (CRAMTON et al, 1999). O volume de 20µL de reação final consistiu em 2.5mM MgCl₂, 200µM de cada nucleotídeo, 1µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1.25U de Taq polimerase e 100ng de DNA molde. Trinta ciclos de amplificação que consistiram na desnaturação a 92°C por 45 segundos, anelamento a 58°C por 45 segundos, alongamento a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final de 72°C por 7 minutos em um termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf). A presença e tamanho da amplificação dos produtos foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Foi utilizado um

marcador molecular de tamanho 100pb (Invitrogen, Brasil). A estirpe controle utilizada foi *S. aureus* ATCC 12600.

Seqüência do fragmento de oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen, Brasil):

icaA: Forward: 5' – ACACTTGCTGGCGCAGTCAA - 3'

Reverse: 5' - TGTTGGATGTTGGTTCCAGA - 3'

Tamanho do produto: 88pb

icaD: Forward: 5' – ATGGTCAAGCCCAGACAGAG – 3'

Reverse: 5' –TTGCTTTAAACATTGAAAATACT– 3'

Tamanho do produto: 98pb

4.7. Visualização de biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura.

4.7.1. Suporte para adesão bacteriana

Os suportes utilizados para a adesão das células bacterianas foram cupons de aço inoxidável AISI 304 com 10 x 20 mm, adquiridos comercialmente - ICAM (Indústria e Comércio Ltda - São Carlos/SP), os quais foram higienizados com acetona 100%, lavados por imersão em detergente neutro durante uma hora, enxaguados com água destilada estéril, secos e limpos com álcool 70% (v/v). Após a higienização, os cupons foram novamente lavados com água destilada estéril, secos por duas horas a 60° e autoclavados a 121°C/15 minutos (MARQUES, 2005).

4.7.2. Obtenção do inóculo

A partir das estirpes confirmadas positivas para o gene *icaA* e *icaD*, amostras de *Staphylococcus* spp positivas e negativas à prova da coagulase lenta, isoladas em TSA, foram transferidas para tubos contendo caldo BHI e incubadas por 24 horas a 37°C e após isso transferiu-se 200µL para tubos com BHI que possuíam em seu interior um cupom de aço inoxidável esterilizados AISI 304 com 10 x 20 mm. Esses tubos foram incubados em agitação constante a 100 rpm/37°C por 72 horas (PIZZOLITTO 1997; BERNARDI, et al., 2007 com adaptações).

Após esse período os cupons de aço inox foram retirados do BHI, lavados com água destilada estéril e levados para a visualização por meio da microscopia eletrônica de varredura.

4.7.3. Análise de imagem por microscopia eletrônica de varredura

No Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal - SP. Conforme o protocolo de rotina de trabalho do referido laboratório (SANTOS & MAIA, 1997) as amostras em cupons de aço inoxidável foram fixadas em glutaraldeído 3% e lavadas em tampão fosfato (pH 7,4 ; 0,1M) por 48 horas. Depois foram lavadas em tampão por 3 a 4 vezes para retirar o excesso de fixador. Após este procedimento, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% *over-night* sob temperatura ambiente, em uma capela. Lavou-se em tampão por 3 a 4 vezes para retirar o excesso de tetróxido de ósmio, fez-se a desidratação em gradiente crescente de acetona: 30%, 50%, 70%, 80%, 90% com intervalos de 20 minutos e 100% por 3 vezes, também com intervalos de 20 minutos. Em seguida as amostras foram para o secador de ponto crítico para completar a secagem, montadas em *stubs* e cobertas com ouro. Ao final deste procedimento, os cupons foram examinados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5410), com o objetivo de visualizar a interação entre bactéria e superfície.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Presença de *Staphylococcus* spp nas superfícies, tubulações e leite da micro-usina estudada

A Tabela 1 mostra a distribuição das estirpes de estafilococos coagulase-positivos e coagulase-negativos isoladas de acordo com os pontos de colheita das amostras.

Tabela 1. Distribuição das 41 estirpes de estafilococos coagulase-positivos e negativos, de acordo com o ponto de colheita, em Micro-usina de Beneficiamento de leite do Estado de São Paulo, 2008.

Pontos de colheita	<i>Staphylococcus</i> spp			
	Coagulase-Positivo		Coagulase-Negativo	
	n	%	n	%
Tanque de recepção antes da higienização	02	4,9	04	9,7
Tanque de recepção após higienização	-	-	01	2,4
Leite do tanque de recepção	04	9,7	06	14,7
Tanque de estocagem de leite cru antes da higienização	02	4,9	05	12,3
Leite do tanque de estocagem de leite cru	04	9,7	06	14,7
Tubulação de saída do pasteurizador após a higienização	-	-	01	2,4
Tanque de estocagem de leite pasteurizado antes da higienização	02	4,9	-	-
Tubulação de saída da máquina de envase antes da higienização	-	-	01	2,4
Tubulação de saída da máquina de envase após a higienização	02	4,9	-	-
Leite envasado	-	-	01	2,4
Total	16	39,0	25	61,0

De acordo com a Tabela 1 o isolamento de estirpes no tanque de recepção após higienização, no tanque de recepção antes da higienização, do leite do tanque de recepção, no tanque de estocagem de leite cru antes da higienização, do leite do tanque de estocagem de leite cru foram pontos críticos de contaminação. Estes resultados foram encontrados possivelmente devido a qualidade da matéria prima, possível variação das temperaturas dos tanques que armazenam leite cru ou também por deficiências no processo de higienização que favoreceram a formação de biofilme.

Em relação à tubulação de saída do pasteurizador após a higienização, o isolamento de estirpe apresentado na Tabela 1, pode ser atribuído à formação de biofilme com liberação de fragmentos, mesmo após o processo de pasteurização, com a possibilidade de formação de biofilme também no pasteurizador devido ao isolamento dos microrganismos no tanque de estocagem de leite pasteurizado antes da higienização. Há que se levar em consideração o fato de que os biofilmes podem ser compostos por diferentes tipos de microrganismos, o que explica ter-se isolado estirpe coagulase-positiva no tanque de estocagem de leite pasteurizado e coagulase-negativa na tubulação de saída do pasteurizador.

Quanto à tubulação de saída da máquina de envase após a higienização e a tubulação de saída da máquina de envase antes da higienização e leite envasado a Tabela 3 mostra a presença de estirpes que pode ser atribuída à contaminação cruzada e também à formação de biofilme com liberação de fragmentos no produto já beneficiado.

Dentre o total de 60 amostras analisadas, foram isoladas 41 estirpes de *Staphylococcus* spp, 16 (39,0%) das quais coagulase-positivas e 25 (61,0%) coagulase-negativas.

A Tabela 2 mostra valores das médias geométricas das contagens de estafilococos coagulase-positivos e estafilococos coagulase-negativos isoladas das amostras das superfícies de tanques e tubulações.

Tabela 2. Médias geométricas das contagens de estafilococos coagulase-positivos e negativos isolados em superfícies de equipamentos de micro-usina de beneficiamento de leite do Estado de São Paulo, antes e após o processo de higienização, 2008.

