UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE HUMANO, BOVINO E CAPRINO, E PESQUISA DE TOXINAS EM LINHAGENS DE *Staphylococcus* spp.

TATIANA SALERNO

Botucatu, SP
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE HUMANO, BOVINO E CAPRINO, E PESQUISA DE TOXINAS EM LINHAGENS DE *Staphylococcus* spp.

TATIANA SALERNO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Co-Orientador: Prof. Ass. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Botucatu, SP
2011

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

Salerno, Tatiana.
Avaliação microbiológica, físico-química e detecção de resíduos de antimicrobianos em leite humano, bovino e caprino, e pesquisa de toxinas em linhagens de *Staphylococcus* spp. / Tatiana Salerno. – Botucatu: [s.n.], 2011

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Orientador: Márcio Garcia Ribeiro
Coorientador: José Paes de Almeida Nogueira Pinto
Capes: 50502000

1. Leite – Qualidade. 2. Toxinas bacterianas. 3. Estafilococos.

Palavras-chave: Leite bovino; Leite caprino; Leite humano; Qualidade do leite; Resistência microbiana; *Staphylococcus* spp.; Toxina bacteriana.

Nome do Autor: Tatiana Salerno

Título: AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA, FÍSICO-QUÍMICA E DETECÇÃO DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM LEITE HUMANO, BOVINO E CAPRINO, E PESQUISA DE TOXINAS EM LINHAGENS DE *Staphylococcus* spp.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ–UNESP – Botucatu, SP.

Prof. Dr. Antonio Carlos Paes
Membro Titular
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ–UNESP – Botucatu, SP.

Prof. Dr. Hélio Langoni
Membro Titular
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ–UNESP – Botucatu, SP.

Profª. Drª. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Membro Titular
Departamento de Microbiologia e Imunologia
IB –UNESP – Botucatu, SP.

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites
Membro Titular
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
FMVZ–USP – São Paulo, SP.

Data da Defesa: 02 de setembro de 2011.

Dedicatória

Dedico esta pesquisa:

Á minha família

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. José Paes de Almeida N. Pinto

Pelo carinho, apoio, confiança e compreensão.

Agradecimentos

"O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário"

(Albert Einstein)

Aos meus pais, Alexandrina e Gilberto, minha sogra Édina e minha avó Maria pelo amor, apoio, incentivo e, principalmente, por compreenderem minhas ausências para que eu pudesse realizar mais esta etapa da minha vida.

Ao meu irmão Alessandro, por todo o amor, carinho e companheirismo...Calma, estou voltando!!!

Ao meu marido Alexandre pelo amor, "colo" em momentos difíceis, dedicação, carinho, auxílios e socorros prestados. Obrigada por estar sempre ao meu lado e por ser este marido maravilhoso...Prometo que você não lavará tubos tão cedo... TE AMO!!!!

Aos meus filhotes Lucky ("in memorian"), Belinha, Júnior, Thor, Pandora, Ozzy e agregadas Minie e Marli, pela companhia e amor incondicional!!! Obrigada por simplesmente ficarem ao meu lado.

Ao meu orientador Prof. Márcio Garcia Ribeiro, por acreditar em mim e contribuir significativamente com meu crescimento profissional. Agradeço imensamente o auxílio, o apoio, a atenção, o convívio, a paciência e correções desta tese. Elizete, Nicolas e Nicole, obrigada por compreenderem os momentos de aflição e ansiedade da "equipe Ribeiro".

Ao meu co-orientador Prof. José Paes de Almeida Nogueira Pinto, pelo incentivo e apoio na realização deste estudo.

Ao Prof. Antonio Carlos Paes, pela, amizade, carinho, palavras de incentivo em horas difíceis e pelos momentos hilários que animavam meu dia e que ficarão registrados para sempre. Obrigada por todos esses anos de confiança e oportunidades. Agradeço também à Carmela, pelo carinho e agradáveis momentos partilhados.

Ao Prof. Hélio Langoni, pelos ensinamentos, amizade e momentos alegres. Estendo os agradecimentos à Cidinha e Guilherme pelo carinho e agradável convívio.

À Profa. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha por me receber em seu laboratório, permitindo desta forma que eu concluísse meu projeto. Obrigada pela grande ajuda com as metodologias empregadas no estudo e por partilhar suas experiências profissionais, me mostrando "uma luzinha no final do túnel".

Ao Prof. Nilson Roberti Benites pela compreensão e prontidão em atender ao meu chamado de última hora, para compor a banca.

Profa. Jane Megid, Prof. Paulo Francisco Domingues, Prof. Rafael Modolo obrigada pelos ensinamentos e vivência.

Fernando José Paganini Listoni, obrigada pelos ensinamentos e auxílios prestados durante todos esses anos.

Sr. Roberto, Adílson (Pardal), Rodrigo Carrera, Adriana Pavan, Tânia, Wanderley, Sérgio, Benedito, Dna Ana e Adriana, obrigada pelos auxílios e agradável convívio.

À "velha guarda da equipe Ribeiro", Amanda Keller, Gustavo Lara, Martinha e Larissa Anuska e aos novatos, Thais Mizuki e Thiago

Zamprogna, pela amizade, companheirismo, diversão e grande ajuda na realização deste trabalho. Formamos uma equipe maravilhosa, com muito companheirismo, alegre e acima de tudo, unida...saudades das nossas bagunças e da Lári nos torturando com suas canções desafinadas...

À minha amiga Amanda Keller Siqueira, pelo convívio, auxílio em coletas e processamento de material. Agradeço também às nossas brigas... e quantas brigas, pois elas nos trouxeram maturidade, respeito e o mais importante, nos mostrou o quanto é sólida nossa amizade... Manduca, você sabe que torço muito pelo seu sucesso!!! Lembre-se: Amigos verdadeiros nunca se separam, apenas seguem caminhos diferentes...

Ao meu grande amigo Rodrigo Costa da Silva por todos esses anos de apoio e amizade.

Às queridas amigas, Melissa Hartmann, Vanessa Archiolli, Ana Cinthia Bresolim e Tatiana Tavares, que estão sempre presentes em minha vida, obrigada pelo carinho.

Aos antigos e novos amigos: Veruska, Juliano Hoffmann, André Peres Barbosa; Liguito, Acácia Elias, Fábio (Shima), Juliana Machado, Walquiria, Marcela Troncarelli, Nair, Vanessa Salgado, Vitória, Janaína, Priscilla, Taissa Cook, Luciano, Simone Mangia, Jaqueline, Ariane, Leila, Deolinda, Marília, e a todos os pós-graduandos, residentes e estagiários do Depto de Higiene Vet. e Saúde Pública, que me ajudaram a suportar a distância de casa. Obrigada pelo convívio, amizade e momentos alegres.

À Patrícia Kelly Silvestre e a todas as doadoras e equipe do Banco de Leite Humano do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP, pela grande contribuição na realização deste estudo.

A todos os pós-graduandos, técnicos, residentes e docentes da Inspeção de Alimentos, os meus sinceros agradecimentos pelos auxílios essenciais na realização do projeto.

Aos amigos do IB Valéria, Carlos, Patrícia, Mariana e Katheryne, pelo apoio e grande auxílio na realização desta última fase do projeto. Obrigada Danilo, Ligia, Carla, Luiza, Thaisa, Fabiana, Nice e Sônia pelos momentos alegres e agradáveis que contribuíram para aliviar o estresse...

Prof. Aristeu Vieira da Silva, obrigada pela rapidez na realização das análises estatísticas.

Às bibliotecárias da FMVZ-UNESP, pela atenção, auxílios e correções das referências bibliográficas.

José Roberto, Maria e Patrícia (funcionários da pós-graduação) obrigada pela atenção, paciência e informações solicitadas... Agora vocês se livram de mim...

À todos os criadores e animais leiteiros que contribuíram para a realização deste experimento;

Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro e auxílio à pesquisa.

Enfim, não poderia deixar de agradecer ao Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, meu "segundo lar" durante estes últimos sete anos e meio. Local que aprendi a amar, e que com certeza estará para sempre guardado em meu coração, assim como todos àqueles que fizeram ou ainda fazem parte desta GRANDE FAMÍLIA!!!

Sentirei saudade eterna...

Epígrafe

"Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende".

Leonardo da Vinci
(15 de abril de 1452 - 02 de maio de 1519)

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 Composição média do leite humano, bovino e caprino..... p. 46

Quadro 02 Iniciadores utilizados para detecção de genes codificadores de toxinas em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite humano, bovino e caprino, utilizando PCR. Botucatu, SP, 2011.... p. 73

Quadro 03 Número de linhagens de ECP e ECN isolados de leite cru de mulheres, de vacas e cabras com e sem mastite, submetidas a caracterização fenotípica e genotípica de linhagens MRS e pesquisa de toxinas. Botucatu, SP, 2011..... p.102

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 Resultado da acidez titulável em graus Dornic (°D) em 240 amostras de leite humano cru ordenhado, provenientes do BLH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011..... p. 79

Tabela 02 Resultados dos teores de creme, gordura total e valores energéticos obtidos de 240 amostras de leite humano cru proveniente do BLH, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011..... p. 80

Tabela 03 Resultado da acidez titulada em graus Dornic (°D) de 200 amostras de leite cru de vacas com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior de São Paulo. Botucatu, 2011..... p. 81

Tabela 04 Comparação dos resultados relativos à acidez titulada em graus Dornic (°D) de acordo com os valores estabelecidos pela IN 22, em 200 amostras de leite cru de vacas com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando o teste de qui-quadrado. Botucatu, 2011..... p. 82

Tabela 05 Resultado da acidez titulada em graus Dornic (°D) de 200 amostras de leite cru de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011..... p. 83

Tabela 06 Comparação dos resultados relativos à acidez titulada em graus Dornic (^{o}D) de acordo com os valores estabelecidos pela IN 37, em 200 amostras de leite cru de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando o teste de qui-quadrado. Botucatu, 2011..... p. 84

Tabela 07 Micro-organismos isolados de 240 amostras de leite, provenientes do BLH do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011..... p. 85

Tabela 08 Total de amostras de leite humano, positivas e negativas para isolamento microbiano em 240 amostras de leite provenientes do BLH do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011..... p. 85

Tabela 09 Espécies de ECP e ECN isoladas de amostras de leite de mulheres provenientes do BLH, do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011..... p. 86

Tabela 10 Comparação utilizando o teste de qui-quadrado, entre as 200 amostras de leite de vacas com mastite e 200 amostras de leite negativas para mastite provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo que apresentaram isolamento microbiano. Botucatu, 2011..... p. 87

Tabela 11 Micro-organismos isolados de 200 amostras de leite cru de vacas com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011..... p. 87

Tabela 12 Espécies de ECP e ECN isoladas de amostras de leite de vacas com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011..... p. 88

Tabela 13 Comparação utilizando o teste de qui-quadrado, entre as 200 amostras de leite de cabras com mastite e 200 amostras de leite negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo que apresentaram isolamento microbiano. Botucatu, 2011..... p. 89

Tabela 14 Micro-organismos isolados de 200 amostras de leite cru de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011..... p. 90

Tabela 15 Espécies de ECP e ECN isoladas de amostras de leite de cabras com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011..... p.91

Tabela 16 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, em estirpes isoladas de 240 amostras de leite provenientes do BLH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011..... p.92

Tabela 17 Perfil de sensibilidade “in vitro”, de 105 estirpes de *Staphylococcus* spp. isolados de 240 amostras de leite provenientes do BLH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011..... p. 93

Tabela 18 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” em estirpes isoladas de 200 amostras de leite de vacas com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011..... p.95

Tabela 19 Perfil de sensibilidade “in vitro” de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de 200 amostras de leite de vacas com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011. p. 96

Tabela 20 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, em estirpes isoladas de 200 amostras de leite de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011..... p. 98

Tabela 21 Perfil de sensibilidade “in vitro” de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de 200 amostras de leite de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011. p. 99

Tabela 22 Comparação dos resultados referente a presença de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana em 200 amostras de leite cru de vacas com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando o teste de qui-quadrado. Botucatu, 2011..... p. 100

Tabela 23 Comparação dos resultados referente à presença de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana em 200 amostras de leite cru de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando o teste de qui-quadrado. Botucatu, 2011..... p. 101

Tabela 24 Detecção fenotípica e genotípica de linhagens MRS isoladas de leite humano proveniente do BLH, do HC da Faculdade de Medicina da UNESP, Botucatu, SP, 2011..... p. 105

Tabela 25 Comparação do perfil de sensibilidade microbiana e concentração inibitória mínima da oxacilina entre linhagens de ECP e ECN isolados de leite humano proveniente do BLH do HC da Faculade de Medicina da UNESP, utilizando os testes G-Williams e Fisher. Botucatu, SP, 2011..... p. 106

Tabela 26 Detecção fenotípica e genotípica de linhagens MRS isoladas de leite de vacas com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011..... p. 107

Tabela 27 Comparação do perfil de sensibilidade microbiana e concentração inibitória mínima da oxacilina entre linhagens de ECP e ECN isoladas do leite de vacas com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando os testes G-Williams e qui-quadrado. Botucatu, 2011..... p.108

Tabela 28 Detecção fenotípica e genotípica de linhagens MRS isoladas de leite de vacas sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011..... p. 109

Tabela 29 Comparação do perfil de sensibilidade microbiana e concentração inibitória mínima da oxacilina em linhagens de ECN isoladas do leite de vacas com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando os testes G-Williams, Fisher e qui-quadrado. Botucatu, 2011..... p. 110

Tabela 30 Detecção fenotípica e genotípica de linhagens MRS isoladas de leite de cabras com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011..... p. 111

Tabela 31 Comparação do perfil de sensibilidade microbiana e concentração inibitória mínima da oxacilina entre linhagens de ECP e ECN isoladas do leite de cabras com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando os testes de Fisher, G-Williams e qui-quadrado. Botucatu, 2011..... p. 112

Tabela 32 Detecção fenotípica e genotípica de linhagens MRS isoladas de leite de cabras sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011..... p. 113

Tabela 33 Comparação do perfil de sensibilidade microbiana e CIM da oxacilina em linhagens de ECN isoladas do leite de cabras com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando os testes de Fisher, qui-quadrado e G-Williams. Botucatu, 2011..... p.114

Tabela 34 Comparação entre ECP e ECN isolados de leite humano, provenientes do BLH do HC da Faculdade de Medicina da UNESP, quanto a presença do gene *mecA* utilizando o teste de Fisher. Botucatu, SP,2011..... p. 116

Tabela 35 Comparação entre ECP e ECN isolados de leite de vacas com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo quanto a presença do gene *mecA,* utilizando o teste de Fisher. Botucatu, 2011..... p. 117

Tabela 36 Comparação entre linhagens de ECN isoladas de leite de vacas com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo quanto a presença do gene *mecA,* utilizando o teste de Fisher. Botucatu, 2011..... p. 117

Tabela 37 Comparação entre ECP e ECN isolados de leite de cabras com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo quanto a presença do gene *mecA,* utilizando o teste de Fisher. Botucatu, 2011..... p. 118

Tabela 38 Comparação entre linhagens de ECN isoladas de leite de cabras com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo quanto a presença do gene *mecA,* utilizando o teste de qui-quadrado Botucatu, 2011..... p. 119

Tabela 39 Gene de toxinas investigados em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite humano proveniente do BLH, do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011..... p. 123

Tabela 40 Gene de toxinas investigados em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de vacas com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011. p. 128

Tabela 41 Gene de toxinas investigados em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de vacas sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011. p. 129

Tabela 42 Comparação entre linhagens de ECN isoladas de leite de vacas com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo quanto à presença de genes para toxinas estafilocócicas, utilizando os teste de qui-quadrado e Fisher. Botucatu, 2011..... p. 130

Tabela 43 Gene de toxinas investigados em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de cabras com mastite, provenientes de propriedades do interior de São Paulo. Botucatu, 2011..... p. 131

Tabela 44 Comparação entre linhagens de ECN isoladas de leite de cabras com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo quanto à presença de genes para toxinas estafilocócicas, utilizando os teste de qui-quadrado e Fisher. Botucatu, 2011..... p. 132

Tabela 45 Genes de toxinas investigados em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de cabras sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu 2011.. p. 133

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 Amostras de leite do BLH, do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP. A: colheita de amostras de leite com frascos esterilizados. B: descongelamento de amostras de leite humano em banho-maria a 40°C. Botucatu, SP, 2011..... p. 60

Figura 02 Colheita de amostras de leite caprino em propriedades rurais do interior de São Paulo. A: Prova de Tamis; B: Adição de reagente na prova do CMT; C: Reação positiva na prova do CMT; D: Limpeza do óstio de teto com algodão embebido em álcool (70%); E: colheita de amostra de leite; F: tubos falcon com amostras de leite descongeladas para realização de análise laboratorial. Botucatu, SP, 2011..... p. 62

Figura 03 Avaliação da acidez de leite humano encaminhado ao Serviço de Inspeção de Alimentos da FMVZ/UNESP, Botucatu, SP. A: Preparo das amostras de leite humano para realização da titulação em graus Dornic (°D); B: Observação de coloração rósea persistente na solução. Botucatu, SP, 2011..... p. 63

Figura 04 Titulação em graus Dornic (°D) de amostras de leite de animais. A coloração rósea persistente indica a acidez, mediante o volume gasto (mL) da solução de hidróxido de sódio. Botucatu, SP, 2011..... p. 65

Figura 05 Provas bioquímicas para diferenciação de espécies do gênero *Staphylococcus*. A: Prova de fermentação dos açúcares xilose, sacarose, trealose, maltose, manitol e multiplicação em anaerobiose em tioglicolato. B: Produção de acetoína (esquerda: coloração marrom = negativa e direita: tonalidade avermelhada = positiva), Botucatu, SP, 2011..... p. 67