Locais de colheita de amostras	Médias Geométricas das contagens de estafilococos coagulase-positivos (UFC/cm ²)		Médias Geométricas das contagens de estafilococos coagulase-negativos (UFC/cm ²)	
	Antes da Higienização	Após a Higienização	Antes da Higienização	Após a Higienização
Superfície do tanque de recepção	1×10^0	-	$1,95 \times 10$	$2,4 \times 10^3$
Superfície do tanque estocagem de leite cru	$4,47 \times 10^0$	-	$2,22 \times 10$	-
Tubulação de saída do pasteurizador	-	-	-	$1,27 \times 10$
Superfície do tanque de estocagem de leite pasteurizado	$3,2 \times 10$	-	-	-
Tubulação de saída da máquina de envase	-	$3,57 \times 10$	$3,81 \times 10$	-

No tanque de recepção, nas amostras colhidas antes da higienização obteve-se médias (1×10^0 UFC/cm²), já nas amostras colhidas após a higienização não houve isolamento. Nas amostras colhidas nas superfícies do tanque de estocagem de leite cru antes da higienização houve isolamento ($4,47 \times 10^0$ UFC/cm²), já nas amostras colhidas após a higienização não houve isolamento.

Ainda na Tabela 2 observa-se que não houve isolamentos de estafilococos coagulase-positivos na tubulação de saída do pasteurizador antes e após a higienização. Por outro lado, a média geométrica de estafilococos coagulase-positivos isolados das superfícies do tanque de estocagem de leite pasteurizado, antes da higienização foi de $3,2 \times 10$ UFC/cm², não sendo verificados isolamentos nas amostras colhidas após a higienização.

Em relação à tubulação de saída da máquina de envase não houve isolamento de estafilococos coagulase-positivo nas amostras colhidas antes da higienização, no entanto após a higienização a média geométrica das contagens destes microrganismos foi de $3,57 \times 10 \text{ UFC/cm}^2$.

A Tabela 2 mostra também os valores das médias geométricas das contagens de estafilococos coagulase-negativos isolados das amostras das superfícies de tanques e tubulações. Entre as amostras das superfícies do tanque de recepção, colhidas antes da higienização, verificou-se que o valor foi de $1,95 \times 10 \text{ UFC/cm}^2$, inferior aos encontrados nas amostras colhidas após a higienização, qual seja, $2,4 \times 10^3 \text{ UFC/cm}^2$. Nas amostras colhidas nas superfícies do tanque de estocagem de leite cru antes da higienização, observou-se que a média geométrica foi de $2,22 \times 10 \text{ UFC/cm}^2$, enquanto que nas amostras colhidas após a higienização não houve isolamento dos referidos microrganismos.

Ainda na Tabela 2 vê-se que não houve isolamento de estafilococos coagulase-negativos na tubulação de saída do pasteurizador antes da higienização, porém houve nas amostras colhidas após a higienização ($1,27 \times 10 \text{ UFC/cm}^2$). Verificou-se, ainda, que não houve isolamento de estafilococos coagulase-negativos nas amostras das superfícies do tanque de estocagem de leite pasteurizado, antes da higienização e após a higienização.

Em relação à tubulação de saída da máquina de envase houve isolamento de estafilococos coagulase-negativos nas amostras antes da higienização ($3,81 \times 10 \text{ UFC/cm}^2$), no entanto após a higienização não ocorreu isolamento.

Não há estudos que indiquem a quantidade máxima de microrganismos que podem estar presentes em uma superfície que entra em contato com o alimento, porém, para superfícies que passaram pelo processo de higienização, a “American Public Health Association” (APHA) sugere um máximo de mesófilos aeróbios de $2,0 \times 10^0 \text{ UFC/cm}^2$, já a Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere 30 UFC/cm^2 (MARQUES, 2005). Em relação ao presente estudo pode-se verificar pela Tabela 2 que os resultados obtidos após a higienização das superfícies ficaram acima dos valores preconizados pela APHA e pela OMS.

A legislação brasileira não traz subsídios suficientes para se fazer interpretações quanto a superfícies e tubulações que entram em contato com o leite cru e pasteurizado, mas partindo-se do princípio de que após um processo de higienização é desejável ausência total de microrganismos, os resultados obtido demonstram falhas em tal processo, pois, pelos dados da Tabela 1, percebe-se que, excetuando a superfície dos tanques de estocagem de leite cru e de estocagem de leite pasteurizado, em todos os demais pontos de superfícies e tubulações o processo de higienização (limpeza e sanitização) mostrou-se deficiente, ou há contaminação por fragmentos de biofilme que se desprendem, ou ainda contaminação por parte de funcionários.

Diante de tais resultados, a higienização na indústria de laticínios merece maior atenção, pois se os microrganismos não forem inativados ainda na forma planctônica (vida livre) eles podem se redepositar em outros pontos e formar novos biofilmes. Portanto, a chave para o controle microbiano e uma higienização eficaz está no entendimento e observação dos microrganismos mais importantes a serem removidos e na compreensão do tipo e da natureza do substrato que entra em contato com as superfícies de processamento. Além disto, o sucesso no programa de higienização das indústrias de alimentos depende da escolha correta dos agentes de limpeza e sanificação, baseada no tipo e grau dos resíduos aderidos às superfícies, na qualidade da água empregada, na natureza a ser higienizada, nos tipos e níveis de contaminação microbiológica e nos métodos de higienização aplicados (ANDRADE & MACÊDO, 1996).

Os padrões usados para a interpretação dos resultados obtidos nas análises de leite foram os estabelecidos pelo Ministério da agricultura e Pecuária - DIPOA (Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Na Tabela 3 têm-se os valores médios de estafilococos coagulase-positivos e negativos encontrados em leite cru na micro-usina de beneficiamento em estudo.

Tabela 3. Médias geométricas de estafilococos coagulase-positivos e negativos isolados a partir do leite cru contido em instalações de uma micro-usina de beneficiamento de leite do Estado de São Paulo, 2008.

PONTO DE COLHEITA	Valores médios das contagens de estafilococos coagulase-positivo (UFC/mL)	Valores médios das contagens de estafilococos coagulase-negativo (UFC/mL)
Leite do tanque de recepção (cru)	1×10^5	$8,07 \times 10^4$
Leite do tanque de estocagem de leite cru	$3,4 \times 10^4$	$5,14 \times 10^4$
Leite da tubulação de saída do pasteurizador	-	-
Leite envasado (pasteurizado)	-	1×10^2

Os dados da Tabela 3 mostram os valores médios das contagens de estafilococos coagulase-positivo em leite cru de amostras do tanque de recepção (1×10^5 UFC/mL) e do tanque de estocagem de leite cru ($3,4 \times 10^4$ UFC/mL). Entre as amostras de leite pasteurizado colhidas da tubulação de saída do pasteurizador e no leite embalado não houve isolamento dos referidos microrganismos.

Para as contagens de estafilococos coagulase-negativo, a Tabela 3 mostra que no leite cru colhido no tanque de recepção a média foi de $8,07 \times 10^4$ UFC/mL e para as amostras colhidas no tanque de estocagem de leite cru foi de $5,14 \times 10^4$ UFC/mL. Muito embora tenha sido verificada ausência destes microrganismos nas amostras de leite pasteurizado colhidas da tubulação de saída do pasteurizador, observou-se que entre as amostras de leite embalado a média das contagens foi de 1×10^2 UFC/mL.

Das 08 amostras de leite cru, quatro provenientes do tanque de recepção e quatro provenientes do tanque de estocagem de leite cru, colhidas neste estudo as contagens de estafilococos coagulase-positivo obtiveram valores médios variando entre $3,4 \times 10^4$ UFC/mL e 1×10^5 UFC/mL em 06 (75%) das amostras

VIEIRA (2007) observou, em leite cru, *S. aureus* em 38 (70,4%) de 54 amostras, em valores de até $8,9 \times 10^5$ UFC/ml. ATAIDE (2006) obteve contagem de estafilococos coagulase-positiva no leite cru variando de <100 a $3,2 \times 10^5$ UFC/mL, sendo a média $3,9 \times 10^4$.