Figura 06 Determinação de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana em amostras de leite humano, bovino e caprino utilizando o *kit* Delvotest^{TM}. Botucatu, SP, 2011..... p. 68

Figura 07 Detecção fenotípica da presença de resistência à meticilina em linhagem de Staphylococcus spp. isoladas de amostra de leite, utilizando o método de CIM com fitas impregnadas com oxacilina2 (0,015 – 256 µg/mL). Botucatu, SP, 2011..... p. 70

Figura 08 Eletroforese em gel de agarose 2% para visualização dos genes da subunidade 16S do rRNA em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite: 1-10: linhagens de Staphylococcus spp.; 11: amostra negativa; 12: controle positivo; 13: controle negativo; 14: DNA ladder 100 pb. Botucatu, SP, 2011..... p. 72

Figura 09 Produção de toxinas em linhagens de S. aureus pelo método de "celofane over agar". A: Retirada do papel filtro. B: Disposição do papel celofane em placa de petri contendo ágar BHI. C: Deposição do inóculo sobre a folha de celofane. D: Multiplicação bacteriana após 24 horas de incubação, lavado com solução de Na2HPO4 a 0,01M. Botucatu, SP, 2011..... p. 75

Figura 10 Produção de toxinas pelo método de saco de diálise. A: Frascos de erlenmeyer contendo solução tampão inoculada com linhagens de Staphylococcus spp. e sacos de diálise repletos de BHI em concentração dupla, dispostos em agitador, mantidos a 37oC por 18 horas. B: Multiplicação de linhagens de *Staphylococcus* spp. Botucatu, SP, 2011..... p. 76

Figura 11 Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *mecA* em linhagens de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite humano provenientes do BLH do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. 1-16: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 17: controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591); 18: controle negativo (*S. aureus* ATCC 25923); 19: água MilliQ esterilizada; 20: 100 pb DNA ladder. Botucatu, SP, 2011..... p. 115

Figura 12 Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *sea* em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite humano provenientes do BLH do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. 1-10: linhagens de *Staphylococcus* spp; 11: controle positivo (ATCC 13565); 12: controle negativo; 13: água MilliQ esterilizada; 14: 100 pb DNA ladder. Botucatu, SP, 2011..... p. 121

Figura 13 Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *seb* em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite provenientes do BLH do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. 1-18: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 19: controle positivo (ATCC 19095); 20: controle negativo; 21: água MilliQ esterilizada; 22: 100 pb DNA ladder. Botucatu, SP, 2011..... p. 122

Figura 14 Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *sec* em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite de vacas. 1-8: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 9: controle positivo (ATCC 19095); 10: controle negativo; 11: água MilliQ esterilizada; 12: 100 pb DNA ladder. Botucatu, SP, 2011..... p. 124

Figura 15 Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *tsst-1* em linhagens de ECP isoladas de amostras de leite de cabras e mulheres. 1-21: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 13: ECP isolado de cabra; 14 e 20: ECP isolados de mulheres; 22: controle negativo; 23: controle positivo (ATCC 19095); 24: água MilliQ esterilizada; 25: 100 pb DNA ladder. Botucatu, SP, 2011..... p. 125

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

™: “Trademark”
%: Porcentagem
÷: Dividir
+: Mais ou positivo
±: Mais ou menos
-: Menos ou negativo
>: Maior que
<: Menor que
≥: Maior ou igual
≤: Menor ou igual
µg: Micrograma
µg/mL: Micrograma por mililitro
µL: Microlitro
µM: micromolar
ºC: graus Celsius
ºD: graus Dornic
AGL: Ácidos graxos livres
ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária
ATCC: “American Type Culture Collection”
BHI: caldo cérebro e coração
BLH: Banco de Leite Humano
CIM: Concentração inibitória mínima
CLSI: “Clinical and laboratory standards institute”
CMT: “California mastitis test”
DNA: Ácido desoxirribonucléico
dNTP: Deoxinucleotídeos trifosfato
ECN: Estafilococos coagulase negativo
ECP: Estafilococos coagulase positivo
EUA: Estados Unidos da América

FAO: “Food and Agriculture Organization” (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

g: Grama

H^+: íons de hidrogênio

HC-FM/UNESP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista

H_2S: Sulfeto de hidrogênio

IB: Instituto de Biociência

IC95%: Intervalo de confiança de noventa e cinco por cento

IFF: Instituto Fernandes Figueira

IN 51: Instrução Normativa 51

IN 37: Instrução Normativa 37

Kcal/L: Kilocaloria por litro

LH: Leite humano

LHO: Leite humano ordenhado

L-TD: L-triptofano desaminase

M: Molar

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

mecA: Gene codificador para resistência a meticilina

$MgCl_2$: Cloreto de magnésio

mg:Miligrama

min.: Minuto

mL: Mililitro

mm: Milímetro

mM: Milimolar

MRSA: *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

MRS: *Staphylococcus* spp.meticilina resistente

MS: Ministério da Saúde

N: normal

Nº: Número
NaCl: Cloreto de sódio
Na_2HPO_4: hidrogenofosfato dissódico
NaOH N/9: Hidróxido de sódio com normalidade igual a 9
ng: Nanograma
OPAS: Organização Panamericana da Saúde
pb: Pares de base
PBP: “Protein bilding penicillins”
PCR: Reação em cadeia pela polimerase
pH: pressão de hidrogênio
pmol: Peso molecular
PNIAM: Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno
PS: Sensibilidade parcial
R: Resistente
RPLA: Aglutinação passiva reversa em látex
Rpm: Rotações por minuto
S: Sensível
SCCmec: “ Staphylococcal Cassete Chromosome”
SE: “ Staphyococcal enterotoxin” (Enterotoxina estafilocócica)
se: Gene codificador para enterotoxina estafilocócica
SP: São Paulo
U: Unidade
U.I.: Unidade internacional
RNBLH: Rede Nacional de Bancos de Leite Humano
rRNA: ácido ribonucleico ribossomal
TBE: Solução tampão Tris/Borato/EDTA
TSST-1: Toxina da síndrome do choque tóxico
Tris-HCL: Cloridrato de Tris-(hidroximetil)-aminometano
tsst-1: Gene codificador para toxina da síndrome do choque tóxico
UCI: Unidade de cuidados intermediários
UTI: Unidade de terapia intensiva

x: Multiplicar

χ^2: Qui-quadrado

* Em virtude do uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem sua grafia no inglês.

SALERNO, T. **Avaliação microbiológica, físico-química e detecção de resíduos de antimicrobianos em leite humano, bovino e caprino, e pesquisa de toxinas em linhagens de *Staphylococcus* spp.** Botucatu, 2011. 211p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O presente estudo avaliou a qualidade microbiológica, as características físico-químicas e a presença de resíduos de antimicrobianos em leite de mulheres, vacas e cabras, bem como investigou a multirresistência bacteriana à antimicrobianos e a detecção de genes e produção de toxinas em linhagens de *Staphylococcus* spp. Foram colhidas 240 amostras de leite de mulheres encaminhadas ao Banco de Leite Humano (BLH) de Botucatu, SP, 200 amostras de leite de vacas com mastite e 200 de vacas sem mastite. Iguais quantidades de amostras de leite foram colhidas de cabras com e sem mastite. Dentre os tetos amostrados de vacas e cabras com mastite, 85,50% e 97,50% respectivamente acusaram mastite subclínica no CMT. A mastite clínica foi observada em 14,50% dos tetos de vacas e 2,50% dos tetos de cabras amostrados. A presença de micro-organismos em leite de vacas e cabras sem mastite foi verificada em cerca de 25,00% das amostras de leite testadas, alertando para a presença de animais portadores de patógenos no rebanho. A acidez dornic do leite de mulheres revelou que 95,42% encontraram-se dentro dos limites aceitáveis pela Rede Nacional de BLH. O aporte calórico do leite humano (LH) apresentou ampla variação nos teores de creme, gordura e valor energético. A acidez dornic do leite de vacas e cabras com e sem mastite apresentaram ampla variação indicando que outros fatores, além da contaminação microbiana do leite, podem interferir nos índices de acidez titulável. *Staphylococcus* spp. e *Enterobacter* spp. foram os isolados mais frequentes em amostras de LH. *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium bovis* foram os micro-organismos mais comumente isolados em leite de vacas com e sem mastite. Nas amostras de leite de cabras com e sem

mastite *Staphylococcus* spp. foi o micro-organismo com maior número de isolamentos. Amoxacilina com ácido clavulânico e fármacos pertencentes ao grupo das cefalosporinas foram os mais efetivos frente às linhagens isoladas de leite humano, bovino e caprino. A multirresistência antimicrobiana a cinco ou mais fármacos foi observada em 66,24% dos isolados de LH, e em mais de 40,00% e 66,00% dos isolados de leite de vacas e cabras, respectivamente. A presença de resíduo de antimicrobianos foi verificada em 85,00% das amostras de LH, 28,50% e 24,00% de amostras de leite de vacas com e sem mastite e 21,00% e 11,50% das amostras de leite de cabras com e sem mastite respectivamente. Dentre os estafilococos coagulase positivos (ECP) e negativos (ECN) avaliados, o gene *mecA* foi detectado em 53,33% dos ECP e 75,00% dos ECN isolados de LH, em 40,00% e 14,28% dos ECN isolados de vacas com e sem mastite, em 6,25% dos ECP de cabras com mastite e em 35,00% e 75,00% dos ECN de cabras com e sem mastite respectivamente. Os genes *sea*, *seb* e *sec* foram detectados em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de mulheres, de vacas e cabras. O gene *tsst-1* foi observado em apenas duas linhagens ECP isoladas de LH e uma de leite de cabra. Foi observada a produção de toxinas estafilocócicas A, B, C e TSST-1 em isolados de leite humano e de cabras. Apenas uma linhagem de ECN isolada de vacas sem mastite produziu a enterotoxina C. A presença de micro-organismos multirresistentes aos antimicrobianos e linhagens de *Staphylococcus* spp. detentoras de genes para resistência a meticilina e produtores de toxinas em isolados de leite humano, bovino e caprino, reforça a preocupação com os riscos de transmissão de bactérias multirresistentes e responsáveis por toxinfecções alimentares, especialmente em neonatos e idosos.

Palavras chave: Leite bovino, leite caprino, leite humano, qualidade do leite, resistência microbiana, *Staphylococcus* spp., Toxina bacteriana.

SALERNO, T. **Microbiological evaluation, physicist-chemistries and detection of antimicrobials residues in human, bovine and caprine milk, and toxin research in *Staphylococcus* spp. strains.** Botucatu, 2011. 211p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The present study evaluated the microbiological quality, the characteristics physicist-chemistries and the presence of antimicrobials residues in milk of women, cows and goats, as well as investigated the bacterial multidrug resistance and the detection of genes and/or toxin production in *Staphylococcus* spp. strains. Was collected 240 milk samples from women referred to the Human Milk Bank (HMB) in Botucatu, 200 milk samples from cows with mastitis and 200 cows without mastitis. Equal amounts of milk samples were collected from goats with and without mastitis. Among the sampled cows and goats teats with mastitis, 85.50% and 97.50% respectively accused subclinical mastitis on CMT. Clinical mastitis was observed in 14.50% of cows teats and 2.50% of the sampled goats teats. The presence of microorganisms in milk from cows and goats without mastitis was found in about 25.00% of the milk samples tested, warning of the presence of pathogens from animals in the herd. Dornic acidity of woman's milk revealed that 95.42% were within acceptable limits by the National Network of HMB. Calorie intake of human milk (HM) showed wide variation in the amounts of cream, fat and energy value. Dornic acidity of cows and goats milk with and without mastitis showed wide variation indicating that other factors in addition to microbial contamination of milk can interfere with acidity indices. *Staphylococcus* spp. and *Enterobacter* spp. were the most frequently isolated in samples of human milk. *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. and *Corynebacterium bovis* were the microorganisms most commonly isolated in milk cows with and without mastitis. In milk samples from goats with and without mastitis *Staphylococcus* spp. was the microorganism with greater isolation. Amoxicillin with clavulanic acid and drugs

belonging to the cephalosporins group were more effective against the strains isolated from human, cow and goat milk. The antimicrobial multiresistance to five or more drugs was observed in 66.24% of the isolates of human milk, and more than 40.00% and 66.00% of isolates from cows and goats milk, respectively. The presence of antimicrobial residues was found in 85.00% of human milk samples, 28.50% and 24.00% of milk samples from cows with and without mastitis and 21.00% and 11.50% of samples milk from goats with and without mastitis respectively. Among the coagulase-positive staphylococci (CPS) and coagulase-negative staphylococci (CNS) evaluated, the *mecA* gene was detected in 53.33% of CPS and 75.00% of the CNS isolated from HM, at 40.00% and 14.28% of the CNS isolated from cows with and without mastitis, at 6.25% of CPS of goats with mastitis and at 35.00% and 75.00% of the CNS of goats with and without mastitis respectively. The genes *sea*, *seb* and *sec* were detected in strains of *Staphylococcus* spp. isolated from women, cows and goats milk. The *tsst-1* gene was observed in only two strains isolated from CPS of human milk and one of goat milk. Was observed the production of staphylococcal toxins A, B, C and TSST-1 isolates in human and goat milk. Only one strain of CNS isolated from cows without mastitis produced enterotoxin C. The presence of multidrug-resistant microorganisms and strains of *Staphylococcus* spp. holders of genes for methicillin resistance and toxins producer in isolates of human, cow and goat milk, reinforcing concern about the risks of transmission of multidrug-resistant bacterial responsible for food poisoning, especially in neonates and the elderly.

Keywords: Bovine milk, caprine milk, human milk, milk quality, microbial resistance, *Staphylococcus* spp., bacterial toxin

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO..... 36
2 REVISÃO DA LITERATURA..... 39
2.1 Leite humano..... 39
2.1.1 Bancos de Leite Humano (BLH)..... 41
2.1.1.1 Qualidade do leite fornecido pelos BLH..... 42
2.1.2 Mastite puerperal em mulheres e resistência microbiana..... 43
2.2 Qualidade do leite de vacas e cabras..... 45
2.2.1 Mastite em animais de produção e resistência microbiana... 47
2.3 Gênero *Staphylococcus*..... 50
2.3.1 Mastite estafilocócica e resistência a meticilina..... 51
2.3.2 Marcadores de virulência e produção de toxinas pelo gênero *Staphylococcus*..... 54
3 OBJETIVOS..... 58
3.1 Geral..... 58
3.2 Específicos..... 58
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 59
4.1 Locais de colheita de leite..... 59
4.1.1 Banco de Leite Humano..... 59
4.1.2 Propriedades rurais..... 59
4.2 Colheita de leite..... 60
4.2.1 Leite humano..... 60
4.2.2 Leite bovino e caprino..... 61
4.2.2.1 Diagnóstico de mastite nos animais..... 61
4.3 Análises físico-químicas..... 62
4.3.1 Acidez e crematócrito em leite humano..... 62
4.3.2 Acidez em leite bovino e caprino..... 64
4.4 Isolamento e caracterização dos micro-organismos..... 65
4.4.1 Identificação de ECP e ECN..... 66

4.5 Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” e detecção de linhagens multirresistentes..... 67
4.6 Avaliação de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana no leite..... 68
4.7 Detecção de linhagens de *Staphylococcus* spp. produtoras de hemólise, investigação fenotípica e genotípica de MRS e pesquisa de toxinas..... 69
4.7.1 Detecção fenotípica de hemólise em ágar acrescido de sangue..... 69
4.7.2 Teste de difusão com discos para detecção fenotípica de MRS..... 69
4.7.3 Concentração inibitória mínima – CIM para detecção de MRS..... 70
4.7.4 Avaliação genotípica de linhagens MRS e detecção de gene para toxinas..... 70
4.7.4.1 Extração do DNA..... 70
4.7.4.2 Validação da extração do DNA..... 71
4.7.4.3 Amplificação do DNA (PCR) para detecção de linhagens de MRS..... 72
4.7.4.4 Amplificação do DNA (PCR) para detecção de linhagens toxigênicas..... 73
4.7.4.5 Eletroforese em gel de agarose..... 74
4.7.5 Detecção de linhagens de *Staphylococcus* spp. produtoras d e toxinas..... 74
4.7.5.1 Produção de enterotoxinas..... 74
4.7.5.1.1 *Staphylococcus aureus*..... 74
4.7.5.1.2 ECN e outras linhagens de ECP..... 75
4.7.5.2 Detecção das enterotoxinas A, B, C, D e TSST-1 pelo Método de Aglutinação em Látex (RPLA)..... 77
4.8 Análise estatística..... 77
5 RESULTADOS..... 79

5.1 Diagnóstico de mastite clínica e subclínica em vacas e cabras..... 79
5.1.1 Vacas..... 79
5.1.2 Cabras..... 79
5.2 Análises físico químicas..... 79
5.2.1 Avaliação da acidez e crematócrito em leite humano..... 79
5.2.2 Detecção de acidez em leite bovino e caprino..... 80
5.2.2.1 Leite de vacas..... 80
5.2.2.2 Leite de cabras..... 82
5.3 Isolamento e caracterização bioquímica dos micro-organismos..... 84
5.3.1 Isolados de leite humano..... 84
5.3.2 Isolados de leite de vacas..... 86
5.3.3 Isolados de leite de cabras..... 89
5.4 Teste de sensibilidade microbiana “in vitro”..... 91
5.4.1 Isolados de leite humano..... 91
5.4.2 Isolados de leite de vacas..... 94
5.4.3 Isolados de leite de cabras..... 97
5.5 Detecção de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana no leite..... 100
5.5.1 Isolados de leite humano..... 100
5.5.2 Isolados de leite de vacas..... 100
5.5.3 Isolados de leite de cabras..... 101
5.6 Investigação fenotípica e genotípica de linhagens MRS e pesquisa de hemólise e toxinas..... 101
5.6.1 Teste de difusão com discos e CIM para detecção fenotípica de MRS..... 102
5.6.1.1 ECP e ECN isolados de leite humano..... 102
5.6.1.2 ECP e ECN isolados de leite de vacas..... 103
5.6.1.3 ECP e ECN isolados de leite de cabras..... 104
5.6.2 Detecção genotípica de linhagens MRS..... 114
5.6.2.1 ECP e ECN isolados de leite humano..... 114
5.6.2.2 ECP e ECN isolados de leite de vacas..... 116

5.6.2.3 ECP e ECN isolados de leite de cabras..... 117
5.6.3. Produção de hemólise em ágar acrescido de sangue em linhagens de *Staphylococcus* spp..... 117
5.6.3.1 Isolados de leite humano..... 119
5.6.3.2 Isolados de leite de vacas..... 119
5.6.3.3 Isolados de leite de cabras..... 120
5.6.4 Detecção de genes e produção de toxinas estafilocócicas..... 120
5.6.4.1 Isolados de leite humano..... 120
5.6.4.2 Isolados de leite de vacas..... 124
5.6.4.3 Isolados de leite de cabras..... 125
6 DISCUSSÃO..... 134
7 CONCLUSÕES..... 156
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 158
9 ARTIGO CIENTÍFICO..... 189
9.1 Normas da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia..... 189
9.2 Comprovante de submissão de artigo..... 195
9.3 Artigo..... 196
ANEXOS..... 210

1. INTRODUÇÃO

A Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS (2003) define o leite materno humano como a principal fonte nutricional e de defesa orgânica para neonatos, recomendando-se a amamentação exclusiva até os primeiros seis meses de vida, devendo ser estimulada até os dois anos de idade.