PARO et al. (2003) isolaram 40% de estirpes de estafilococos coagulase-positiva em amostras de leite "in natura", obtendo contagem de estirpes na média de $8,3 \times 10^2$ UFC/mL. PARO cita que SANTOS et al. (1978) e ARAUJO (1984) encontraram, respectivamente, 46,9% em Juiz de Fora-MG com contagem de $4,89 \times 10^4$ UFC/mL e 50% em Pirassununga-SP com valores de $1,48 \times 10^4$ UFC/mL. NADER FILHO et al. (1989) encontraram 100% em Ribeirão Preto-SP com $1,19 \times 10^3$ UFC/mL.

Considerando que o processo de pasteurização não elimina a totalidade de mesófilos (NADER FILHO et al., 1989), é de se supor que as amostras que apresentaram índices deste grupo de microrganismos acima do padrão da legislação, sejam provenientes de uma matéria prima altamente contaminada, uma vez que a carga microbiana final depende da carga microbiana inicial. Levando isso em consideração, os resultados obtidos nas amostras de leite deste estudo podem ser em consequência de leite oriundo de vacas com mastite, ou deficiências na higienização no processo de ordenha, ou ainda consequência da formação de biofilme nas superfícies e tubulações, sendo que o biofilme pode ocorrer no pasteurizador impedindo-o de atingir a temperatura de pasteurização, pela redução da capacidade da troca de calor entre superfícies citada por BOARI (2008) e, conseqüentemente, não eliminando todos os microrganismos.

Entre as 08 amostras de leite cru colhidas neste estudo as contagens de estafilococos coagulase-negativo tiveram valores médios entre $5,14 \times 10^4$ UFC/mL e $8,07 \times 10^4$ UFC/mL presentes em todas (100%) as amostras.

CARMO et al. (2002) relataram um surto envolvendo estafilococos coagulase-negativa em leite cru, cujas contagens excediam a 2×10^8 UFC/g. ATAIDE (2006) encontrou contagem de estafilococos coagulase-negativa variando entre <100 e $4,2 \times 10^4$ UFC/mL, sendo a média $2,7 \times 10^4$.

A ocorrência de microrganismos no leite cru pode ser atribuída ao fato de que geralmente o tanque de recepção e o tanque de estocagem de leite cru são usados para manter o leite por um dia ou dois sob refrigeração, antes do processamento. Neste intervalo de tempo podem ocorrer variações bruscas ou problemas no sistema de refrigeração de modo a acarretar dificuldades no controle da temperatura. Em

decorrência deste fato poderá ocorrer maior crescimento de microrganismos e, consequentemente, maior adesão de bactérias às paredes dos tanques de modo a dificultar a sua higienização, problema este que pode ser agravado nos casos em que a matéria prima estiver altamente contaminada.

NADER FILHO (1996) ao avaliar as características microbiológicas das amostras de leite pasteurizado tipo B, colhidas logo após o envase, em algumas usinas de beneficiamento do Estado de São Paulo, subordinadas ao Serviço de Inspeção federal (SIF), observaram que 65% das amostras analisadas apresentavam-se fora dos padrões legais.

Das 08 amostras de leite pasteurizado (quatro oriundas do tanque de estocagem de leite pasteurizado e quatro oriundas de embalagens envasadas) analisadas neste estudo somente uma de leite envasado, apresentou estafilococos coagulase-negativa sendo o valor de 1×10^2 UFC/mL, portanto, fora dos padrões da legislação, de modo a representar riscos à saúde do consumidor.

PEREIRA et al. (2006) detectaram a presença de *Staphylococcus* spp em 21,7% das 60 amostras de leite pasteurizado por eles analisadas e ausência de *S. aureus* (coagulase-positiva). ATAIDE (2006) encontrou em amostras de leite pasteurizado, contagens de estafilococos coagulase-negativa entre $7,0 \times 10^2$ UFC/mL e $1,1 \times 10^4$ UFC/mL. O referido autor atribuiu este achado ao fato de provável introdução destes microrganismos após o processo de pasteurização, uma vez que os *Staphylococcus* spp são sensíveis à temperatura de pasteurização. No entanto, acredita-se que pode se tratar de biofilme em algum ponto do circuito de beneficiamento do leite naquela usina.

Quanto a *S. aureus* em leite pasteurizado (VIEIRA, 2007) observou-se em oito (14,7%) das 54 amostras pesquisadas, contagem média de $8,7 \times 10^3$ UFC/mL. PARO et al. (2003), verificaram que 100% das 40 amostras de leite tipo B mostraram-se negativas ante a pesquisa de estafilococos coagulase-positiva, evidenciando, portanto, a eficiência no processo de pasteurização e a provável adoção de medidas higiênicas corretas ao longo do fluxograma de beneficiamento.

Segundo a Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, “o leite não deve apresentar microrganismos patogênicos e causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas do produto, em condições normais de armazenamento.”(ANVISA, 2001)

No presente estudo pode-se verificar a presença de estirpes de *Staphylococcus* spp tanto em superfícies, como em tubulações antes e após a higienização e em leite cru e pasteurizado. Tais achados sugerem a provável contaminação do leite por fragmentos de biofilme liberados no produto durante a sua circulação ao longo do fluxograma de beneficiamento do leite. Acredita-se também na possibilidade de que já haja adesão bacteriana com formação de biofilme também no pasteurizador, comprometendo assim a troca de calor e, conseqüentemente, a eficiência da pasteurização, de modo a favorecer a passagem de microrganismos e, conseqüentemente, contaminação do leite pasteurizado.

Há ainda que se levar em consideração a possível presença de enterotoxinas tanto no leite cru como no leite pasteurizado. A presença de enterotoxinas oriundas de contagens de *Staphylococcus* spp da ordem de 10^5 - 10^6 UFC/mL pode ter importante significado epidemiológico na ocorrência de intoxicação alimentar (CARMO et al., 2002) e os achados deste trabalho sugerem esta possibilidade.

As embalagens de leite vazias não evidenciaram a presença de estirpes de estafilococos coagulase-positivo e de estafilococos coagulase-negativo.

5.2 Ocorrência dos genes *icaA* e *icaD*, potencialmente formadores de biofilme, nas estirpes isoladas na micro-usina estudada

As Figuras 5 e 6 evidenciam a formação de bandas em gel de eletroforese das estirpes de *Staphylococcus* spp isoladas portadoras dos genes *icaA* e/ou *icaD*. Verificou-se que 15 (36,6%) das 41 estirpes isoladas mostraram-se portadoras do gene *icaA* e 100% do gene *icaD*.