Além do valor nutritivo e imunológico do leite, o aleitamento materno pode ser destacado como importante elo afetivo entre mãe e filho, capaz de influenciar no equilíbrio psíquico e emocional da criança (OPAS, 2003).

Em 1943 foi inaugurado o primeiro Banco de Leite Humano – BLH no Brasil. Atualmente, os BLHs são vinculados a hospitais maternos ou infantis e responsáveis pela promoção e incentivo ao aleitamento materno e execução de colheita, processamento e controle da qualidade do colostro, leite de transição e maduro, para posterior distribuição, sobre prescrição de médicos ou nutricionistas. Desta forma, garantem a oferta do leite como primeira opção de alimento para prematuros, contribuindo com a prevenção de doenças neonatais e redução da mortalidade infantil (OPAS, 2003; ANVISA, 2007).

Após o leite materno, o leite de vacas e cabras, bem como seus derivados, possui papel fundamental na nutrição de crianças, adultos e idosos por possuir elevado teor protéico, mineral, vitamínico, além de carboidratos e gorduras essenciais para o desenvolvimento e manutenção da saúde (FONSECA e SANTOS, 2000). Ademais, o leite de cabras possui propriedades hipoalergênicas podendo ser indicado, em casos especiais, a crianças e idosos que possuam alergia às proteínas do leite de vacas (SCHANLER, 1995; LAGUNA, 2010).

Além de fonte nutricional, o leite e seus derivados desempenham relevante papel econômico e social, geram renda e emprego a população, podendo ser considerado, portanto, um dos produtos mais importantes da agropecuária brasileira (CARVALHO et al., 2003).

A cadeia produtiva do leite bovino no Brasil vem sofrendo intensas modificações estratégicas e estruturais desde a década de 90 (VEIGA et al., 2005). Ao analisarmos os últimos 20 anos da cadeia láctea nacional, podemos observar que a produção vem crescendo gradativamente e dobrou seu volume de cerca de 14 bilhões de litros em 1990, para 29 bilhões de litros em 2009,

ocupando atualmente a quinta posição mundial em produção leiteira, superado apenas pelos EUA, Índia, China e Rússia (ZOCCAL, 2011).

Diferentemente da bovinocultura, a produção de leite de cabras no Brasil pode ser considerada atividade recente se compararmos a outros países, cuja caprinocultura leiteira é uma atividade consolidada e dispõe de grande apoio governamental (CORDEIRO e CORDEIRO, 2009).

Até o final da década de 80, não havia no Brasil comercialização legalizada de leite de cabras. O comércio era realizado informalmente, sem controle sanitário e fiscal (CORDEIRO e CORDEIRO, 2009). Atualmente, esta atividade encontra-se em franca expansão e vem conquistando o mercado de forma crescente (LORENZONI, 2005), seja com a venda de leite fluído pasteurizado, leite em pó e seus derivados como queijos e iogurtes (CORDEIRO e CORDEIRO, 2009), ou devido as características peculiares da fração protéica e lipídica deste produto, que beneficiam consumidores, especialmente crianças e idosos, que possuem alergias ou intolerância ao leite bovino (GONÇALVES et al., 2001; PANDYA e GHODKE, 2007).

A caprinocultura é vista também como fonte sustentável e com excelente possibilidade de rentabilidade econômica e estabilidade em certas áreas demográficas, principalmente nas regiões semiáridas brasileiras, que concentram mais de 90% do rebanho caprino nacional (DEBEUF, et al., 2004; CORDEIRO e CORDEIRO, 2009).

De acordo com a FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação), o Brasil produziu em 2009 cerca de 143 milhões de litros de leite de cabra (FAO, 2009), principalmente nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte, considerados os maiores produtores de leite caprino do país (CORDEIRO e CORDEIRO, 2009). No entanto, embora a produção de leite bovino e caprino no país esteja aumentando exponencialmente, ainda há déficits nas condições higiênico-sanitárias na produção (GOTTARDI et al., 2004).

O manejo inadequado dos animais pode levar a ocorrência de processo inflamatório glandular mamário, ocasionado por diversos micro-organismos que irão influenciar diretamente nas características físico-químicas, composição e celularidade do leite (LANGONI et al., 2006) trazendo como consequência

prejuízos financeiros ao criador devido a rejeição do produto final (GOTTARDI et al., 2008).

Diversos micro-organismos estão envolvidos na gênese de infecções mamárias em animais de produção, dos quais muitos também possuem potencial zoonótico. O gênero *Staphylococcus*, particularmente *S. aureus,* destaca-se como o principal grupo de patógeno isolado de animais com mastite (RADOSTITS et al., 2007). Este agente também tem sido isolado com elevada frequência de amostras de leite de mulheres saudáveis ou com mastite puerperal (LAWRENCE e LAWRENCE, 2007).

No Brasil, apesar da escassez de estatísticas oficiais sobre o assunto, tem se atribuído elevada importância às infecções ocasionadas pelo consumo de leite cru e seus derivados contaminados por micro-organismos, uma vez que cerca de 30% do leite consumido no país é proveniente do mercado informal, comercializado sem qualquer tratamento térmico ou inspeção sanitária (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

Desta forma, *S. aureus* assume grande preocupação pelos profissionais de saúde, em virtude dos riscos da veiculação de toxinas aos humanos por alimentos como leite e derivados (SALES et al., 2000; WINN JR., et al., 2008). Recentemente, diversos pesquisadores têm enfatizado a importância de estafilococos coagulase-negativos (ECN) toxigênicos isolados de alimentos. Assim, embora *S. aureus* seja o principal agente envolvido em intoxicações alimentares, há atualmente, grande preocupação da comunidade científica com relação aos ECN, reconhecidos como patógenos oportunistas em diversas afecções em animais e humanos, aliado aos riscos de linhagens toxigênicas na casuística de toxinfecção alimentar em humanos (CUNHA et al., 2006).

Neste contexto, são imprescindíveis estudos nacionais conduzidos na investigação de parâmetros de qualidade do leite armazenado em BLHs fornecido aos recém-nascidos. Igualmente, estudos continuados são necessários com vistas a melhorar a produção e qualidade do leite de vacas e cabras, nos quais as boas práticas para obtenção de ordenha higiênica, particularmente no tocante a adoção de ações de controle dos micro-organismos causadores de mastite de origem contagiosa, refletem na melhora da qualidade e inocuidade do produto final que será destinado à população.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Leite humano

Desde os tempos bíblicos, o leite materno é considerado o alimento de escolha para a nutrição infantil. Registros datados de 100 anos antes de Cristo demonstram a preocupação em descobrir um sucedâneo para este alimento (SILVA, 1999).

No século XVIII, a amamentação de neonatos foi desestimulada na Europa, com o incremento das amas de leite (ALMEIDA, 2000). No Brasil, antes da colonização, o regime alimentar dos lactentes indígenas resumia-se ao aleitamento direto do peito. Com a chegada dos portugueses, a figura da ama de leite foi socialmente instituída nas famílias brasileiras abastadas. Nesta época, as escravas eram impostas a desmamar seus filhos em prol da amamentação de crianças brancas, surgindo a figura da mãe-preta (SILVA, 1999; CARDOSO et al., 2005).

No século XIX, era prática comum o aleitamento com amas de leite, fato que gerou grande aumento da mortalidade infantil devido a ocorrência de infecções entéricas, respiratórias e desnutrição, ocasionados pelo desmame precoce de mulheres, geralmente de condição financeira precária, que abandonavam seus filhos em troca de renda como amas de leite (SHORT, 1997). Com o passar do tempo, as amas de leite começaram a ser selecionadas de acordo com suas características físicas, comportamentais e religiosas, pois se acreditava que estes atributos eram repassados aos lactentes pelo leite.

Devido às restrições impostas à seleção das amas-de-leite, a alimentação de crianças passou a ser realizada com leite de vaca diluído, pois acreditava-se que apresentaria menores riscos para a saúde do neonato. Entretanto, o modelo alimentar adotado comprometia o estado nutricional dos infantes, devido principalmente a utilização de utensílios inadequadamente higienizados que, em conjunto com as condições sanitárias da época, resultava em infecções e óbito infantil (ALMEIDA, 2000).

Já no final do século XIX e início do XX, a industrialização, a urbanização e o trabalho externo da mulher, contribuíram com a queda acentuada da amamentação, com graves repercussões na saúde dos lactentes (LO e

KLEINMAN, 1996). Paralelamente, pesquisadores da área de saúde enfrentavam o grande desafio de adequar a nutrição de crianças dentro do novo estilo de vida, valores culturais e do papel social da mãe no mercado de trabalho (GREINER, 1998).

Os avanços científicos com a descoberta da pasteurização por Louis Pasteur deram nova visão sobre a utilização de leite de animais na dieta infantil. Com a pasteurização e refrigeração deste produto, o nível de contaminação bacteriana diminuiu, assim como a incidência de diarréias em neonatos causada por micro-organismos pertencentes principalmente ao grupo dos coliformes (SILVA, 1990; GREINER, 1998; ALMEIDA, 2000).

Porém, o elevado valor protéico do leite de vacas que os profissionais de saúde acreditavam ser benéfico ao neonato representava, na verdade, uma desvantagem na nutrição do lactente, devido a capacidade parcial do metabolismo protéico hepático pelos recém-nascidos, além de dificultar o processo de digestão e esvaziamento gástrico. Verificou-se também, que algumas crianças desenvolviam cólicas e alergias à beta-lactoglobulina, uma proteína presente no leite de vacas (SHANLER, 1995).

De acordo com Brandão et al. (2003), o aumento do uso de fórmulas contendo leite bovino e o desmame precoce de infantes, têm sido os principais responsáveis pelo aumento da incidência de intolerância à proteínas do leite de vaca, pois os neonatos possuem sistema imunológico imaturo e dependem muito dos anticorpos maternos. Assim, os quadros alérgicos ao leite bovino geralmente ocorrem devido à introdução precoce deste alimento - antes do seis meses de idade - na dieta infantil.

Desta forma, mesmo com todos os avanços tecnológicos, a expansão da indústria alimentícia e a criação de novas fórmulas como o leite em pó, não foi possível desenvolver um produto com tal excelência nutricional, capaz de substituir o leite materno humano e fornecer todos os nutrientes necessários para o correto desenvolvimento de lactentes (MARTINS, 1983; GREINER, 1998).

Atualmente, sabe-se que quando não for possível utilizar o leite da própria mãe ou de Bancos de Leite Humanos, preconiza-se a utilização de fórmula láctea infantil e somente após os seis primeiros meses de vida, recomenda-se o incentivo gradual da ingestão de leite bovino e seus derivados (iogurtes,

queijos) visando adequado aporte de cálcio, juntamente com outros alimentos como frutas, verduras e legumes (OPAS, 2003; WEFFORT, et al., 2006).

A OPAS tem incentivado continuamente a prática do aleitamento materno. Entretanto, apesar da superioridade nutricional deste alimento ser reconhecida mundialmente, a ocorrência de doenças infecciosas como a mastite puerperal infecciosa, produção de leite insuficiente pela mãe e a introdução de líquidos e/ou alimentos complementares na dieta de neonatos, somados a falta de orientação adequada sobre a nutrição infantil, são apontados como os principais motivos de desmame precoce (WHO, 2000; WEFFORT, et al., 2006; ANVISA, 2007), que constitui grave risco de infecção em recém nascidos. Desta forma, surgiu a necessidade de implementação de um sistema que auxilie a nutrição de crianças recém-nascidas que necessitam do leite materno (OPAS, 2003; ANVISA, 2007).

2.1.1 Bancos de Leite Humano (BLH)

Com o aumento da oferta de emprego às mulheres e problemas com a falta de leite humano (LH) foram criados os lactários humanos, denominados atualmente Bancos de Leite Humano - BLH (ALMEIDA, 2000).

O primeiro lactário humano foi criado na Áustria em 1900 na cidade de Viena. Dez anos depois, foi criado nos EUA o segundo BLH em Boston (VINAGRE, et al., 2001). No Brasil, o primeiro BLH foi inaugurado em 1943, no Instituto Fernandes Figueira (IFF) pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), criado com os objetivos de colher e distribuir o leite humano ordenhado - LHO (ANVISA, 2007).

Na década de 80, após a implantação do Programa Nacional de Incentivo ao Aleitamento Materno (PNIAM), a FIOCRUZ e o Ministério da Saúde (MS) desenvolveram um subprograma com a finalidade de promover a expansão dos BLHs no Brasil. Estes esforços, somados ao PNIAM e a FIOCRUZ, culminaram na promulgação da legislação brasileira que regulamenta a implantação e o funcionamento dos BLHs (Portaria 322/88), além do desenvolvimento do Programa Nacional de Apoio Técnico a estas unidades, tornando o Brasil o primeiro país a possuir tal instrumento legal. O pioneirismo da política de aleitamento materno no Brasil culminou na constituição da maior rede de BLHs do mundo, composta por 187 unidades cadastradas que funcionam segundo as

normas do Programa Nacional de Qualidade em Bancos de Leite Humano, permitindo ações padronizadas e uniformes, pautadas em conhecimento técnico-científico (ANVISA, 2007; FIOCRUZ, 2011).

2.1.1.1 Qualidade do leite fornecido pelos BLH

A composição do LH varia no decorrer do ciclo da lactação. O leite humano se caracteriza como produto biológico lábil, de composição complexa. A colheita e conservação do produto precisam ser rigorosamente controladas para a manutenção da qualidade (NOVAK e ALMEIDA, 2002) que é mensurada, fundamentalmente, sob os aspectos nutricional, imunológico, físico-químico e microbiológico. Dentre os fatores que afetam a qualidade, a determinação da acidez titulável expressa em graus Dornic (^{o}D) e o crematócrito (método analítico), têm sido utilizadas para verificar o aporte calórico-energético do leite humano ordenhado (LHO).

A avaliação da acidez em graus dornic e o crematócrito são técnicas obrigatórias que servem como parâmetro classificatório nos BLH, visando garantir a manutenção das propriedades físico-químicas do leite cru, representando importante parâmetro para a seleção do produto antes da pasteurização. Embora os valores considerados aceitáveis oscilem entre 1,0 e 8,0^{o}D, a biodisponibilidade de cálcio e fósforo e a osmolaridade do produto variam de forma inversa à acidez (GALHARDO et al., 2002, RNBLH, 2006).

O perfil microbiológico do LHO é assunto de grande interesse no contexto de saúde pública, visto que o leite é suscetível à veiculação de patógenos, particularmente para crianças com baixa resistência, notadamente mais vulneráveis às infecções neonatais.

Para o controle de qualidade microbiológica do LHO, a Rede Nacional de Bancos de Leite Humano (RNBLH) do Brasil segue a lógica preconizada para alimentos, que consiste na utilização de micro-organismos indicadores de qualidade sanitária. Com efeito, o grupo dos coliformes é considerado um dos principais indicadores de contaminação microbiana, visto que são patógenos de isolamento relativamente simples, a partir de métodos padronizados e de fácil execução, economicamente viáveis e seguros (NOVAK e ALMEIDA, 2002; RNBLH, 2006).

O LHO cru, colhido e aprovado pelo Controle de Qualidade, deve ser pasteurizado em banho-maria, mantido a 62,5^{o}C por 30 minutos após o tempo de pré-aquecimento, visando a inativação de 100% dos micro-organismos patogênicos passíveis de contaminação primária ou secundária, além de 99,99% da microbiota saprófita ou normal (RNBLH, 2006; ANVISA, 2007).

No entanto, a presença de micro-organismos no LHO está intimamente relacionada às técnicas inadequadas de colheita, higiene precária da doadora e utensílios, manutenção do leite em condições e temperatura inadequadas, além da ocorrência de processo infeccioso glandular mamário na lactante (NOVAK e ALMEIDA, 2002; RNBLH, 2006). Contudo, torna-se indispensável o controle e melhorias nas condições de coleta e estocagem do LHO pelos profissionais de saúde envolvidos, visando diminuir a carga microbiana no leite, garantindo a inocuidade e qualidade nutricional do leite materno.

2.1.2 Mastite puerperal em mulheres e resistência microbiana

A inflamação da glândula mamária na mulher, conhecida como mastite puerperal, tem origem predominatemente infecciosa. Acomete cerca de 2% a 6% das lactantes, geralmente na segunda ou terceira semana do puerpério, embora possa ocorrer em qualquer fase da lactação. A infecção mamária se caracteriza por apresentar inflamação local, hiperemia, dor, e/ou sinais sistêmicos como febre, mal-estar, calafrios e prostração, podendo evoluir para formas graves com formação de abscessos e septicemia (WHO, 2000). Estudo prospectivo com 946 mulheres norte-americanas revelou que 9,5% apresentaram pelo menos um episódio de mastite nos três primeiros meses pós-parto (FOXMAN et al., 2002).

Dentre os micro-organismos isolados do leite humano, *S. aureus* são responsáveis por cerca de 50% a 60% dos casos de mastite (LAWRENCE e LAWRENCE, 2007). As enterobactérias são isoladas com menor frequência (SALES et al., 2000). Entretanto, a determinação dos coliformes é um dos principais parâmetros recomendados no controle da qualidade microbiológica do BLH, pois sua presença indica contaminação direta, ou indireta, de origem fecal, refletindo baixo nível de higiene pessoal e condições sanitárias precárias (NOVAK e ALMEIDA, 2002; RNBLH, 2006). Sales et al. (2000) ao estudarem a ocorrência de mastite puerperal em 59 mulheres que apresentavam abscessos

mamários obtiveram isolamento de *S. aureus* (55%), *Staphylococcus epidermidis* (15%), *Staphylococcus* spp. (7%), *Escherichia coli* (4%), *Klebsiella* spp. (2%) e *Enterobacter* spp. (2%). Arias-Camison (2003) descreveu infecção por *Streptococcus agalactiae* em criança recém-nascida, adquirida a partir do leite materno oferecido por sua mãe, que apresentava eritema da mama esquerda oito dias após o parto.

Os antimicrobianos geralmente indicados no tratamento da mastite puerperal, ou utilizados na profilaxia pós-parto e em casos de cesariana pertencem ao grupo das penicilinas e cefalosporinas de primeira e segunda geração, como a cefoxitina. Estes fármacos são considerados seguros durante a lactação, pela reduzida quantidade de resíduos excretados no leite, devido a elevada taxa de ligação com as proteínas plasmáticas maternas (COSTA et al., 1998; NOVAK et al., 2001; LAWRENCE e LAWRENCE, 2007). A utilização de vancomicina é restrita as pacientes alérgicas a penicilina, ou cuja cultura microbiana do leite revele linhagens resistentes a eritromicina e/ou a clindamicina (SUS, 2011).

A veiculação de micro-organismos potencialmente patogênicos pelo LHO, e multirresistentes aos antimicrobianos, é fator preocupante no controle sanitário dos produtos oferecidos nos bancos de leite (NOVAK et al. 2001). A qualidade do leite fornecido pelos BLH tem despertado a atenção de diversos pesquisadores que buscam avaliar o perfil microbiano do produto, bem como a resistência de micro-organismos frente aos principais fármacos utilizados na medicina, com o intuito de reforçar a importância do controle de agentes potencialmente patogênicos, e melhorar o controle da colheita e armazenamento deste alimento (NETO et al., 2001; NOVAK et al., 2001, 2002; SERAFINI et al., 2003; COSTA et al., 2004) .

A presença de resíduos de fármacos, especialmente antimicrobianos, no leite de lactantes também tem sido discutida por diversos segmentos profissionais da área de saúde (DEL CIAMPO e RICCO, 2006; DEL FIOL e MINALI, 2006; CHAVES et al., 2007), embora estudos com o intuito de verificar a presença de fármacos no LH sejam escassos.

De acordo com SCHIRM et al. (2004), 90% das lactantes utilizam algum tipo de medicamento durante os primeiros dias após o parto, seja por orientação médica ou por automedicação. Analgésicos, sedativos,

antimicrobianos e antialérgicos figuram entre os fármacos mais utilizados pelas nutrizes. Os antimicrobianos são os fármacos mais prescritos entre as mulheres no período puerperal nos EUA e Finlândia (MALM et al., 2003). Assim, devido a utilização dos antimicrobianos no tratamento de processos infecciosos, bem como na profilaxia de infecções no pré e pós-parto, recomenda-se optar por grupamentos de fármacos com menores efeitos colaterais e com baixa excreção no leite, com o intuito de preservar a saúde do lactente (OSTREA, 2004).

2.2. Qualidade do leite de vacas e cabras

Após os seis meses de idade o leite bovino é, seguramente, o alimento mais nobre e completo disponível aos humanos, especialmente nos primeiros anos de vida (ANVISA, 2007; OPAS, 2008).

O leite apresenta valor inestimável na dieta humana. Estima-se que um litro de leite por dia supre todas as necessidades protéicas de crianças com até seis anos de idade e mais de 50% do conteúdo de proteínas requisitado pelos adultos, além de ser excelente fonte de cálcio, suprindo 100% das necessidades diárias humanas (FONSECA e SANTOS, 2000).

No entanto, estudos apontam que cerca de 3 a 8% das crianças em todo o mundo apresentam sensibilidade alérgica às proteínas do leite de vacas (LAGUNA, 2010). Neste contexto, o leite caprino pode ser indicado como alimento alternativo, tanto para crianças como idosos, que possuam hipersensibilidade ao leite bovino, em virtude de seu elevado valor nutricional, fácil digestibilidade e, especialmente, por ser reconhecido como alimento hipo-alergênico (COSTA, 2002; LAGUNA, 2010).

O leite de cabra possui cor branca e apresenta sabor e odor próprios, porém agradáveis. Sua alta digestibilidade é consequência do reduzido tamanho e facilidade de dispersão dos glóbulos de ácidos graxos, e das características próprias de sua caseína. Forma coágulos de granulação fina e macia, consequentemente de fácil digestão (JARDIM, 1984).

Até recentemente, o leite de cabra só estava prontamente disponível em lojas de alimentos “saudáveis” (COSTA, 2011). No entanto, apesar do seu consumo estar geralmente associado à indicação de médicos e nutricionistas em virtude de suas propriedades hipoalergênicas, este produto deveria ser

mais consumido pela população em geral, em vista de seu elevado valor nutricional (Quadro 01) [GRZESIAK 1997].

Quadro 01: Composição média do leite humano, bovino e caprino.

Espécie / **Composição**	**VACA**	**MULHER**	**CABRA**
Calorias (Kcal/100mL)	70	69	73
Água (g/100mL)	88	88	86
Proteínas (g/100mL)	3.1	0.9	2.7
Caseínas (g/100mL)			
Alfa S1	1	Traços	0 à 0.7
Alfa S2	0.37	---	0.4
Beta	1	0.3	1
Kappa	0.35	0.1	0.6
Proteínas Solúveis (g/100mL)			
Alfa-lactoalbumina	0.12 à 0.17	0.6	0.12 à 0.2
Beta-lactoglobulina	0.3	Ausente	0.23
Serium Albumina	0.04	0.04	---
Imunoglobulinas	0.07	0.14	0.05

Fonte: Adaptado de Grzesiak (1997).

Atualmente o leite de cabra vem conquistando cada vez mais o mercado consumidor. Cerca de 93-95% da produção é destinada ao consumo sob a forma de leite fluído, enquanto seus derivados (queijo e iogurte) representam pequena porcentagem do consumo total (COSTA, 2011).

Porém, para que o leite de origem animal cumpra seu papel nutricional, sem riscos ao consumidor, é necessário que este produto apresente baixa celularidade, ausência de patógenos e/ou substâncias químicas, como

resíduos de antimicrobianos e pesticidas (ALVES, 2001; BRASIL, 2002). O leite de qualidade é oriundo de animais sadios e bem alimentados, que mantém suas qualidades nutritivas e organolépticas durante todas as etapas de sua obtenção, sem apresentar riscos a saúde do consumidor (BRASIL, 2002) .

A determinação da acidez do leite é amplamente utilizada pela indústria leiteira como indicador de qualidade do produto no controle da produção de queijos e iogurtes. A acidez (^{o}D) é utilizada como indicador do estado de conservação do leite, no que tange a relação entre disponibilidade de lactose e produção de ácido láctico por ação microbiana, que acarreta aumento na acidez e diminuição no teor de lactose (BRASIL, 2002).

As bactérias láticas geralmente são responsáveis pela acidificação do leite, devido a transformação da lactose em ácido lático. Além de bactérias láticas - como *Streptococcus lactis* que se multiplica em temperatura ambiente - são reconhecidos outros grupos de micro-organismos que também podem produzir a acidificação do leite, como os coliformes, enterococos, estafilococos e micrococos (VEISSEYRE, 1988; OLIVEIRA e NUNES, 2003).

A qualidade da composição do leite *in natura* é influenciada por diferentes variáveis como fatores genéticos, raça, idade, nutrição, estágio da lactação, variações climáticas e presença de agentes infecciosos na glândula mamária que, por sua vez, levam a alterações significativas na concentração de gordura, lactose e caseína (BRITO, 2009).

A presença de micro-organismos no leite, determinada pela infecção da glândula mamária de animais, é uma das principais causas que exerce influencia prejudicial na composição e nas características físico-químicas do leite (BRASIL, 2000/2002). Além disso, a presença destes patógenos no leite e derivados lácteos podem gerar graves riscos à saúde do consumidor, devido a possibilidade de veiculação de micro-organismos multirresistentes e com capacidade de produção de toxinas (SILVA et al., 2005; RAPINI et al., 2005; MARIANO et al., 2007; GARINO JR., et al., 2011).

2.2.1 Mastite em animais de produção e resistência microbiana

A mastite, definida como a inflamação da glândula mamária, é a principal afecção que acomete rebanhos leiteiros. Acarreta grande impacto econômico mundial devido aos prejuízos decorrentes de alterações na composição físico-

química e celularidade do leite, queda na produção, descarte precoce de fêmeas, gastos com medicamentos e honorários veterinários, morte ocasional de animais, aliados aos reflexos da doença no contexto de saúde pública (LANGONI, 1999; RADOSTITS et al., 2007).

A inflamação da glândula mamária possui etiologia complexa, podendo resultar em processos traumáticos, fisiológicos, alérgicos e, principalmente, infecciosos. A mastite infecciosa é causada predominantemente por agentes de origem bacteriana e, secundariamente, por fungos, algas, micoplasmas e vírus, podendo manifestar-se sob as formas aguda, subaguda ou crônica. Epidemiologicamente é classificada em contagiosa ou ambiental, de acordo com as fontes de infecção e vias de transmissão (QUINN et al., 2005; RADOSTITS et al., 2007).

Staphylococcus spp., *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasma* spp. são os principais agentes envolvidos na gênese das mastites contagiosas, enquanto o grupo dos coliformes, representados por *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp., juntamente com *Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, fungos, leveduras, actinomicetos e algas do gênero *Prototheca*, figuram entre os principais micro-organismos envolvidos em casos de mastite ambiental em animais de produção (QUINN et al., 2005; RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO, 2008).

No entanto, embora mais de 100 espécies tenham sido descritas em processos infecciosos da glândula mamária de animais, o gênero *Staphylococcus* é considerado o principal agente causal de mastite bovina (ANDRADE et al., 1998; FERREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011) e caprina (SCHMIDT et al., 2009; NEVES et al., 2010, GARINO JR. et al., 2011).

A elevada ocorrência de mastite resulta no uso frequente de antimicrobianos no tratamento dos animais, por vezes, de maneira indiscriminada, contribuindo para o aumento da pressão seletiva de micro-organismos resistentes aos principais fármacos utilizados por via intramamária e/ou parenteral, além de possibilitar a presença de resíduos destes antimicrobianos no leite e derivados lácteos, que podem gerar agravos ao consumidor (NASCIMENTO et al. 2001).

Na indústria de laticínios, a presença de antimicrobianos no leite interfere diretamente nas características organolépticas e tecnológicas dos produtos lácteos industrializados, principalmente no processamento de iogurte e queijos, devido à inibição de micro-organismos necessários para a realização da fermentação destes derivados (ALBUQUERQUE et al., 1996; NUNES e D'ANGELINO, 2007). Deve-se ressaltar que a pasteurização, fervura e esterilização do leite não eliminam os resíduos de antimicrobianos, se constituindo, portanto, em fator de risco ao consumidor (MEDEIROS et al.,1999).

Em 2001 foi promulgada a Instrução Normativa 51 (IN 51), pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil - MAPA, visando regulamentar e adequar as prerrogativas de produção, manipulação, estoque e transporte do leite e derivados de origem animal, com vistas a assegurar a qualidade do produto para o consumidor final (BRASIL, 2002). Com a deflagração da IN-51, foi intensificada a fiscalização da presença de resíduos de antimicrobianos em laticínios e cooperativas, sob pena de descarte do leite com antimicrobianos.

A pesquisa de resíduos de antimicrobianos em leite pode ser realizada por diferentes métodos, incluindo técnicas imunológicas, receptores enzimáticos e pela inibição de multiplicação bacteriana, dos quais este último, amplamente utilizado devido a sua praticidade (MITCHELL et al., 1998, FONSECA e SANTOS, 2000; ALMEIDA et al., 2003).

Com a implantação da normativa 51, além da ampliação dos estudos focando a presença de linhagens multirresistentes aos principais fármacos utilizados na bovinocultura (SOUZA et al., 2008; SILVA et al., 2008) e caprinocultura leiteira (LANGONI et al., 2006; SCHMIDT et al., 2009, NEVES et al., 2010; GARINO JR., 2011), outras pesquisas foram conduzidas com o intuito de monitorar a presença de resíduos de antimicrobianos principalmente no leite e subprodutos de origem bovina (NASCIMENTO et al., 2001; ALMEIDA et al., 2003; MENDES et al., 2008) e caprina (SANTOS, 2005; NARDELLI et al., 2006; ARAÚJO, 2008; WASIKSIRI, 2010).

Deve-se ressaltar que a ingestão de leite e derivados contendo resíduos de antimicrobianos pode levar ao aumento da pressão seletiva para linhagens bacterianas resistentes, além de desencadear reações de hipersensibilidade,

de toxicidade, efeitos carcinogênicos, teratogênicos e desequilíbrio da microbiota intestinal, especialmente em neonatos e crianças (NASCIMENTO et al., 2001; DEL CIAMPO e RICCO, 2006).

Ademais, a maioria dos estudos com mastite bovina e caprina no Brasil tem enfocado animais com mastite clínica ou subclínica. No entanto, pouca atenção tem sido dispendida com os animais portadores no rebanho, particularmente de bactérias multirresistentes e potencialmente toxigênicas, como as pertencentes ao gênero *Staphylococcus.* Os animais portadores são identificados somente pelo cultivo microbiano do leite. Este fato certamente é limitante no controle e profilaxia da infecção mamária por estes micro-organismos no plantel, além dos reflexos inerentes à saúde pública (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; COSTA et al., 2005).

2.3 Gênero *Staphylococcus*

Staphylococcus spp. são micro-organismos esféricos, anaeróbios facultativos, catalase-positivos (exceto *S. aureus* subsp. *anaerobius* e *S. saccharolyticus* que são anaeróbios e catalase-negativos), imóveis, oxidase-negativos, não formadores de esporos. Quando cultivados em ágar acrescido de sangue ovino ou bovino (5%) desfibrinado, geralmente em condições de aerobiose, à 37^{o}C, após 24 horas de incubação revelam colônias de tonalidade branca a amarela intensa, com 1 a 2 mm de diâmetro, podendo ou não apresentar hemólise. As características morfo-tintoriais quando corados pela técnica de Gram revelam cocos agrupados, Gram-positivos, com 0,5 a 1µm de diâmetro (QUINN et al., 2005; WINN JR., et al, 2008).

Estas bactérias apresentam distribuição cosmopolita e geralmente são comensais da pele e mucosas do trato respiratório e urogenital. Transitoriamente encontram-se no trato digestório de humanos e de diversas espécies animais podendo atuar como patógenos oportunistas (QUINN et al., 2005; WINN JR. et al., 2008). Os estafilococos também podem ser encontrados na água, no solo, equipamentos e utensílios mal higienizados devido a sua viabilidade ambiental (ALMEIDA et al., 1998).

Determinadas espécies de estafilococos são altamente específicas estabelecendo infecções em humanos ou em animais. No entanto, espécies que geralmente não acometem humanos podem colonizá-los ou infectá-los

devido ao estreito contato com os animais. Desta forma, médicos veterinários, tratadores e criadores são suscetíveis às infecções por estirpes de estafilococos específicas de animais (WINN JR. et al, 2008).

Staphylococcus spp. são isolados a temperaturas que podem variar entre 10 e 48^{o}C (com temperatura ótima entre 35 a 37^{o}C). Toleram ampla variação de pH (entre 4 e 9,8) e multiplicam-se em meios contendo 10% a 15% de NaCl (FRANZIER e WESTHOFF, 2000). Estas características possibilitam a manutenção e multiplicação do micro-organismo em grande variedade de alimentos que requerem manipulação durante o processamento, bem como leite e seus derivados (LE LOIR et al., 2003).

Atualmente são reconhecidas 43 espécies e 24 subespécies do gênero *Staphylococcus,* que podem ser encontradas em amostras clínicas humanas e animais atuando como agente de diversas afecções (EUZÉBY, 2011). As linhagens de *Staphylococcus* spp. são divididas em duas categorias: coagulase positivos (ECP) e negativos (ECN) [WINN JR et al., 2008]. Entre as espécies coagulase positivas e negativas, *S. aureus* e *S. epidermidis* destacam-se, respectivamente, como os principais agentes envolvidos em infecções humanas e animais.

A identificação fenotípica das estirpes de *Staphylococcus* spp. baseia-se em características das colônias, presença ou não de hemólise, ausência de isolamento em ágar MacConkey, produção de catalase, coagulase e utilização de certos substratos, classificados a partir de provas bioquímicas (QUINN et al., 2005; WINN JR., et al., 2008).