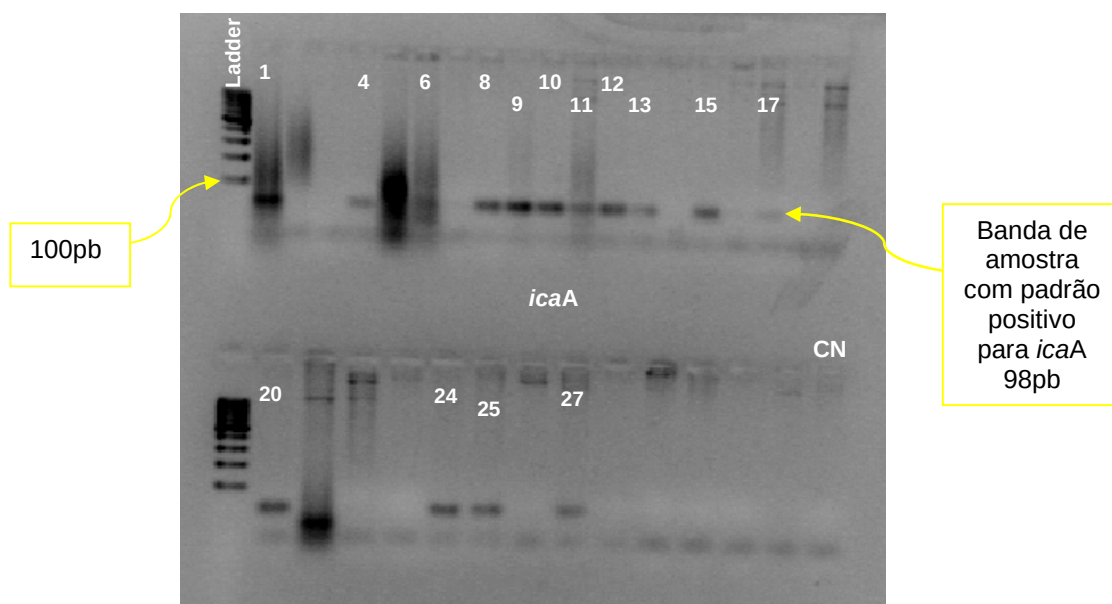


Figura 1. Imagem de gel de eletroforese após reação de PCR, com as estirpes isoladas de *Staphylococcus* spp demonstrando a presença dos genes *icaA*. CN = Controle Negativo.

Na Figura 1 a primeira coluna de todas as linhas mostra o marcador de peso molecular, Ladder 100. É possível visualizar as estirpes positivas para gene *icaA* nas colunas 4, 6, 11, 12, 13, 20 e 24, as quais foram isoladas de amostras de superfície de tanque; também foram positivas para o gene *icaA* as estirpes presentes nas colunas 10 e 27, isoladas de amostras de tubulações; e das colunas 1, 8, 9, 15, 17 e 25, estirpes isoladas de leite.

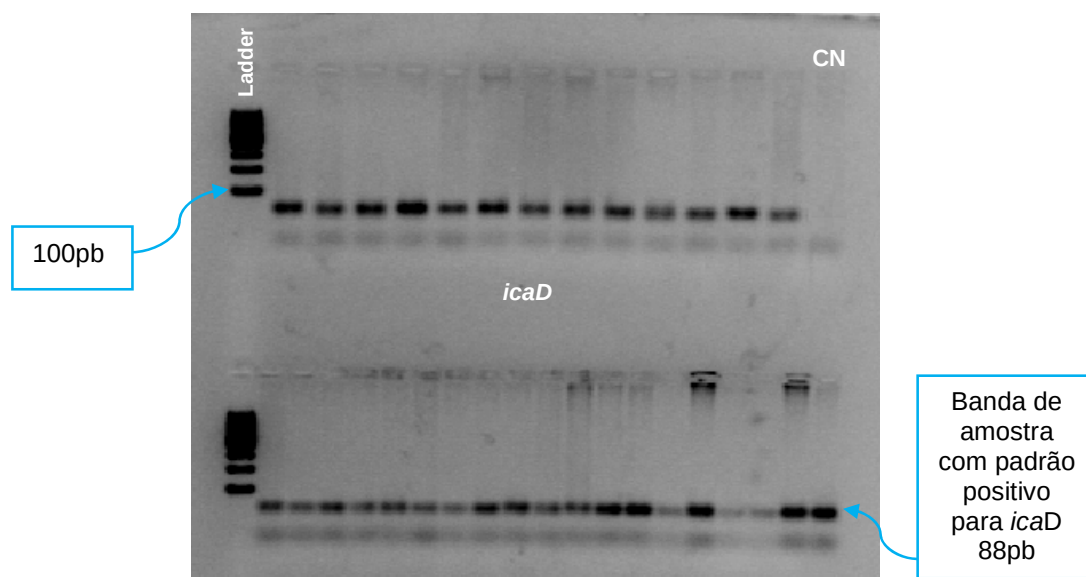


Figura 2. Imagem de gel de eletroforese após reação de PCR, com as estirpes isoladas de *Staphylococcus* spp demonstrando a presença dos genes *icaD*. CN = Controle Negativo.

Na Figura 2 a primeira coluna de todas as linhas mostra o marcador de peso molecular, Ladder 100 e todas as estirpes isoladas positivas para o gene *icaD*.

Na análise genotípica das 41 estirpes isoladas por meio de PCR obteve-se 16 estirpes de estafilococos coagulase-positivo, 04 (25%) que apresentaram o gene *icaA* e das 25 estirpes de estafilococos coagulase-negativo 11 (44%) apresentaram o gene *icaA*. Tanto as 16 (39,0%) estirpes de estafilococos coagulase-positivo como as 25 (61,0%) estirpes de estafilococos coagulase-negativo apresentaram pelo menos um gene, o *icaD*, pressupondo possuírem habilidade genética para formação de biofilme em qualquer superfície.

No presente estudo, foi investigada a presença dos genes *icaA* e *icaD*, responsáveis por sintetizar os polissacarídeos para a adesão bacteriana às superfícies formando biofilme, em 41 estirpes de *Staphylococcus* spp isoladas de amostras de leite oriundas de tanques e das superfícies e tubulações. Observou-se a presença do gene *icaA* em 15 (36,6%) estirpes e gene *icaD* em 41 (100,0%) as amostras. Os resultados

obtidos evidenciaram mais uma vez o que a literatura cita sobre a importância e presença desses genes na formação do biofilme.

MELO (2008), investigou a presença dos genes *icaA* e *icaD* responsáveis pela síntese do *slime* em 94 estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica e confirmou que 95,7% das estirpes de *S. aureus* possuíam os genes *icaA* e *icaD*.

HEILMANN et al. (1997), citado por MELO (2008), relatou que os genes (*icaABC*) que intervêm o agrupamento celular e a síntese do PIA foram clonados e seqüenciados. Mais tarde, o gene *icaD* localizado entre *icaA* e *icaB*, também foi identificado. O gene *icaA* carrega a N-acetilglicosaminatransferase que, sozinha, exibe baixa atividade de transferase. A coexpressão de *icaA* junto com *icaD* aumenta a atividade e síntese dos oligômeros N-acetilglicosamina.

VASUDEVAN et al. (2003) analisaram estirpes de *S. aureus* isoladas de amostras de leite oriundas de bovinos com mastite subclínica e encontraram 100% das estirpes com os genes *icaA* e *icaD* confirmando o potencial desses genes como fator de virulência na patogenia da mastite de ruminantes.

BERNARDI (2005) demonstrou a importância dos biofilmes e sua ligação com o gene *ica* nos estafilococos coagulase-negativa oriundos de cateteres venosos, e encontraram 88,8% das estirpes com gene *icaA* e 92,5% com gene *icaD*.

ZIEBUHR et al. (1997) estudaram 88 isolados clínicos de estafilococos, 52 originadas de sangue e 36 oriundos da pele e relataram que 87% (45 de 52) de *S. epidermidis* isolados de cateter foram produtores de biofilme, enquanto que apenas 11% (4 de 36) isolados da pele foram produtores de biofilme.