2.3.1 Mastite estafilocócica e resistência a meticilina

A mastite estafilocócica foi descrita primeiramente em 1887 por Edmund Nocard, que isolou o agente da glândula mamária de ovinos. Subsequentemente, Guillebeau sugeriu que este micro-organismo também fosse responsável por infecções mamárias em vacas (SOUZA E BARRETO, 2000).

O isolamento de *Staphylococcus* spp. a partir de leite humano tem sido observado desde a década de 70, quando Welsh e May (1979) descreveram a bactéria em 24% de amostras de leite obtidas de mães saudáveis.

S. aureus são micro-organismos mundialmente isolados de casos de mastite contagiosa em animais leiteiros, com alta capacidade de penetração no tecido glandular mamário, de difícil resolução terapêutica devido à persistência no interior de fagócitos e com elevada resistência aos antimicrobianos convencionais (QUINN et al., 2005).

ECN são reconhecidos como micro-organismos contagiosos oportunistas, presentes na microbiota de pele, conjuntivas e mucosas dos animais (QUINN et al., 2005; RADOSTITS et al., 2007). Estudos epidemiológicos em âmbito nacional e internacional têm demonstrado a presença do gênero *Staphylococcus* em aproximadamente 50% dos casos de infecções da glândula mamária de bovinos (BRABES et al., 1999), considerado um dos principais patógenos causadores de mastite em animais de produção (QUINN et al., 2005; RADOSTITS et al., 2007) e também de grande frequência em quadros clínicos de mastite puerperal em mulheres (LAWRENCE e LAWRENCE, 2007). Dentre os ECN, *S. epidermidis* é o micro-organismo mais comumente isolado em processos infecciosos (ARCHER e CLIMO, 1994).

Staphylococcus spp. multirresistentes, especialmente aos beta-lactâmicos, tem sido reiteradamente reportados em diversos estudos em humanos e animais (NOVAK et al., 2001; COELHO et al., 2007; GARINO JR. et al., 2011).

Nas décadas de 50 e 60, *S. aureus* destacou-se como a mais importante espécie bacteriana envolvida em casos de infecção hospitalar, principalmente devido a sua elevada resistência frente à penicilina. Em 1961, foi lançado novo antimicrobiano denominado meticilina. No entanto, poucas semanas após foi isolada a primeira estirpe de *S. aureus* resistente a este fármaco, denominada "Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*" – MRSA (JEVONS, 1961; WINN JR. et al., 2008).

Após quase 30 anos, linhagens de MRSA foram identificados em graves surtos hospitalares em pacientes internados em unidades neonatais (MOREL et al., 2002). E, em dias atuais, estes micro-organismos ainda são considerados de grande importância clínico-hospitalar (PINHEIRO, 2008; WINN JR. et al., 2008).

Atualmente, são conhecidos dois principais mecanismos pelos quais pode ocorrer resistência bacteriana aos antimicrobianos beta-lactâmicos. O primeiro

é atribuído à alteração das proteínas de membranas que estão envolvidas na biossíntese da parede celular, denominadas PBP ("Protein bilding penicillins"), alvo de ação do fármaco. O segundo mecanismo é devido a produção de enzimas inativadoras, conhecidas como beta-lactamases (HARBATH, 1998).

As linhagens MRSA apresentam um gene denominado *mecA* que codifica uma nova proteína alvo para penicilina, denominada PBP2a ou PBP2'. Essa proteína possui baixa afinidade à oxacilina, meticilina e outros antimicrobianos beta-lactâmicos. Desta forma, uma vez que as PBPs são inativadas por algum antimicrobiano beta-lactâmico, a PBP2a continua ativa, permitindo a multiplicação bacteriana (MANDELL et al., 2005; WINN JR, 2008).

O gene *mecA*, que confere resistência a meticilina, é carreado em um elemento genético móvel denominado "Staphylococcal Cassette Chromosome" (SCC*mec*), podendo ser transmitido a outras espécies de estafilococos conhecidas atualmente como MRS (JUNQUEIRA, 2002; MANDELL et al., 2005; MARTINS e CUNHA, 2007).

Linhagens do gênero *Staphylococcus* resistentes à meticilina e oxacilina - fármacos anteriormente eficazes no tratamento de infecções estafilocócicas -, têm sido motivo de preocupação crescente dos profissionais de saúde (COELHO et al., 2007). Isolados MRSA já foram reportados em leite materno, em casos de mastite puerperal em mulheres (REDDY et al., 2007, PINHEIRO, 2008) e septicemia com óbito de criança recém-nascida, evidenciando o risco da mãe como portadora e transmissora destas linhagens patogênicas aos neonatos (LACOUNTY, 2004).

Além da presença de MRS em isolados humanos, sadios ou enfermos, outros estudos têm investigado a ocorrência destas linhagens em animais de companhia (BEMIS et al., 2006; WEESE et al., 2006) e de produção, bem como em seus produtos e subprodutos, alertando para a possibilidade de transmissão destes patógenos entre animais e humanos (LEE, 2003; KITAI et al., 2005; VAN LOO et al., 2007; MORGAN, 2008).

Linhagens MRS também têm sido investigadas em leite e queijo bovino e caprino devido a preocupação dos pesquisadores com a transmissão deste patógeno por estes derivados lácteos destinados ao consumo humano (CORRENTE et al., 2007; JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al., 2007; STATSKOVA et al., 2009; FEβLER et al., 2010).

Contudo, são necessários estudos continuados visando detectar linhagens de *Staphylococcus* spp., incluindo ECN, com potencial toxigênico, e/ou multirresistentes aos antimicrobianos, presentes no leite humano e de animais de produção, bem como em seus derivados. Salienta-se também a importância de boas práticas na obtenção do leite materno nos BLHs e na ordenha higiênica de animais, particularmente no tocante a adoção de ações de controle dos micro-organismos contagiosos, tendo em vista que o gênero *Staphylococcus* é um dos principais patógenos relacionados às infecções hospitalares neonatais, de mastite em humanos e em animais de produção.

2.3.2 Marcadores de virulência e produção de toxinas pelo gênero *Staphylococcus*

Características estruturais bacterianas como cápsula polissacarídica, ácido teicóico e proteína A, hemolisinas, produção de diversas exoenzimas, biofilme e toxinas, aliado a presença dos superantígenos, figuram entre os mecanismos de patogenicidade que conferem elevada virulência às linhagens de *Staphylococcus* spp., particularmente nas estirpes de *S. aureus* (QUINN, et al., 2005; WINN JR. et al., 2008).

A toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e as enterotoxinas estafilocócicas (SE) são conhecidas como superantígenos tóxicos pirogênicos (WINN JR. et al., 2008).

A TSST-1 induz a produção excessiva de linfocinas que promovem lesão tecidual. A detecção de linhagens de *Staphylococcus* spp. isolados de leite humano contendo o gene codificador desta toxina foi verificada em vários estudos (PEREIRA et al., 1995), bem como em linhagens isoladas de leite bovino, ovino e caprino (CARDOSO et al., 2000; SCHERRER et al., 2004; KARAHAN et al., 2009). Embora nos animais a importância da TSST-1 ainda não esteja bem esclarecida (WINN JR. et al., 2008), em humanos esta toxina causa doença caracterizada por processo agudo, cujos principais sinais clínicos são febre, hipotensão, congestão em vários órgãos e choque letal (BERGDOLL e CHESNEY, 1991).

Além da TSST-1, atualmente são conhecidos 23 tipos de enterotoxinas estafilocócicas (SE) e enterotoxinas-like (SE-like), juntamente com seus genes (*se*) correspondentes (OMOE et al., 2004; EUZÉBY, 2011). Os tipos A (*sea*), B

(*seb*), C_{1-3} (*sec*), D (*sed*) e E (*see*), representam as toxinas estafilocócicas clássicas, que possuem atividade emética e geralmente encontram-se associadas a surtos de intoxicação alimentar (OMOE et al., 2004).

As enterotoxinas que não possuem atividade emética, são denominadas enterotoxina estafilocócica semelhante à superantígenos, ou enterotoxina-like (SEl) [LINA et al., 2004]. Exceto SEIG (*seg*), SEIH (*seh*) e SEII (*sei*), que já demonstraram atividade emética (MUNSON et al., 1998; LE LOIR, et al., 2003).

As demais SE-like são SEIJ (*sej*) [DINGES et al., 2000; CARMO et al., 2002], SEIK (*sek*) [ORWIN et al., 2001], SEIL (*sel*) [ORWIN et al., 2003], SEIM (*sem*), SEIN (*sen*), SEIO (*seo*) [LE LOIR et al.,2003], SEIP (*sep*), SEIQ (*seq*), SEIR (*ser*) [OMOE et al., 2003], SEIS (*ses*), SeIT (*set*) [ONO et al., 2008], SEIU (*seu*) [LETERTRE, et al., 2003] e SeIV (*sev*) [THOMAS et al., 2006] descritos recentemente. O envolvimento destas SE-like em surtos alimentares ainda não está bem esclarecido.

A intoxicação alimentar por estafilococos resulta geralmente da ingestão de alimento contaminado por enterotoxinas pré-formadas, com capacidade emética e termorresistentes. O alimento geralmente é contaminado com linhagens de *Staphylococcus* spp. devido a manipulação não higiênica, com subsequente multiplicação microbiana e produção de toxinas (WINN JR et al., 2008).

No entanto, tem-se revelado a ocorrência de outras espécies toxigênicas coagulase positivas, como *S. intermedius* e *S. hyicus* (VALLE et al., 1990; LAMAITA et al., 2005), bem como estirpes de ECN produtoras de enterotoxinas, alertando para a importância de outros estafilococos em toxinfecções alimentares (CUNHA et al., 2006).

Estudos verificaram que cerca de 100ng a 1 µg da toxina pura são suficientes para desencadear a doença em indivíduos suscetíveis (BERGDOLL, 1995). Considerado como o principal agente de intoxicação alimentar de origem bacteriana em humanos, as intoxicações por linhagens de *S. aureus* podem causar cefaléia, náuseas, vômitos, dor abdominal, diarréia e sudorese. As manifestações clínicas perduram por um a dois dias, podendo ser autolimitantes ou evoluírem para quadros severos. O período de incubação varia entre 1 a 6 horas (com média de quatro horas) após a ingestão do

alimento contaminado (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; NADER FILHO et al., 2007b; WINN JR. et al., 2008).

O início dos sinais depende da suscetibilidade, higidez e peso do indivíduo, além da quantidade de toxina presente no alimento (BAIRD-PAKER, 1990). Desta forma, crianças, idosos e indivíduos imunossuprimidos são mais suscetíveis às manifestações clínicas severas das toxinfecções estafilocócicas (CLIVER, 1994).

Estima-se que aproximadamente 95% das intoxicações alimentares estafilocócicas são determinadas pelas SE dos tipos A, B, C, D e E (CREMONESI et al., 2005). No entanto, outros tipos de toxinas já foram relatados na França (ROSEC e GUIRAUD, 2002), Japão (OMOE et al., 2002) e Inglaterra (MCLAUCHLIN et al., 2000) como responsáveis por toxinfecções alimentares.

A presença de linhagens de ECP e ECN com genes para produção de enterotoxinas já foram descritas em linhagens obtidas do leite de mulheres sadias e com mastite (ADEKEYE e ADESIYUN, 1984; PEREIRA et al., 1995; NOVAK et al., 2000; CARNEIRO et al., 2004), bem como em isolados de leite bovino (GARCIA et al., 1980; CARDOSO et al., 2000; BLAIOTTA et al., 2004; LUZ, 2008; KARAHAN et al., 2009) e caprino (SCHERRER et al., 2004, SILVA et al., 2005; MARIANO et al., 2007).

Em 1914, foram observadas pela primeira vez evidências de intoxicação alimentar estafilocócica após voluntários consumirem leite de vaca com mastite por *Staphylococcus* spp. (ANDERSON, 1989). A partir de então, o gênero *Staphylococcus*, especialmente *S. aureus,* assumiu grande preocupação pelos profissionais de saúde em virtude dos riscos de veiculação de toxinas para os humanos pelo consumo de leite e derivados, relacionados a graves toxinfecções alimentares (PEREIRA et al., 1995; LANGONI, 1999; WHITE e HINCKLEY, 1999; SALES et al., 2000; SILVA et al., 2004; RADOSTITS et al., 2007; RIBEIRO et al., 2007).

Com efeito, a ocorrência de linhagens toxigênicas do gênero *Staphylococcus* é considerada problema emergente em saúde pública, especialmente em estirpes isoladas de alimentos como o leite e deivados (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; RAPINI et al., 2005; COELHO et al., 2007).

Neste contexto, o presente estudo objetivou investigar o perfil microbiano, as características físico químicas, a presença de resíduos de antimicrobianos e/ou inibidores da multiplicação microbiana e a ocorrência de multirresistência dos isolados, bem como verificar a presença de linhagens de ECP e ECN toxigênicas (detecção de genes e produção de toxinas) obtidas de leite humano proveniente do Banco de Leite Humano do Hospital das Clínicas de Botucatu, SP, e de leite bovino e caprino provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar a qualidade microbiológica, as características físico-químicas e a presença de resíduos de antimicrobianos em leite humano, bovino e caprino, bem como determinar a multirresistência bacteriana aos antimicrobianos e detectar linhagens toxigênicas de estafilococos coagulase positivos e negativos.

3.2. Específicos

- Verificar as características físico-químicas (acidez e crematócrito) das amostras provenientes do Banco de Leite Humano;
- Avaliar a acidez titulada em graus dornic (^{o}D) de amostras de leite de vacas e cabras, com e sem mastite, provenientes de propriedades rurais do interior do estado de São Paulo;
- Determinar a ocorrência dos principais patógenos em leite provenientes do Banco de Leite Humano e leite de origem bovina e caprina;
- Detectar a presença de vacas e cabras sem mastite clínica ou subclínica, portadoras de micro-organismos patogênicos no leite;
- Investigar o perfil de sensibilidade “in vitro” das linhagens isoladas das amostras de leite frente aos antimicrobianos utilizados em humanos, bem como fármacos indicados no tratamento da mastite bovina e caprina, e a presença de isolados multirresistentes;
- Detectar a presença de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana no leite humano, bovino e caprino;
- Caracterizar fenotípica e genotipicamente as linhagens de *Staphylococcus* spp. meticilina resistentes;
- Investigar a ocorrência de linhagens de *Staphylococcus* spp. toxigênicos (detecção de gene e produção das enterotoxinas A, B, C, D e toxina 1 da síndrome do choque tóxico - TSST-1), isoladas de amostras de leite de doadoras do BLH e de leite bovino e caprino, com e sem mastite, utilizando métodos fenotípicos e genotípicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais de colheita de leite

4.1.1 Banco de Leite Humano

Em outubro de 2001, foi fundado o BLH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista (HC-FM/UNESP), câmpus de Botucatu, SP, com o objetivo de atender a demanda de leite materno do município de Botucatu e região, utilizado nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) Neonatal, de Cuidados Intermediários (UCI) Neonatal e do Alojamento Conjunto. O BLH do HC-FM/UNESP segue as normas da rede dos BLH do Brasil (RNBLH, 2006), visando garantir a qualidade do produto fornecido aos recém-nascidos.

Após a colheita, o leite humano ordenhado (LHO) é submetido a exames microbiológicos e físico-químicos e, em seguida, pasteurizado e estocado em temperaturas entre -21ºC e -10ºC, com validade por até seis meses. O BLH do HC-FM/UNESP-Botucatu conta atualmente com 60 doadoras mensais, das quais aproximadamente metade é representada por novas doadoras e as demais fixas, realizando 1000 atendimentos de colheita individuais e 700 visitas domiciliares anuais, atendendo cerca de 500 crianças recém-nascidas ao ano.

4.1.2 Propriedades rurais

Os rebanhos de bovinos leiteiros amostrados no presente estudo foram provenientes de três criatórios de médio porte, com sistema de ordenha mecânica e manejo de ordenha similar, com histórico de mastite por micro-organismos contagiosos, situados no centro do estado de São Paulo, nos municípios de Areiópolis, Conchas e São Pedro.

As amostras de leite caprino foram provenientes de seis criatórios de cabras leiteiras de pequeno e médio porte, com sistema de ordenha mecânica ou manual, também situados no centro do estado de São Paulo, nos municípios de Botucatu, Ibiúna, Mogi das Cruzes, Pindamonhangaba, Guaratinguetá e Canas.

4.2 Colheita de leite

4.2.1 Leite humano

Após a antissepsia dos seios das lactantes foi realizado a colheita de leite total e initerrupta de uma ordenha. O leite de cada doadora foi acondicionado em recipientes de vidro, limpos e esterilizados, conforme preconizado pela RNBLH e, em seguida congelados a -20^{o}C.

Semanalmente, todas as amostras de leite materno colhidas ou encaminhadas ao BLH do HC-FM, UNESP/Botucatu, SP, são descongeladas em banho-maria a 40^{o}C, e uma alíquota de cada amostra (cerca de 8 mL) é acondicionada em recipiente esterilizado e encaminhada em caixas isotérmicas, sob temperatura de refrigeração (4-8^{o}C), ao Laboratório de Inspeção de Alimentos da FMVZ/Botucatu, SP, para a realização de análises físico-químicas (Figura 01).

A B

Figura 01. Amostras de leite do BLH, do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu, SP. **A:** colheita de amostras de leite com frascos esterilizados. **B:** descongelamento de amostras de leite humano em banho-maria a 40^{o}C. Botucatu, SP, 2011.

Foram colhidas mensalmente, de forma aleatória, cerca de 20 amostras de leite cru, provenientes de doadoras do BLH do HC-FM, UNESP/Botucatu, SP, perfazendo ao final do estudo, 240 amostras de leite de diferentes mulheres. O leite foi colhido oito a quinze dias após o parto (normal ou

cesariana) evitando-se o período de colostro. Foi mantido o sigilo completo das pacientes amostradas no estudo.