CRAMTON et al. (1999), ARCIOLA et al. (2001), encontraram 61%, e 100% respectivamente, das estirpes de *S. aureus* isoladas de infecções em humanos, com os genes *icaA* e *icaD*.

ARCIOLA et al. (2002) demonstraram que a segunda fase da formação dos biofilmes requer a adesina polissacarídica intercelular (PIA), um homopolímero parcialmente desacetilado com resíduo N-acetilglicosamina ligado pela ponte 1-6 beta-glicosídeo, o qual é produzido pelo locus do gene *ica*.

ZIEBUHR et al. (1997) demonstraram a existência de uma forte correlação entre a formação de biofilme e presença do gene de agrupamento *ica*.

5.3 Ocorrência de adesão de estafilococos coagulase-positivo e estafilococos coagulase-negativo em superfície de aço inoxidável

A Figura 3 possibilita visualizar, por meio das eletromicrografias, a presença de células de estirpes de estafilococos coagulase-negativo e de estafilococos coagulase-positivo isoladas previamente de tanque de recepção antes da higienização, sobre as superfícies de aço inox (AISI 304) utilizadas como suporte para a formação *in vitro* de biofilme.

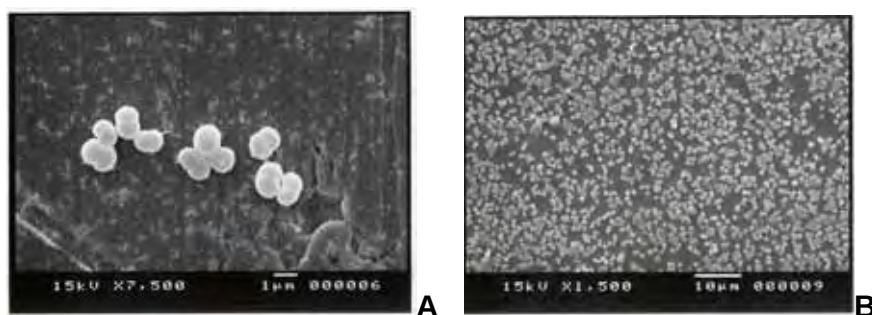


Figura 3. Eletromicrografia de células aderidas em superfície de aço inox AISI 304 de estirpes isoladas de tanque de recepção antes da higienização: **(A)** estafilococos coagulase-negativo; **(B)** estafilococos coagulase-positivo.

Na Figura 4, por meio das eletromicrografias, observa-se a presença de células de estirpes de estafilococos coagulase-negativo e estafilococos coagulase-positivo isoladas de tanque de estocagem de leite cru antes da higienização, sobre as superfícies de aço inox (AISI 304) utilizadas como suporte para a formação *in vitro* de biofilme.

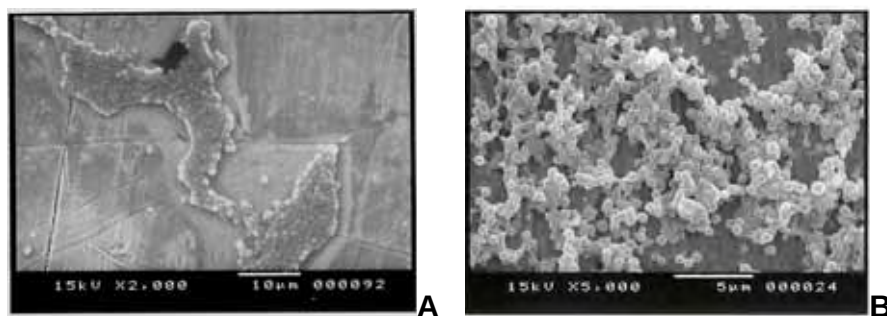


Figura 4. Eletromicrografia de células aderidas em superfície de aço inox AISI 304 de estirpes isoladas de tanque de estocagem de leite cru antes da higienização: **(A)** estafilococos coagulase-negativo; **(B)** estafilococos coagulase-positivo.

Por meio da Figura 5, é possível observar, nas eletromicrografias, células de estirpes de estafilococos coagulase-negativo previamente isoladas de tanque de estocagem de leite cru após a higienização e estafilococos coagulase-positivo previamente isoladas de tanque de estocagem de leite pasteurizado antes da higienização, sobre as superfícies de aço inox (AISI 304) utilizadas como suporte para a formação *in vitro* de biofilme.

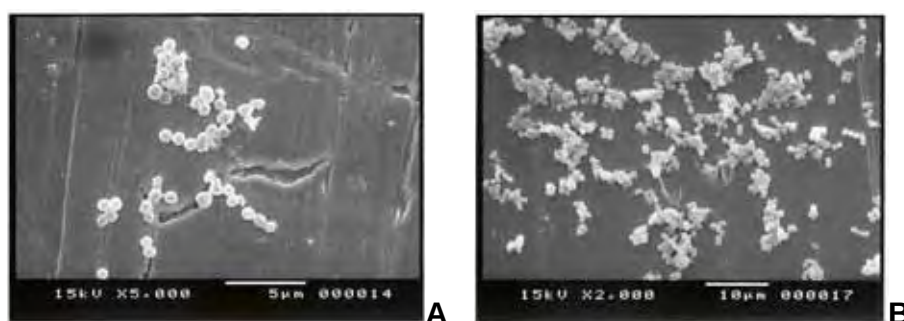


Figura 5. Eletromicrografia de células aderidas em superfície de aço inox AISI 304 de estirpes isoladas: **(A)** estafilococos coagulase-negativo de tanque de estocagem de leite cru após a higienização; **(B)** estafilococos coagulase-positivo de tanque de estocagem de leite pasteurizado antes da higienização.

A Figura 6 mostra, pelas eletromicrografias, sobre as superfícies de aço inox (AISI 304) utilizadas como suporte para a formação *in vitro* de biofilme, células de estirpes de estafilococos coagulase-positivo isoladas previamente da tubulação da máquina de envase antes da higienização.

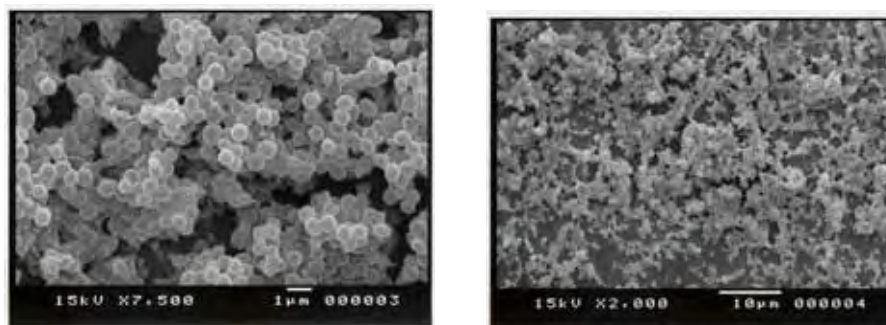


Figura 6. Eletromicrografias de células aderidas em superfície de aço inox AISI 304 de estirpes isoladas da tubulação da máquina de envase antes da higienização: estafilococos coagulase-positivo.

Através da Figura 7 é possível visualizar, nas eletromicrografias, sobre as superfícies de aço inox (AISI 304) utilizadas como suporte para a formação *in vitro* de biofilme, células de estirpes de estafilococos coagulase-positivo previamente isoladas da tubulação da máquina de envase após a higienização.