4.2.2. Leite bovino e caprino

Foram colhidas 200 amostras de leite de vacas com mastite (clínica ou subclínica) e 200 de vacas negativas na prova de Tamis e CMT.

Igual quantidade de amostras de leite foi colhida de cabras, com ou sem mastite, perfazendo a avaliação microbiana de 400 amostras de leite de vacas e 400 de leite de cabra. Todas as amostras foram colhidas no período médio de lactação, evitando-se as fases de colostro e secagem dos animais.

Após a antissepsia dos tetos com solução de álcool 70%, as amostras de leite foram colhidas e acondicionadas em tubos tipo Falcon, com fundo cônico, esterilizados e transportados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável (4-8ºC). Todas as amostras foram congeladas a -20^{o}C até o momento do processamento no Laboratório de Diagnóstico Microbiológico da FMVZ-UNESP/ Botucatu, SP, visando o cultivo microbiológico, avaliação físico-química e detecção de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras no leite.

4.2.2.1 Diagnóstico de mastite nos animais

A mastite clínica foi diagnosticada com base nas alterações macroscópicas do leite (presença de grumos, pus, dessora, estrias de sangue) observadas na prova da caneca de fundo escuro (Tamis) e na presença de sinais de inflamação na glândula mamária (edema, hiperemia, nódulos à palpação) e/ou sistêmicos nos animais (RADOSTITS et al., 2007). O diagnóstico da mastite subclínica foi realizado utilizando o método clássico do "California Mastitis Test" – CMT (SCHALM et al., 1971). Foram utilizados para isolamento microbiano tetos com escore 1+ a 3+ para bovinos e 2+ e 3+ para caprinos (Figura 02).

Amostras de leite de vacas e de cabras negativas ao teste de Tamis e CMT foram colhidas aleatoriamente nas propriedades, nas mesmas condições de assepsia, acondicionamento e transporte descritas para as amostras com mastite (ítem 4.3.2).

Figura 02. Colheita de amostras de leite caprino em propriedades rurais do interior de São Paulo. **A:** Prova de Tamis; **B:** Adição de reagente na prova do CMT; **C:** Reação positiva na prova do CMT; **D:** Limpeza do óstio de teto com algodão embebido em álcool (70%); **E:** colheita de amostra de leite; F: tubos falcon com amostras de leite descongeladas para realização de análise laboratorial. Botucatu, SP, 2011.

4.3. Análises físico-químicas

4.3.1 Acidez e crematócrito em leite humano

A avaliação físico-química (acidez e crematócrito) do leite humano foi realizada conforme as normas preconizadas pela Rede Nacional de Bancos de Leite Humano (RNBLH, 2006).

De cada doadora foram utilizados 4 mL de leite, aferidos com uma pipeta volumétrica. Em seguida, este volume foi transferido para um recipiente limpo. Em cada recipiente contendo 4 mL de leite a ser testado foi adicionado uma gota de solução hidroalcoólica de fenoftaleína a 1% (indicador de cor), iniciando o processo de titulação de cada amostra, com solução de hidróxido de sódio (NaOH) N/9, também conhecida como solução Dornic.

A titulação foi realizada gota a gota e, durante toda a titulação, o recipiente contendo o leite foi permanentemente agitado, com movimentos leves, evitando a incorporação de ar ao produto até a observação de coloração rósea persistente na solução. Após, este procedimento foi realizada a leitura. Cada 0,01ml de hidróxido de sódio N/9 adicionado correspondeu a 1,0^{o}D (Figura 03).

A B

Figura 03. Avaliação da acidez de leite humano encaminhado ao Laboratório de Inspeção de Alimentos da FMVZ/UNESP, Botucatu, SP. **A:** Preparo das amostras de leite humano para realização da titulação em graus Dornic (^{o}D); **B:** Observação de coloração rósea persistente na solução. Botucatu, SP, 2011.

O crematócrito das amostras de leite, que consiste na determinação do teor de creme, gordura total e valor energético foi realizado conforme o método de LUCAS et al. (1978). Para a realização da técnica de crematócrito, 1 mL de cada amostra de leite humano foi aquecido em banho-maria a 40^{o}C, durante 10

minutos. Em seguida, com o auxílio de tubo microcapilar, foram utilizadas alíquotas de 75 microlitros de leite de cada amostra. Foi vedada uma das extremidades, e os capilares foram dispostos em centrífuga para microhematócrito. Os capilares foram distribuídos sempre aos pares, em diagonal, de modo a equilibrar o rotor da centrífuga. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos, em velocidade fixa de 12.000 rpm, determinada pelo fabricante da centrífuga de micro-hematócrito. Em seguida procedeu-se a leitura.

Cada capilar apresenta duas colunas: na parte superior fica a coluna de creme e na inferior a de soro. Para obtenção do teor de creme, gordura e valor energético foi realizado o cálculo abaixo, preconizado pela RNBLH, (2006):

Creme: Coluna de Creme (mm) x 100 ÷ Coluna Total (mm) = % de Creme
Gordura: (% de creme – 0,59) ÷ 1,46 = % de Gordura
Conteúdo Energético Total: (% de creme x 66,8 + 290) = Kcal/litro

4.3.2 Acidez em leite bovino e caprino

A acidez titulável expressa em graus Dornic (Dº) foi realizada no Laboratório de Inspeção de Alimentos da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, e determinada conforme a Instrução Normativa 22 do MAPA (BRASIL, 2003).

Para a realização da prova de acidez em graus Dornic (^{o}D) as amostras de leite foram descongeladas em geladeira (4-8^{o}C). Após o descongelamento das amostras, foi preenchida bureta de 25 mL com solução de NaOH 0,1N. Para cada amostra testada foram utilizados 10 mL de leite aferidos com pipeta volumétrica. Este volume foi transferido para recipiente limpo. Em cada recipiente com 10 mL de leite foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de fenoftaleína a 1% (utilizado como indicador de cor), iniciando o processo de titulação de cada amostra, até a observação de coloração rósea persistente na solução. Para a determinação da acidez em graus Dornic foi anotado o volume gasto (em mL), da solução de hidróxido de sódio 0,1 N para cada titulação (Figura 04).

Figura 04. Titulação em graus Dornic (^{o}D) de amostras de leite de animais. A coloração rósea persistente indica a acidez, mediante o volume gasto (mL) da solução de hidróxido de sódio. Botucatu, SP, 2011.

4.4 Isolamento e caracterização dos micro-organismos

Todas as amostras de leite (humano, bovino e caprino) foram processadas no Laboratório de Diagnóstico Microbiológico da disciplina de Doenças Infecciosas dos Animais da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, visando o isolamento microbiano. Com o auxílio de alça de platina foi semeado 0,1 mL (volume fixo) de leite, em meios de ágar acrescido de sangue bovino (5%) desfibrinado e ágar MacConkey, mantidos em condições de aerobiose a 37ºC, por 72 horas, com leituras a cada 24 horas. Simultaneamente, as amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose e mantidas por 10 dias em condições de aerobiose, a 37ºC. Os micro-organismos isolados foram identificados segundo as características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo (QUINN et al., 1994; LACAZ et al., 2002; QUINN et al., 2005; TRABULSI et al., 2008).

As colônias isoladas em ágar MacConkey, fermentadoras ou não de lactose, foram submetidas às provas bioquímicas para classificação fenotípica de enterobactérias utilizando meios de cultura sólidos e semissólidos, distribuídos em tubos visando determinar a utilização de diferentes substratos: fermentação da glicose, produção de gás, L-TD (L-triptofano-desaminase),

H_2S, urease, citrato de Simmons, lisina, motilidade e indol (QUINN et al., 2005; TRABULSI et al., 2008).

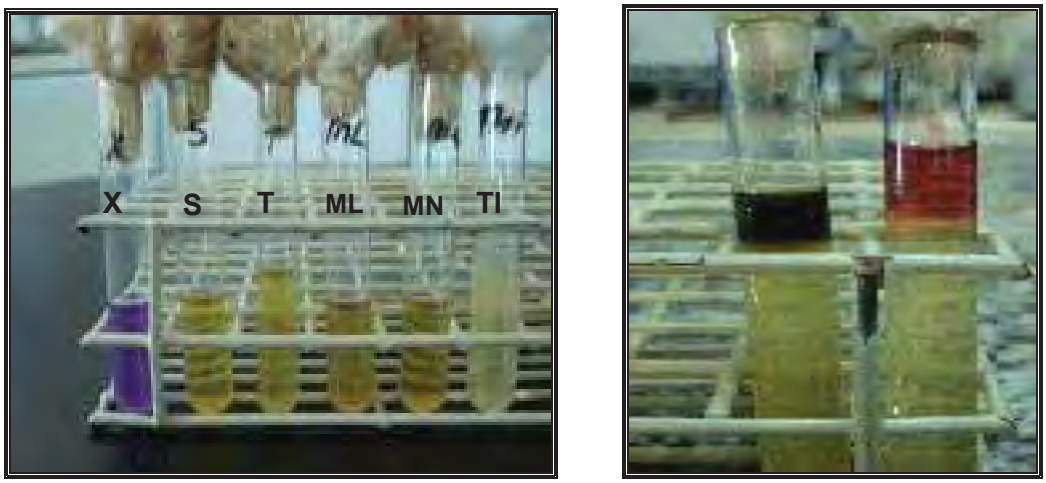
4.4.1 Identificação de ECP e ECN

As colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp. foram coradas pelo método de Gram e as linhagens que apresentaram cocos agrupados, Gram-positivos, foram submetidas às provas de catalase e coagulase em tubo visando identificar ECP e ENC (QUINN et al., 2005; TRABULSI et al., 2008). O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus* com base nas características morfo-tintoriais, provas de oxidação e fermentação da glicose, pela resistência das linhagens de *Staphylococcus* spp. à bacitracina (0,04 U) - indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm de diâmetro - e pela sensibilidade à furazolidona (100 mg), caracterizada por apresentar halo de inibição entre 15 a 35 mm de diâmetro [BAKER, 1984; QUINN et al., 2005; WINN JR. et al., 2008].

As provas de fermentação dos açúcares maltose, trealose e manitol, a resistência à polimixina B (300 UI) e a produção de acetoína, foram realizadas com o intuito de identificar e diferenciar as espécies de *S. aureus* de outras espécies coagulase positivas como *S. intermedius*, *S. hyicus, S. delphini* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (WINN JR. et al., 2008).

A diferenciação entre as espécies de ECN foi realizada com base em Cunha et al. (2004), com base na fermentação dos açúcares xilose, sacarose, trealose, maltose, manitol, multiplicação em anaerobiose em caldo tioglicolato e produção de hemolisina. As linhagens foram mantidas a 37°C por 72 horas. A classificação das diferentes espécies de ECN foi complementada pelas provas bioquímicas de redução de nitrato, produção de urease e/ou ornitina descarboxilase, resistência a novobiocina, fermentação de beta-D- frutose, manose e lactose, e produção de acetoína C (Figura 05) [WINN JR. et al., 2008].

Após a confirmação da espécie, as linhagens foram estocadas em caldo nutriente, acrescido de glicerol a 5%, em temperatura de -20°C



A B

Figura 05. Provas bioquímicas para diferenciação de espécies do gênero *Staphylococcus*. **A:** Prova de fermentação dos açúcares X: xilose, S: sacarose, T: trealose, ML: maltose, MN: manitol e TI: multiplicação em anaerobiose em tioglicolato. **B:** Produção de acetoína (esquerda: coloração marrom = negativa e direita: tonalidade avermelhada = positiva), Botucatu, SP, 2011.

4.5 Perfil de sensibilidade microbiana "in vitro" e detecção de linhagens multirresistentes

O perfil de sensibilidade microbiana "in vitro" foi realizado no Laboratório de Diagnóstico Microbiológico da disciplina de Doenças Infecciosas dos Animais da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. Os micro-organismos isolados foram submetidos à prova de sensibilidade microbiana pelo método de difusão com discos (CLSI, 2006).

Foram utilizados princípios ativos de antimicrobianos indicados para humanos, bem como fármacos amplamente utilizados no tratamento da mastite bovina e caprina, a saber: amoxacilina/ácido clavulânico (10/20 µg), ampicilina (10 µg), cefalexina (30 µg), cefoperazona sódica (75 µg), cefoxitina (30 µg), ceftiofur (30 µg), enrofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), oxacilina (5 µg), penicilina (10 UI), sulfa/trimetoprim (25 µg) e vancomicina (30 µg). As linhagens foram consideradas multirresistentes quando houve resistência simultânea a cinco ou mais antimicrobianos testados (RIBEIRO et al., 2009; GARINO JR. et al.; 2011).

4.6 Avaliação de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana no leite

A determinação de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana foi realizada utilizando o *kit* Delvotest™[1], de acordo com as normas do fabricante. O Delvotest™ é um sistema de teste microbiológico que tem como objetivo detectar a presença de substâncias antibacterianas no leite, pela inibição da multiplicação do micro-organismo *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, sensível aos principais grupamentos de antimicrobianos de uso humano e veterinário.

Uma alíquota de 0,1 mL de cada amostra de leite foi disposta em uma placa contendo o meio de cultura e o micro-organismo. Em seguida, o *kit* foi incubado à 64°C ± 5°C por 3-4 horas. Após este período a presença de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras impede ou reduz a multiplicação do micro-organismo, e o meio com indicador de pH não altera sua cor, permanecendo azul, caracterizado como positivo. Na ausência de antimicrobianos detectáveis pelo teste e/ou substâncias inibidoras no leite, o micro-organismo se multiplicará acidificando o meio, que assume tonalidade amarelada, resultado considerado negativo (Figura 06).

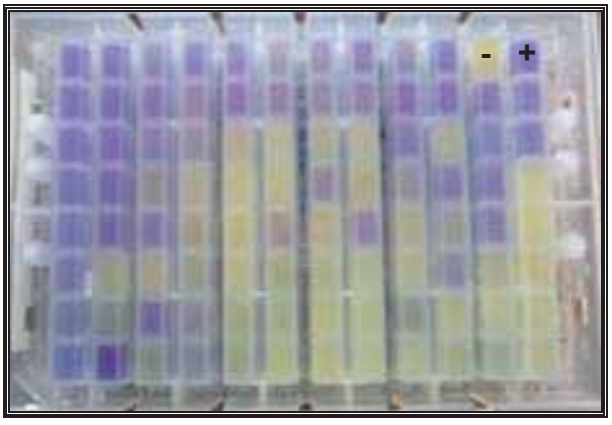


Figura 06. Determinação de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana em amostras de leite humano, bovino e caprino utilizando o *kit* Delvotest™. Botucatu, SP, 2011.

* **-** : controle negativo. **+** : controle positivo

[1] Delvotest™: *DSM Food Specialties Dairy Ingredients – The Netherlands*.

4.7 Detecção de linhagens de *Staphylococcus* spp. produtoras de hemólise, investigação fenotípica e genotípica de MRS e pesquisa de toxinas

O antibiograma foi utilizado como critério de seleção das linhagens de ECP e ECN isoladas de amostras de leite proveniente do BLH de Botucatu, SP, bem como isolados obtidos de leite de vacas e cabras, com e sem mastite, para a realização de investigação fenotípica e genotípica, com o intuito de detectar a presença de hemólise ao redor das colônias, investigar linhagens MRS, e linhagens com de genes para toxinas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tsst-1*), bem como produtoras das enterotoxinas A, B, C e D e TSST-1.

Como controles positivo e negativo foram utilizadas, respectivamente, as cepas-padrão *S. aureus* ATCC 33591 e *S. aureus* ATCC 25923, cedidas pela Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IB/UNESP – Botucatu, SP.

4.7.1 Detecção fenotípica de hemólise em ágar acrescido de sangue

As linhagens produtoras de hemólise foram avaliadas em meio de ágar acrescido de sangue bovino (5%) desfibrinado, conforme descrito no item 4.4, mantidas em condições de aerobiose, a 37°C, por 72 horas. As colônias que apresentaram halo de hemólise ao seu redor no meio de ágar sangue foram consideradas hemolíticas (QUINN et al., 2005).

4.7.2 Teste de difusão com discos para detecção fenotípica de MRS

O teste de sensibilidade à oxacilina foi realizado pela técnica de difusão em ágar (CLSI, 2006). Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI (“Brain Heart Infusion”), previamente incubadas por 24 horas e posteriormente diluídas na escala 0.5 de MacFarland. O inóculo foi semeado em ágar Müeller-Hinton e, posteriormente, foram dispostos discos impregnados com oxacilina (1 µg) e cefoxitina (30 µg), incubados à temperatura de 35ºC por 24 horas, com leitura do diâmetro do halo de inibição interpretado com base nas normas vigentes (CLSI, 2006).

4.7.3 Concentração inibitória mínima – CIM para detecção de MRS

A concentração inibitória mínima foi avaliada pela técnica da difusão em ágar, empregando-se fitas de oxacilina (0,016 – 0,256 µg/mL)[2]. Para o preparo dos inóculos foram utilizadas culturas em caldo BHI, previamente incubadas por 24 horas e, posteriormente, diluídas na escala 0.5 de MacFarland. O inóculo foi semeado em ágar Müeller Hinton. Em seguida, foram dispostas as fitas impregnadas com diferentes concentrações do fármaco. As placas foram incubadas à temperatura de 35ºC, por 24 horas, e o halo de inibição interpretado com base nas normas vigentes (CLSI, 2010) [Figura 07].