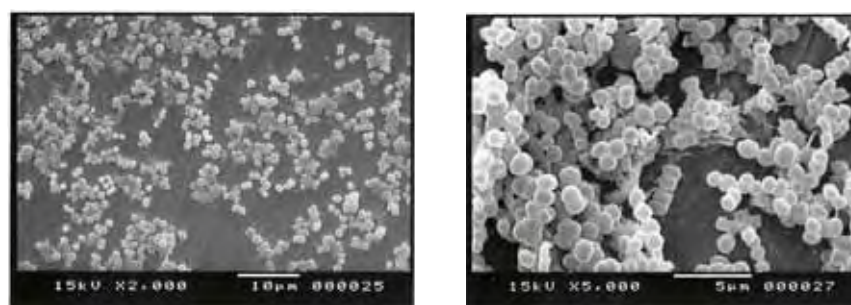


Figura 7. Eletromicrografias de células de estafilococos coagulase-positivo aderidas em superfície de aço inox AISI 304 de estirpes isoladas da tubulação da máquina de envase após a higienização.

Por meio das eletromicrografias da Figura 8 é possível visualizar, sobre as superfícies de aço inox (AISI 304) utilizadas como suporte para a formação *in vitro* de biofilme, células de estirpes de estafilococos coagulase-negativo isoladas de amostras de leite do tanque de recepção, do tanque de estocagem de leite cru e do leite envasado.

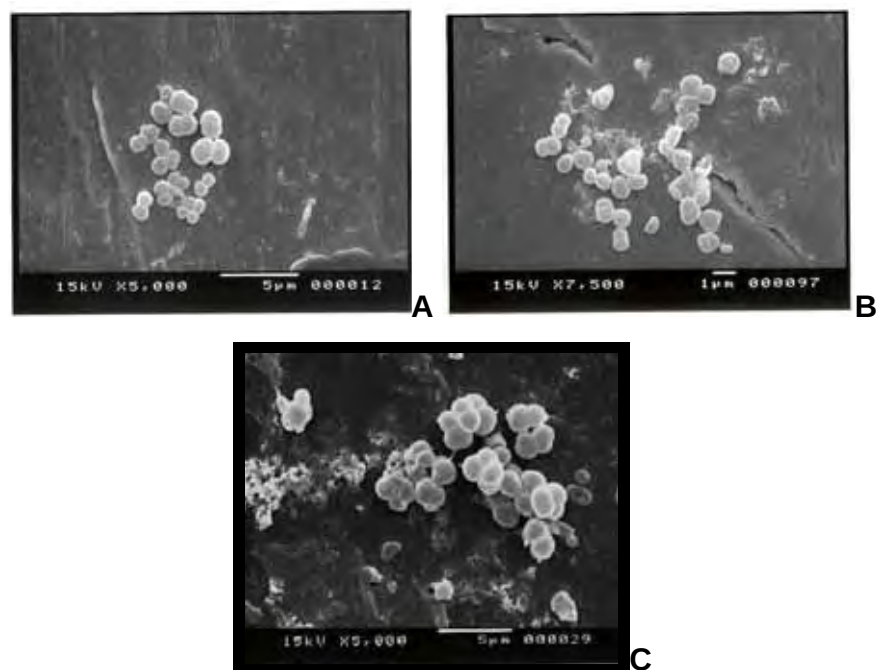


Figura 8. Eletromicrografias de células aderidas em superfície de aço inox AISI 304 de estirpes de estafilococos coagulase-negativo isoladas de: **(A)** Tanque de recepção; **(B)** Tanque de estocagem de leite cru; **(C)** Leite envasado.

As bactérias podem aderir a uma variedade de superfícies presentes no ambiente de indústrias processadoras de alimentos, como as superfícies de aço inoxidável AISI 304, comumente o material mais utilizado em plantas e instalações industriais. Uma vez aderidas, as bactérias podem formar um biofilme microbiano, que apresenta a característica de difícil remoção de superfícies constituindo, assim, uma fonte potencial de contaminação dos alimentos com microrganismos patogênicos e deterioradores (HOOD & ZOTTOLA, 1995).

Existem várias técnicas avançadas disponíveis para visualizar a formação do biofilme em superfícies, porém neste trabalho utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura devido à sua disponibilidade e por ser uma técnica amplamente utilizada em pesquisas sobre biofilme, além de fornecer bons resultados topográficos assim como já comprovado por CABEÇA, 2006; PIZZOLITTO, 1997; COSTERTON et al., 1999.

Neste estudo, como na investigação realizada por CABEÇA (2006), demonstrou-se visualmente a presença dos microrganismos sobre as superfícies, diferentemente de

outros pesquisadores, que procuraram avaliar a eficácia de agentes desinfetantes na eliminação de tais microrganismos aderidos, ou também a resistência a sanificantes químicos (GIBSON et al, 1999; AUGUSTIN et al., 2004; MARQUES, 2005).

A adesão de células bacterianas, como *S. aureus* em superfícies de vidro e aço inoxidável detectado no trabalho de MARQUES (2005) foi também observada por MAFU et al. (1990) nas superfícies de aço inoxidável, vidro, polipropileno e borracha. Esses autores verificaram que os microrganismos aderiram em todas as superfícies por eles estudadas.

Deve-se assinalar, contudo, que a adesão de *S. aureus* à superfície de aço inoxidável não foi demonstrada por PARIZZI (1998), ao avaliar a adesão de *S. aureus* ATCC 6538 e *Listeria monocytogenes* L6a em cupons de aço inoxidável AISI 304, policarbonato e polipropileno.

FIGUEIREDO (2000) mostra que, em concentrações maiores de células, ocorre maior proporção de células aderidas. Isso reforça a necessidade de obter alimentos com baixo nível de contaminação microbiana, mesmo antes do processamento, já que tal fato implica menor número de bactérias aderidas à superfície e, portanto, menor contaminação do alimento que irá entrar em contato com aquela superfície. Tal citação vem confirmar o encontrado nas eletromicrografias do presente estudo, no qual houve variações na quantidade de células aderidas provavelmente devido a variações no número de células inoculadas para o cultivo de biofilme nos cupons de aço inoxidável.

Por meio das eletromicrografias foi possível visualizar o *slime*, caracterizado por uma massa amorfa que envolve as células bacterianas aderidas entre si formando um agrupamento e também variações na multiplicação dos microrganismos no meio de cultura com os cupons de aço inoxidável.

ZOLTAI et al. (1981) demonstraram que, ao elevar o tempo de contato do microrganismo com a superfície, o número de células aderidas, o tamanho da microcolônia e o grau de adesão também aumentam. Além disto, ocorre o incremento da resistência a sanificantes. Assim sendo, a quantidade de células aderidas poderia ser variada caso trabalhássemos com maior ou menor tempo de incubação. Isso mostra a importância de serem feitos intervalos para higienização após um período de 6 a 8

horas de processamento, pois pode haver um número significativo de bactérias aderidas ao equipamento e as células aderidas no início do período de trabalho podem apresentar maior resistência ao processo de higienização.

Existem na literatura poucos dados disponíveis sobre a adesão e ou formação de biofilme de *Staphylococcus* spp, oriundos de circuitos de beneficiamento de leite, sobre superfícies de aço inoxidável, o que dificulta a comparação dos dados obtidos na pesquisa.

MARQUES (2005) cita que, para haver formação de biofilme, a adesão bacteriana deve estar entre 10^6 e 10^7 UFC/cm², pois valores inferiores a estes poderiam ser indícios apenas de adesão. ANDRADE et al.(1998) sugere que seja necessário um número mínimo de 10^7 células aderidas por cm², enquanto RONNER & WONG (1993) e WIRTANEN et al.(1996) consideram biofilme o número de células aderidas de 10^5 e 10^3 por cm² respectivamente.

Assim como constatado por MARQUES (2005), neste estudo também pode ser observado, pelas eletromicrografias da microscopia eletrônica de varredura, que os cupons de aço inoxidável possuem fendas ou ranhuras que permitem às bactérias se alojarem e iniciarem sua multiplicação. Neste sentido, sabe-se que o aumento de irregularidades nesta superfície proporciona o aumento no número de microrganismos aderidos de modo a possibilitar a formação do biofilme.

A análise por microscopia eletrônica de varredura evidenciou a capacidade de estirpes de estafilococos coagulase-positivo e estafilococos coagulase-negativo, isoladas da micro-usina de beneficiamento de leite, portadoras dos genes *icaA* e *icaD*, de formarem biofilme em superfície de aço inoxidável.

6. CONCLUSÕES

- Foram isoladas estirpes de estafilococos coagulase-positivo e estafilococos coagulase-negativo no leite cru, no leite pasteurizado e nas superfícies das tubulações e dos tanques de estocagem, antes e/ou após a execução dos processos de higienização;

- Todas as estirpes de estafilococos coagulase-positivo e estafilococos coagulase-negativo isoladas, apresentaram pelo menos um dos genes responsáveis pela formação de biofilmes (*icaD*), evidenciando, portanto, a sua potencialidade de aderência as superfícies e, conseqüente formação de biofilmes;

- A microscopia eletrônica de varredura evidenciou que as estirpes de estafilococos coagulase-positivo e estafilococos coagulase-negativo, foram capazes de promover a adesão e a conseqüente formação de biofilme nas superfícies de aço inoxidável;

- Tais achados são preocupantes principalmente se considerada a capacidade enterotoxigênica de algumas estirpes de estafilococos coagulase-positivo e estafilococos coagulase-negativo, fato este que pode significar a ocorrência de riscos para a saúde pública.

7. REFERÊNCIAS*

AKIYAMA, H.; YAMASAKI, O.; TADA, J.; ARATA, J. The production of superantigenic exotoxins by coagulase-negative staphylococci isolated from human skin lesions. **Journal of Dermatology Science**, Shannon, v. 24, n. 2, p. 142-5, 2000.

AMARAL, L.; ROSSI JUNIOR, O. D.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, F. I.; BARROS, L. S.; Ocorrência de *Staphylococcus* sp. em água utilizada em propriedades leiteiras do estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 5, p 620-623, 2003.

ANDRADE, N. de; MACEDO, J. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996, 1802 p.

ANDRADE, N. J.; BRIDGEMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 7, p. 833-838, 1998.

ANDRADE, N. J.; SILVA, R. M. M.; BRABES, K. C. S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 3, p. 590-596, 2003.

ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CAMPOS, M. R. H.; BORGES, L. J.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F. C.; SERAFINI, A. B. Comparison os *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine Milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 2, p. 200-207, 2008.

*NBR 6023 / ABNT 2003

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/ALIMENTOS/seguranca/capacita_rh.htm>. Acesso em: 26 jan. 2009.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 3. ed. Washington: APHA, 2001.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 6, p. 2151-2156, 2001.

ARCIOLA, C.R.; CAMPOCCIA, D.; GAMBERINI, S.; CERNELLATI, M.; DONATI, E.; MONTANARO, L. Detection of slime production by means of an optimized Congo red agar plate based on a colorimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus. **Biomaterials**, Kidlington, v. 23, n. 21, p. 4233-4239, 2002.

ATAIDE, W. S. **Avaliação microbiológica e físico-química ao longo da linha de processamento de leite pasteurizado tipo C.** 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2006.

AUGUSTIN, M.; ALI-VEHMAS, T.; ATROSHI, F. Assessment of enzymatic cleaning agents against bacterial biofilms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 7, p. 55-64, 2004

BANNERMAN, T. L.; MURRAY P. R.; BARON E. J.; JORGENSEN J. H.; PFALLER M. A.; YOLKEN R. H. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. **Manual of Clinical Microbiology.** 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, v. 1, p.384-404, 2003.

BERESFORD, M. R.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 6, p. 1000-1005, 2001.

BERNARDI, A. C. A. **Estudo de amostras de *Staphylococcus coagulase-negativos* quanto a formação de biofilme**. Tese, 145 f. (Doutorado em Análises Clínicas – Microbiologia clínica), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

BERNARDI, A. C. A.; PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C. Detecção da produção de slime por estafilococos coagulase-negativa isolados de cateter venoso central. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 1, p. 57-66, 2007.

BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. 2008. 80 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BOER, E.; BEUMER, R.R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1-2, p. 119-130, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado tipo C refrigerado. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 20 de setembro de 2002. Seção 1.

BRECKINRINDGE, J. C.; BERGDOLL, M. S. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. **Medical Intelligence**, The New England, v. 284, n. 10, p. 541-543, 1971.

CABEÇA, T. K. **Suscetibilidade de microrganismos relacionados com a contaminação de alimentos em biofilme artificial e em suspensão frente a desinfetantes**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2006.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas species de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008, 75 f. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CARMO L. S.; DIAS R. S.; LINARDI V. R.; SENA M. J.; SANTOS D. A.; FARIA M. E.; PENA E. C.; JETT M.; HENEINE L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, Guildford, v. 19, n. 1, p. 9 -14, 2002.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Georgia, v. 2, n. 1, p. 22-32, 2003.

COSTERTON, J. W.; STEWART, PHILIP S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science Magazine**, New York, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELLI, N. F.; NICHOLS, W. W.; GOTZ, F. The intercellular adhesion (ica) locus is presente in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n.10, p. 5427- 5433, 1999.

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. **Molecular and Cellular Probes**, Columbia, v. 19, n. 5, p. 299-305, 2005.

DOLCE, O.; POMPEO, J. N. Fundamentos de matemática elementar: **geometria espacial**. São Paulo: Atual, 1996, v.10.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1992.

FEIJÓ, L. D.; PINHEIRO, C. A.; SILVA, A. C. O.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Caminhões de Coleta a Granel: Monitoramento da Qualidade do Leite, da Higienização do Mangote e da Superfície do Caminhão Tanque. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 19, 2002, Juiz de Fora - MG. **Anais...** Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2002.

FIGUEIREDO, H. M. **Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite**. 2000. 85 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2000.

FIGUEIREDO, R. M. PRP - Programa de Redução de Patógenos e SSOPs - Padrões de Procedimentos Operacionais de Sanitização – Manual de Procedimentos e Desenvolvimento. São Paulo, Editora Manole, 1999, v. 1, n. 6, 164 p. (Núcleo, 6)

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v. 33, n. 3 p. 291-296. 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA. **Food Code**: recommendations of the United States Public Health Service. Washington: United States Department of Health a Human Services, 1997. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodCode/FoodCode1997/ucm054043.htm>>. Acesso em 30 de jan. 2009.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia de segurança alimentar**, Porto Alegre: Artmed, 2002.424 p.

FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 68-69, p.70-77, 2000.

FREITAS, L.H. **Sistema especialista para diagnóstico de toxinfecções alimentares de origem bacteriana**. 1995. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

GANDRA, A. E. **Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado**. 2006. 66 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SUSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GOTZ, F. Characterization of the N- acetylglucosaminyl-transferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* – polysaccharide intercellular adhesin. **Journal of Biology Chemesty**. La Jolla, v. 273, n. 29, p.18586-18596, 1998.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. São Paulo: Varela, 2001. p. 629.