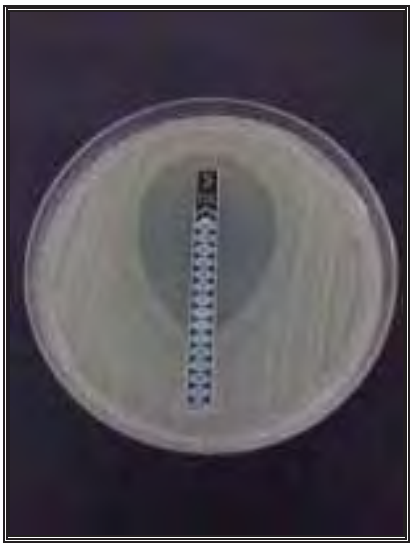


Figura 07. Detecção fenotípica da presença de resistência à meticilina em linhagem de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostra de leite, utilizando o método de CIM com fitas impregnadas com oxacilina[2] (0,015 – 256 µg/mL). Botucatu, SP, 2011.

* CIM = concentração inibitória mínima.

4.7.4. Avaliação genotípica de linhagens MRS e detecção de gene para toxinas

4.7.4.1 Extração do DNA

O ácido nucléico total foi extraído a partir das linhagens de ECP e ECN cultivadas em ágar acrescido de sangue bovino (5%) desfibrinado, inoculadas

[2] M.I.C. Evaluater Strips: Oxoid™.

em BHI e incubadas a 37ºC, por 24 horas. A extração foi realizada com o kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin^{TM} (G.E. Healthcare Life Sciences), que consiste na digestão dos isolados com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). A seguir, 500 µL da solução de extração foram adicionados à mistura e centrifugado a 5.000 g por 1 min.

O sobrenadante foi transferido para a coluna e novamente centrifugado a 5.000 g por 1 min. A parte líquida foi descartada e 500 µL da solução de extração foram adicionados à coluna. Após a centrifugação e descarte da parte líquida, 500 µL da solução de lavagem foram adicionados à coluna e submetidos à nova centrifugação a 14.000 g por 3 min. Em seguida, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e 200 µL de água Milli Q aquecida a 70ºC foram utilizados para a eluição. O produto obtido foi centrifugado a 5000 g por 1 minuto para a recuperação do DNA e a coluna desprezada. O DNA extraído foi acondicionado sob refrigeração, em freezer a -20°C.

4.7.4.2 Validação da extração do DNA

Para comprovar a qualidade da extração e confirmar que o DNA extraído pertence ao gênero *Staphylococcus* spp. foi realizada a pesquisa dos genes da subunidade 16S do rRNA (Figura 08). As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volumes totais de 25 µL contendo 20 pmol de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase, 200 µM dNTPs, 20 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 1,5 mM de $MgCl_2$, e 3 µL de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador (MJ Research PTC-100), utilizando os *primers 16S1* (CCT ATA AGA CTG GGA TAA CTT CGG G) e *16S2* (CTT TGA GTT TCA ACC TTG CGG TCG) – 791 (pb), empregando os parâmetros descritos por Mason et al. (2001): 36 ciclos de desnaturação a 94ºC por trinta segundos, anelamento dos *primers* a 55°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto. Após o último ciclo, foi realizada extensão final a 72°C por dez minutos, antes do resfriamento à 4°C.

Em todas as reações foram utilizadas água Milli Q esterilizada como controle negativo e, como controle positivo, a linhagem de referência *S. aureus* ATCC 33591, cedida pela Profa. Dra. Maria de Lourdes R. S. Cunha, do Departamento de Imunologia e Microbiologia do IB/UNESP – Botucatu, SP.

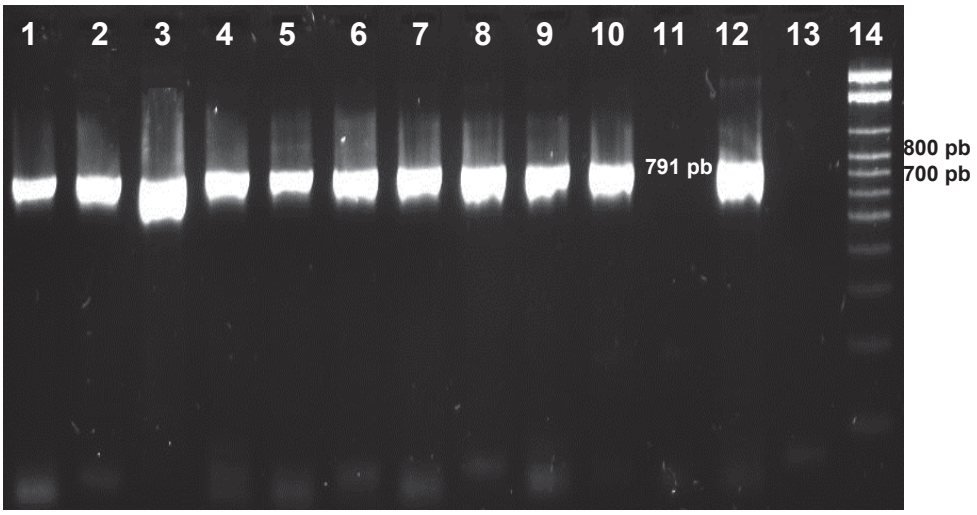


Figura 08. Eletroforese em gel de agarose 2% para visualização dos genes da subunidade 16S do rRNA em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite: 1-10: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 11: amostra negativa; 12: controle positivo; 13: controle negativo; 14: DNA ladder 100 pb. Botucatu, SP, 2011.

4.7.4.3 Amplificação do DNA (PCR) para detecção de linhagens de MRS

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volumes totais de 25 µL contendo 10 pmol de cada *primer*, 2,0 U de Taq DNA polimerase, 100 µM dNTPs, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 0,75 mM de $MgCl_2$, e 3 µL de DNA. A reação foi realizada em termociclador utilizando os *primers mecA1* (AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG) e *mecA2* (AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG) – 533 (pb), conforme as condições de ciclos descritas por Murakami et al. (1991): 40 ciclos de desnaturação a 94ºC por trinta segundos, anelamento dos *primers* a 55,5ºC por trinta segundos e extensão a 72ºC por um minuto. Após os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72ºC por 5 minutos antes de resfriar à 4ºC.

Foram utilizados como controle positivo cepa *S. aureus* ATCC 33591 e controle negativo a cepa *S. aureus* ATCC 25923.

4.7.4.4 Amplificação do DNA (PCR) para detecção de linhagens toxigênicas

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrifuga de 0,5 mL, em volumes totais de 25 µL, contendo 10 pmol de cada *primer* (Quadro 02), 2,0 U de Taq DNA polimerase, 100 µM desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 0,75 mM de $MgCl_2$, e 3 µL de DNA. Em todas as reações foi utilizado controle negativo, substituindo-se o ácido nucléico por água.

A amplificação foi realizada em termociclador de acordo com Johnson et al. (1991), modificado por Cunha et al. (2006), como segue: primeiro ciclo a 94ºC por quatro minutos, desnaturação a 94ºC por dois minutos, anelamento dos *primers* a 55ºC e extensão a 72ºC durante um minuto e trinta segundos. Em seguida foi realizado o segundo ciclo de desnaturação a 94ºC por dois minutos, anelamento a 53ºC e extensão a 72ºC por 1 minuto e 30 segundos. No terceiro ciclo, a temperatura de anelamento foi reduzida para 51ºC, seguido por mais 37 ciclos com os mesmos parâmetros. Após completar 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72ºC por 7 minutos e posteriormente resfriados a 4ºC.

Quadro 02. Iniciadores utilizados para detecção de genes codificadores de toxinas em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite humano, bovino e caprino, utilizando PCR. Botucatu, SP, 2011.

Gen	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Produto amplificado (pb)
sea	TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA	120
	GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA	
seb	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	478
	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	
sec	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	257
	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	
sed	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	317
	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	
tsst	ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA	350
	TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT	

Fonte: Johnson et al., 1991.

4.7.4.5 Eletroforese em gel de agarose

A eficiência das amplificações foi confirmada pela eletroforese da reação em gel de agarose a 2%, preparado em tampão 1,0 X TBE e corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen™) na concentração de 1µL/10 mL de gel. O padrão de peso molecular utilizado foi de 10 µL do Ladder de 100 pb (Norgen Biotek™). As corridas em eletroforese foram realizadas em cubas horizontais contendo TBE 0,5X a 110 V. Posteriormente, os géis foram visualizados e fotografados em transiluminador de luz ultravioleta.

4.7.5 Detecção de linhagens de *Staphylococcus* spp. produtoras de toxinas

As linhagens de ECP e ECN isoladas de leite de mulheres e de leite de vacas e cabras, com e sem mastite, que expressaram gene codificador de toxina foram submetidas à técnica de aglutinação passiva reversa em látex (SÁ et al., 2004), utilizando os *kits* SET RPLA e TSST-RPLA (Oxoid™), com o objetivo de detectar a produção das toxinas SEA, SEB, SEC, SED e TSST-1. A detecção das toxinas de *Staphylococcus* spp. foi realizada no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, SP.

4.7.5.1 Produção de enterotoxinas

4.7.5.1.1 *Staphylococcus aureus*

A produção de enterotoxinas A, B, C, D e toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) em linhagens de *S. aureus* foi pesquisada utilizando o método de “celofane over agar”, descrito por Hallander (1965).

Para a realização desta técnica foram utilizados círculos de papel celofane de 100 mm de diâmetro, cortados e dispostos intercalados com círculos de papel filtro de mesmo diâmetro, em placas de petri de vidro, umedecidos com água destilada, autoclavados a 121ºC por 20 minutos. Os círculos de papel celofane foram transferidos assepticamente para placas de petri de 100 mm contendo 15 a 20 mL de agar infusão cérebro coração (Oxoid™), enriquecido com 1% de extrato de levedura (Merck™). Sobre o círculo de papel celofane foram semeados 100 µL do inóculo, que foi espalhado homogeneamente com auxílio de bastão de vidro em “L”. Em seguida, as placas foram incubadas a 37ºC por 24 horas. Após este período, o

material de multiplicação bacteriana sobre o celofane foi lavado com 2,5 mL de solução de Na_2HPO_4 a 0,01M (Figura 09). A suspensão celular obtida foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos à 4ºC, e o sobrenadante acondicionado em tubos "eppendorf" e estocados à temperatura de -20ºC, até o momento de sua utilização para a pesquisa de toxinas.

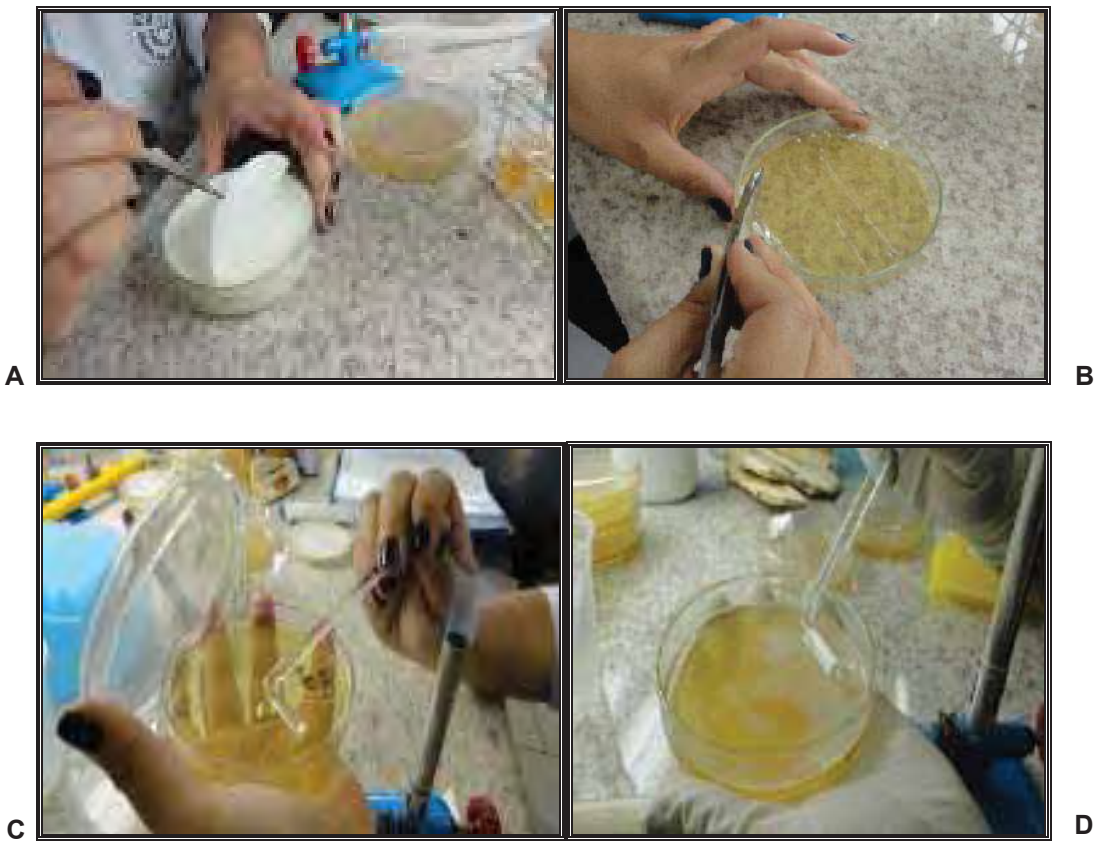


Figura 09. Produção de toxinas em linhagens de *S. aureus* pelo método de "celofane over agar". **A**: Retirada do papel filtro. **B**: Disposição do papel celofane em placa de petri contendo ágar BHI. **C:** Deposição do inóculo sobre a folha de celofane. **D**: Multiplicação bacteriana após 24 horas de incubação, lavado com solução de Na_2HPO_4 a 0,01M. Botucatu, SP, 2011.

4.7.5.1.2 ECN e outras linhagens de ECP

Para a determinação da produção das enterotoxinas A, B, C, D e da toxina TSST-1 em linhagens de ECN e ECP (exceto *S. aureus*) isoladas de leite humano, bovino e caprino foi utilizada a técnica de produção de toxinas

pelo método de saco de diálise de Donnelly et al. (1967). Os sacos de diálise (Difco^{TM}) de 30 a 40 cm foram previamente lavados em água destilada, amarrados em uma das extremidades e preenchidos com 50 mL de caldo BHI, em concentração dupla, e amarrados na outra extremidade.

Após, os sacos de diálise foram dispostos em erlenmeyers de 250 mL para adotarem a forma de "U" no fundo do frasco. Os frascos foram autoclavados durante 15 minutos a 121°C e, posteriormente, volumes de 18,0 mL de tampão fosfato (0,02 M, pH 7,2 em 0,9% de NaCl) foram inoculados com conteúdo de uma alça de platina das estirpes previamente cultivadas em 5,0 mL de caldo BHI a 37^{o}C, por 18 horas em agitador.

As misturas foram transferidas para os erlenmeyers contendo os sacos de diálise, os quais foram incubados a 37°C por 24 horas com agitação de 130 rpm. Após incubação, as culturas foram centrifugadas a 8.000 x g / 4°C, durante 10 min. Os sobrenadantes foram conservados a -20°C até a utilização (Figura 10).

A B

Figura 10. Produção de toxinas pelo método de saco de diálise. **A:** Frascos de erlenmeyer contendo solução tampão inoculada com linhagens de *Staphylococcus* spp. e sacos de diálise repletos de BHI em concentração dupla, dispostos em agitador, mantidos a 37^{o}C por 18 horas. **B:** Multiplicação de linhagens de *Staphylococcus* spp. Botucatu, SP, 2011.

4.7.5.2 Detecção das enterotoxinas A, B, C, D e TSST-1 pelo Método de Aglutinação em Látex (RPLA)

A detecção do produto extracelular foi realizada pelo método de aglutinação reversa passiva em látex (RPLA), segundo Shingaki et al. (1981). A detecção das enterotoxinas A, B, C e D foi realizada utilizando o kit SET-RPLA Toxin Detection (Oxoid^{TM}) e da TSST-1 pelo kit TSST-RPLA Toxin Detection (Oxoid^{TM}). Em poços de microplaca (fundo em V), foram dispostos 25 μL dos sobrenadantes obtidos conforme itens 4.7.5.1.1 e 4.7.5.1.2, filtrados previamente em membrana Millipore 0,22 μm com o intuito de evitar a ocorrência de reações inespecíficas.

A seguir, foram adicionados 25 μL do látex sensibilizado com as anti-enterotoxinas e com anti-TSST. As toxinas das cepas padrão foram utilizadas como controle positivo e as reações inespecíficas foram analisadas adicionando-se 25 μL do sobrenandante em 25 μL do látex controle. As placas foram cobertas com celofane e os reagentes homogeneizados em micromixer por três minutos. Após incubação durante 24 horas em temperatura ambiente, os resultados foram registrados com o auxílio de lupa e iluminação. A formação de um botão róseo foi interpretada como resultado negativo.

4.8 Análise estatística

As frequências absolutas e relativas do isolamento de micro-organismos em leite foram tabuladas e, calculado o intervalo de confiança 95% (IC95%), tanto para amostras positivas quanto negativas. A associação entre o perfil microbiológico, a acidez titulada em ^{o}D e a presença de resíduos em leite de animais com e sem mastite foram comparadas entre si em tabelas de contingência, utilizando-se os testes apropriados em cada caso, a saber qui-quadrado (χ^2), teste Exato de Fisher e teste G de Williams.

A comparação fenotípica e genotípica entre linhagens de ECP e ECN isolados de amostras de leite humano, bovino e caprino resistentes à meticilina e/ou oxacilina e com a presença de genes para toxinas, bem como produtoras de toxinas foram analisadas pelo teste de Fischer ou pelo teste de Qui-quadrado. Em todas as análises foram consideradas diferenças estatisticamente significantes para valores de $p< 0,05$.

A análise estatística foi realizada pelo Prof. Dr. Aristeu Vieira da Silva, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, Brasil.