GIBSON, L. L.; ROSE, J. B.; HAAS, C. N. Use of quantitative microbial risk assessment for evaluation of the benefits of laundry sanitation. **American Journal of Infection Control**, St Louis, v. 27, n. 6, p. 34-39, 1999.

GILBERT, P.; MC BAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Suitland, v. 51, n. 4, 245-248, 2003.

GUIMARÃES, K. A. S.; ANDRADE, A. S. Contaminação de produtos lácteos por *Staphylococcus aureus*: revisão bibliográfica. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.22, n.50, p.56-62, 2008.

HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods – a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 52, n. 4, p. 267-282, 1989.

HAYES, P.R. **Microbiología e higiene de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. 187-196 p.

HEILMANN, C.; PETERS, G. Biology and pathogenicity of *S. epidermidis*. In: FISCHETTI, V.A.; NOVICK, R.P.; FERRETI, J.J.; PORTNOY, D.A.; ROOD, J.I. **Grampositive pathogens.**, Washington: ASM Press, 2000. cap. 46, p. 442-449.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Biofilms in food processing. **Food Control**, Guilford, v. 6, n. 1, p.9-18, 1995.

HOFFMANN, F. L.; COELHO, A. R.; MANSOR, A. P.; VINTURIM, T. M. Avaliação da atividade antimicrobiana "in vitro" de dois agentes sanificantes de uso industrial. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 94, p. 62-67, 2002.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in foods 5: microbiological specifications of food pathogens**. London: Blackel Academic & Professional, 1996. p. 4-14, 513.

KEIM, L. S. **Mapeamento dos estafilococos coagulase negativo no Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense, no período de 1998 a 2002**. 2005. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

KONEMAM, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico microbiológico**. São Paulo: Medci Editora Médica e Científica, 2001. 1466p.

KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia**. 2. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002. 132 p.

KWOK, A. Y. C.; CHOW, A. W. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Columbia, v. 53, n. 1, p. 87-92, 2003.

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

MACEDO, J. A. B. **Águas & águas**. São Paulo: Varela Editora e Livraria, 2001. 505 p.

MAFU, A. A.; ROY, D.; GOULET, J.; MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 9, p. 742-746, 1990.

MAH, T. H. C.; O' TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 9, n. 1, p.34-38, 2001.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T.; RADSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v. 83 , n. 1, p. 39-48, 2002.

MARQUES, C. S., Formação de Biofilmes por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a sanificantes químicos. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 68, p.337-348, 1971.

Mc KENNEY, D.; HUBNER, J.; MULLER, E.; WANG, Y.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. The ica locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide adhesin. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, p. 4711-4720, 1998.

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

MOSTELLER, T. M., BISHOP, J. R., Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.56, n.1, p.34-41, 1993.

MOURA, S. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 19, n. 3, p.229-237, 1993.

NADER FILHO, A. Características microbiológicas do leite pasteurizado dos tipos “B” e “C” processados por algumas usinas de beneficiamento do Estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 43, p. 30-32, 1996.

NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; SCHOKEN-ITURRINO, R.P. Características Microbiológicas do Leite Tipo C e das embalagens plásticas utilizadas no envase, em uma usina de beneficiamento do Estado de São Paulo. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 261-266, 1989.

NORWOOD, D.E.; GILMOUR, A. Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 86, n. 4, p.576-582, 1999.

OLIVEIRA, M.; NUNES, S. F.; CARNEIRO, C.; BEXIGA, R.; BERNARDO, F.; VILELA, C. L. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, Leipzig, v. 124, n. 1-2, p. 187-191, 2007.

OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J.; TEIXEIRA, P. The importance of physicochemical properties in biofilm formation and activity. **Biofilms in wastewater treatment: : an interdisciplinary approach**". London : IWA Publishing, 2003. p. 211-231.

OLIVEIRA, R. P. S. **Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba**. 2005. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2005.

OMORI, G.; KATO, Y. A staphylococcal food-poisoning caused by a coagulase negative strain. **Bilken Journal**, Suíça, v. 2, p.92, 1959.

PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência**. 1998. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

PARO, F. M.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; NADER FILHO, A.; AVILA, F. A. Características microbiológicas do leite tipo B, processados por uma micro-usina de beneficiamento do Estado de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.104/105, p.66-70, 2003.

PEREIRA, K. S.; PEREIRA, J. L. Estafilococcus coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 129, p. 32-34, 2005.

PEREIRA, L. T. P.; ESMERINO, L. A.; SILVA, N. C. C.; CHARNESKI, S. N.; GUZZONI, F. A.; ARAUJO, A. E. Avaliação dos indicadores de qualidade do leite pasteurizado tipo C comercializado em Ponta Grossa, Paraná. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 147, p. 83-88, 2006.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.21, n.2, Aug. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612001000200009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 09 jan. 2009. doi: 10.1590/S0101-20612001000200009.

PIZZOLITTO, E. L. **Contribuição ao estudo *in vitro* da corrosão induzida por microrganismos sobre liga-metálica a base de cobre, de uso na Odontologia – modelo experimental com as cepas cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus***. 1997. 118 f. Tese (Doutorado em biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1997.

PIZZOLITTO, E. L.; PIZZOLITTO, A. C.; POZETTI, G. L. Chemical and microbiological evaluation of the internal surfaces of aluminum tubes both unlined and lined with epoxi resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, n.4, p.340-344, 2001.

RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella thyphimurium* on stainless steel and buna-n rubber. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 9, p. 750-758, 1993.

SALUSTIANO, V. C. Isolamento, ribotipagem e controle de *Bacillus cereus* após a pasteurização do leite. 2007, 75 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SANTOS, J. M.; MAIA, A. S. dos. A SEM technique for preparing biological control agents of nematodes in action. **Acta Microscopica**, Rio de Janeiro, v. 6, suppl. B, p. 550-551, 1997.

SILVA, G. A. V. **Avaliação das condições de obtenção do leite e da ação de sanificantes no tanque de expansão em uma propriedade leiteira no município de Candeias/BA. Salvador – BA: estudo de caso.** 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos, Nutrição e Saúde da Escola de Nutrição) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006^a.

SILVA, L. F. **Procedimento operacional padronizado de higienização como requisito para segurança alimentar em unidade de alimentação.** 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006^b.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Varela Editora e Livraria, 1997. p.32-36, 54-57.

SILVA, W.P.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian Dairy farms. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 103-106, 2000.

TIRADO, C.; SCHIMDT, K. WHO surveillance programme for control of food-borne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. **Journal of Infection**, v. 43, n. 1, p.80-84, 2001.

VALLE, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S.; GOYACHE, J.; ORDEN, J.A.; VADILLO, S. Enterotoxin production by staphylococci isolated from goat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.5, p.1323-6, 1990.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, n. 1-2, p. 179-185, 2003.

VIEIRA, F. P. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias de leite *in natura*, pós processamento térmico e pesquisa de importantes patógenos.** 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Microbiologia Geral) – Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.

ZIEBUHR, W.; HEILMANN, C.; GOTZ, F. Detection of intercellular gene cluster (ica) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 3, p.890–896, 1997.

ZOLTAI, P. T.; ZOTTOLA, E. A.; McKAY, L. L. Scanning electron microscopy of microbial attachment to milk and milk contact surfaces. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 44, p.204-208, 1981.