5. RESULTADOS

5.1 Diagnóstico de mastite clínica e subclínica em vacas e cabras

5.1.1 Vacas

Dentre os 200 tetos de diferentes vacas avaliadas com mastite foi constatada a ocorrência de alterações clínicas no leite pelo teste de Tamis em 29 (14,50%) amostras de leite. A presença de mastite subclínica detectada pelo CMT foi observada em 171 (85,50%) tetos amostrados.

5.1.2 Cabras

Dos 200 tetos avaliados de cabras com mastite, 05 (2,50%) apesentaram mastite clínica (com presença de grumos no leite), enquanto 195 (97,50%) apresentaram mastite subclínica diagnosticada pelo CMT.

5.2 Análises físico químicas

5.2.1 Avaliação da acidez e crematócrito em leite humano

Os dados referentes à acidez titulada em graus Dornic (^{o}D) variaram de 2,5 ^{o}D à 12,5^{o}D (Tabela 01). Foi observado que 95,42% das amostras de leite cru de mulheres acusaram acidez titulável ≤ 7,5 ^{o}D e apenas 4,58% acidez titulável ≥ 7,5^{o}D.

Tabela 01. Resultado da acidez titulável em graus Dornic (^{o}D) em 240 amostras de leite humano cru ordenhado, provenientes do BLH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011.

Nº de amostras (%)	Acidez Titulável (^{o}D)
107 (44,59%)	2,5
102 (42,50%)	5,0
20 (8,33%)	7,5
06 (2,50%)	10,0
05 (2,08%)	12,5
240 (100,00%)	**TOTAL**

* %: Porcentagem; ^{o}D: Graus Dornic.
** Valor aceitável pela RNBLH: 1-8^{o}D.

A variação dos teores de creme, gordura total e valores energéticos encontrados nas amostras de leite das mulheres amostradas apresentam-se sumariadas na Tabela 02.

Tabela 02. Resultados dos teores de creme, gordura total e valores energéticos obtidos de 240 amostras de leite humano cru proveniente do BLH, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011.

Constituintes do leite	Valor mínimo	Valor máximo
Teor de Creme (%)	1,54	11,29
Gordura Total (%)	0,65	7,33
Valor Energético (Kcal/L)	392,77	1044,19

* %: Porcentagem; Kcal/L: Kilocaloria por litro.

5.2.2 Detecção de acidez em leite bovino e caprino

5.2.2.1 Leite de vacas

A acidez titulada em graus Dornic (^{o}D) de 200 amostras de leite bovino classificadas como mastítico e 200 amostras negativas para mastite demonstraram ampla variação, de 5,0 a 24 ^{o}D (Tabela 03).

Foi observada diferença estatística significante ($p<0,05$) quando comparada a acidez do leite de vacas com e sem mastite (Tabela 04).

Tabela 03. Resultado da acidez titulada em graus Dornic (°D) de 200 amostras de leite cru de vacas com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior de São Paulo. Botucatu, 2011.

Acidez dornic (°D)	Leite bovino com mastite Nº de amostras (%)	Leite bovino sem mastite Nº de amostras (%)
5,0	01 (0,50)	01 (0,50)
7,0	05 (2,50)	0 (0,00)
8,0	02 (1,00)	02 (1,00)
9,0	05 (2,50)	0 (0,00)
10,0	12 (6,00)	02 (1,00)
11,0	11 (5,50)	0 (0,00)
12,0	14 (7,00)	02 (1,00)
13,0	22 (11,00)	13 (6,50)
14,0	15 (7,50)	23 (11,50)
15,0	24 (12,00)	10 (5,00)
16,0	16 (8,00)	25 (12,50)
17,0	25 (12,50)	13 (6,50)
18,0	17 (8,50)	41 (20,50)
19,0	13 (6,50)	33 (16,50)
20,0	06 (3,00)	18 (9,00)
21,0	08 (4,00)	13 (6,50)
22,0	01 (0,50)	02 (1,00)
23,0	02 (1,00)	02 (1,00)
24,0	01 (0,50)	0 (0,00)
TOTAL	**200 (100,00)**	**200 (100,00)**

* °D: Graus Dornic; Nº: Número; %: Porcentagem.

** Valor ideal da acidez dornic estipulado para leite de vacas pela legislação nacional: 14-18°D.

Tabela 04. Comparação dos resultados relativos à acidez titulada em graus Dornic (°D) de acordo com os valores estabelecidos pela IN 22, em 200 amostras de leite cru de vacas com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando o teste de qui-quadrado. Botucatu, 2011.

Vacas	Acidez (°D)							
	Abaixo do ideal		Ideal		Elevada		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Com mastite	72	36,00	97	48,50	31	15,50	200	100
Sem mastite	20	10,00	112	56,00	68	34,00	200	100

* °D: Graus dornic; Nº: Número; %: porcentagem; Valor de p (χ^2) <0,0001.

** Valor ideal da acidez dornic estipulado para leite de vacas pela legislação nacional: 14-18°D.

5.2.2.2 Leite de cabras

A acidez titulada em graus Dornic (°D) de 200 amostras de leite de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite demonstraram grande variação, de 5,0 a 32 °D (Tabela 05).

Não foi verificada diferença estatística (p>0,05) ao comparar a acidez dornic do leite de cabras com mastite e sem mastite (Tabela 06).

Tabela 05. Resultado da acidez titulada em graus Dornic (°D) de 200 amostras de leite cru de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Acidez dornic (°D)	Leite caprino com mastite Nº de amostras (%)	Leite caprino sem mastite Nº de amostras (%)
5,0	01 (0,50)	01 (0,50)
9,0	02 (1,00)	01 (0,50)
10,0	08 (4,00)	0 (0,00)
11,0	01 (0,50)	04 (2,00)
12,0	07 (3,50)	03 (1,50)
13,0	09 (4,50)	06 (3,00)
14,0	14 (7,00)	15 (7,50)
15,0	23 (11,50)	13 (6,50)
16,0	10 (5,00)	16 (8,00)
17,0	12 (6,00)	20 (10,00)
18,0	30 (15,00)	37 (18,50)
19,0	14 (7,00)	18 (9,00)
20,0	10 (5,00)	16 (8,00)
21,0	10 (5,00)	13 (7,00)
22,0	10 (5,00)	11 (5,50)
23,0	13 (6,50)	08 (4,00)
24,0	06 (3,00)	06 (3,00)
25,0	11 (5,50)	05 (2,50)
26,0	01 (0,50)	02 (1,00)
27,0	02 (1,00)	0 (0,00)
28,0	05 (2,50)	0 (0,00)
29,0	01 (0,50)	01 (0,50)
30,0	0 (0,00)	01 (0,50)
31,0	0 (0,00)	01 (0,50)
32,0	0 (0,00)	01 (0,50)
TOTAL	**200 (100,00)**	**200 (100,00)**

* °D: Graus Dornic; Nº: Número; %: Porcentagem.

** Valor ideal da acidez dornic estipulado para leite de vacas pela legislação nacional: 13-18°D.

Tabela 06. Comparação dos resultados relativos à acidez titulada em graus Dornic (°D) de acordo com os valores estabelecidos pela IN 37, em 200 amostras de leite cru de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando o teste de qui-quadrado. Botucatu, 2011.

Cabras	Acidez (°D)							
	Abaixo do ideal		Ideal		Elevada		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Com mastite	19	9,50	98	49,00	83	41,50	200	100,00
Sem mastite	10	5,00	107	53,50	83	41,50	200	100,00

* °D: Graus dornic; Nº: Número; %: porcentagem; Valor de p (χ^2) = 0,2118.

** Valor ideal da acidez dornic estipulado para leite de vacas pela legislação nacional: 13-18°D.

5.3 Isolamento e caracterização bioquímica dos micro-organismos

5.3.1 Isolados de leite humano

Staphylococcus spp. (56,45%), *Enterobacter* spp. (13,44%) e *Bacillus* spp. (11,83%) foram os micro-organismos mais frequentemente isolados de 240 amostras de leite de doadoras (Tabela 07). Em contraste, 96 (40,00%) das amostras não apresentaram isolamento microbiano (Tabela 08).

Dentre os isolados do gênero *Staphylococcus,* 15/105 (14,29%) foram classificados como ECP e 90/105 (85,71%) como ECN.

S. aureus foi identificado somente em 5/105 (4,76%) das linhagens de estafilococos, enquanto entre os ECN, *S. epidermidis* 75/105 (71,43%) foi o mais frequente (Tabela 09). Não foi possível identificar bioquimicamente a espécie de quatro linhagens de ECN e dez de ECP isolados de LH, sendo que estes micro-organismos foram classificados como *Staphylococcus* spp.

Tabela 07. Micro-organismos isolados de 240 amostras de leite, provenientes do BLH do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011.

Micro-organismos	Nº linhagens/ total de linhagens isoladas (%)
Staphylococcus spp.	105/186 (56,45)
Enterobacter spp.	25/186 (13,44)
Bacillus spp.	22/186 (11,83)
Streptococcus spp.	09/186 (4,84)
Acinetobacter spp.	08/186 (4,30)
Leveduras	07/186 (3,76)
Klebsiella pneumoniae	03/186 (1,61)
Pseudomonas aeruginosa	03/186 (1,61)
Hafnia alvei	02/186 (1,08)
Klebsiella oxytoca	01/186 (0,54)
Micrococcus spp.	01/186 (0,54)

* Nº: Número; %: Porcentagem.

Tabela 08: Total de amostras de leite humano, positivas e negativas para isolamento microbiano em 240 amostras de leite provenientes do BLH do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011.

	Isolamento microbiano		
Amostras de LH	**Nº**	**%**	**IC95%**
Positivas	144	60,00	53,70-66,00
Negativas	96	40,00	34,00-46,30

* LH: leite humano; Nº: Número; %: Porcentagem; IC95%: Intervalo de confiança de 95%.

** Intervalo de confiança que não se sobrepõem demonstram diferenças significativas entre as porporções.

Tabela 09. Espécies de ECP e ECN isoladas de amostras de leite de mulheres provenientes do BLH, do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011.

Espécies	Nº linhagens/ total de *Staphylococcus* spp. isolados (%)
ECP	
Staphylococcus spp.	10/105 (9,52)
S. aureus	05/105 (4,76)
ECN	
S. epidermidis	75/105 (71,43)
S. saprophyticus	06/105 (5,71)
Staphylococcus spp.	04/105 (3,81)
S. simulans	02/105 (1,90)
S. xylosus	02/105 (1,90)
S. lugdunensis	01/105 (0,95)

* Nº: Número; %: Porcentagem; ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos.

5.3.2 Isolados de leite de vacas

Dentre 200 amostras de leite bovino com e sem mastite, 59 (29,50%) e 151 (75,50%), respectivamente, não apresentaram isolamento microbiano.

Foi verificada diferença estatística significante ($p<0,05$) entre isolamento microbiano de amostras de leite de vaca com e sem mastite (Tabela 10).

Streptococcus spp. (32,68%), *Staphylococcus* spp. (30,72%) e *Corynebacterium bovis* (20,26%) foram os micro-organismos mais comumente isolados em 200 amostras de leite com mastite. Nas amostras negativas para mastite foram isolados com maior frequência *Corynebacterium bovis* (32,73%), *Staphylococcus* spp. (27,27%) e *Streptococcus* spp. (20,00%) [Tabela 11].

Tabela 10. Comparação utilizando o teste de qui-quadrado, entre as 200 amostras de leite de vacas com mastite e 200 amostras de leite negativas para mastite provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo que apresentaram isolamento microbiano. Botucatu, 2011.

Vacas	Isolamento microbiano em amostras de leite de vacas			
	Positivo		Negativo	
	Nº de amostras de leite	%	Nº de amostras de leite	%
Com mastite	141	70,50	59	29,50
Sem mastite	49	24,50	151	75,50

* Nº: Número; %: Porcentagem;Valor de p (χ^2) <0,0001.

Tabela 11. Micro-organismos isolados de 200 amostras de leite cru de vacas com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Micro-organismos	Vacas com mastite	Vacas sem mastite
	Nº linhagens/ total de linhagens isoladas (%)	Nº linhagens/ total de linhagens isoladas (%)
Bacillus spp.	5/153 (3,27)	6/55 (10,91)
Corynebacterium bovis	31/153 (20,26)	18/55 (32,73)
Enterobacter spp.	12/153 (7,84)	5/55 (9,09)
Escherichia coli	6/153 (3,92)	0/55 (0,00)
Levedura	1/153 (0,65)	0/55 (0,00)
Nocardia spp.	1/153 (0,65)	0/55 (0,00)
Staphylococus spp.	47/153 (30,72)	15/55 (27,27)
Streptococcus spp.	50/153 (32,68)	11/55 (20,00)

* Nº: Número; %: Porcentagem.

Dos *Staphylococcus* spp. isolados de vacas com mastite, 24/47 linhagens (51,07%) foram classificadas como ECP e 23/47 isolados (48,93%) como ECN. *S. aureus* 19/47 (40,43%) e *S. saprophyticus* 5/47 (10,60%) foram as espécies isoladas com maior frequência.

Nas amostras de leite cujas vacas foram negativas para mastite, apenas uma (6,67%) linhagem de *Staphylococcus* spp. foi classificada como coagulase positiva, caracterizada bioquimicamente como *S. intermedius*. As demais 14/15 linhagens (93,33%) foram classificadas como ECN, das quais 04/15 (26,67%) representadas por *S. chromogenes* (Tabela 12).

Não foi possível identificar pelas provas bioquímicas utilizadas três espécies de ECN isolados de leite de vacas mastíticas e três ECN provenientes de vacas negativas para mastite. Estes isolados foram classificados como *Staphylococcus* spp.

Tabela 12. Espécies de ECP e ECN isoladas de amostras de leite de vacas com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Espécies	**Vacas com mastite**	**Vacas sem mastite**
	Nº linhagens/ total de *Staphylococcus* spp. isolados (%)	**Nº linhagens/ total de *Staphylococcus* spp. isolados (%)**
ECP		
S. aureus	19/47 (40,43)	0/15 (0,00)
S. intermedius	05/47 (10,64)	01/15 (6,67%)
ECN		
S. chromogenes	04/47 (8,51)	04/15 (26,67)
S. epidermidis	04/47 (8,51)	01/15 (6,67)
S. haemolyticus	03/47 (6,38)	0/15 (0,00)
S. pasteuri	02/47 (4,26)	01/15 (6,67)
S. saprophyticus	05/47 (10,60)	01/15 (6,67)
S. simulans	01/47 (2,13)	03/15 (20,00)
Staphylococcus spp.	03/47 (6,38)	03/15 (20,00)
S. warneri	01/47 (2,13)	01/15 (6,67)

* ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos; Nº: Número; %: Porcentagem.

5.3.3 Isolados de leite de cabras

Das 200 amostras de leite de cabras com e sem mastite, 64 (32,00%) e 150 (75,00%), respectivamente, não apresentaram isolamento microbiano.

A comparação entre o isolamento de micro-organismos de amostras de leite de cabras, com e sem mastite, revelou diferença estatística significante ($p<0,05$) [Tabela 13].

Tabela 13: Comparação utilizando o teste de qui-quadrado, entre as 200 amostras de leite de cabras com mastite e 200 amostras de leite negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo que apresentaram isolamento microbiano. Botucatu, 2011.

Cabras	Isolamento microbiano em amostras de leite de cabras			
	Positivo		Negativo	
	Nº de amostras de leite	%	Nº de amostras de leite	%
Com mastite	136	68,00	64	32,00
Sem mastite	50	25,00	150	75,00

* Nº: Número; %: Porcentagem; Valor de p (χ^2) <0,0001.

Staphylococcus spp. foram as estirpes isoladas com maior frequência em 116/136 (85,29%) e 40/50 (80,00%) amostras de leite caprino com e sem mastite, respectivamente (Tabela 14).

Dentre os micro-organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* isolados de cabras com mastite, 16/116 (13,79%) foram identificados como ECP e classificados como *S. aureus,* enquanto 100/116 (86,21%) como ECN. *S. epidermidis* 42/116 (36,21%) e *S. lugdunensis* 30/116 (25,86%) foram as espécies mais frequentes entre os ECN isolados de cabras com mastite.

Dentre 40 linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de cabras sem mastite, apenas uma (2,50%) foi classificada como coagulase positiva, caracterizada bioquimicamente como *S. aureus*. As demais 39/40 linhagens (97,44%) foram classificadas como ECN. No leite com mastite, 17/40 linhagens

(42,50%) foram representadas por *S. epidermidis* e 15/40 (37,50%) por *S. lugdunensis* (Tabela 15).

Tabela 14. Micro-organismos isolados de 200 amostras de leite cru de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Micro-organismos	Cabras com mastite	Cabras sem mastite
	Nº linhagens/ total de linhagens isoladas (%)	Nº linhagens/ total de linhagens isoladas (%)
Actinomyces spp.	0/136 (0,00)	1/50 (2,00)
Bacillus spp.	8/136 (5,88)	6/50 (12,00)
Escherichia coli	2/136 (1,47)	0/50 (0,00)
Levedura	1/136 (0,74)	0/50 (0,00)
Mannheimia haemolytica	1/136 (0,74)	1/50 (2,00)
Micrococcus spp.	2/136 (1,47)	1/50 (2,00)
Nocardia spp.	0/136 (0,00)	1/50 (2,00)
Pseudomonas aeruginosa	2/136 (1,47)	0/50 (0,00)
Staphylococcus spp.	116/136 (85,29)	40/50 (80,00)
Streptococcus spp.	4/136 (2,94)	0/50 (0,00)

* Nº: Número; %: Porcentagem.

Tabela 15. Espécies de ECP e ECN isoladas de amostras de leite de cabras com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Espécies	Cabras com mastite	Cabras sem mastite
	Nº linhagens/ total de *Staphylococcus* spp. isolados (%)	Nº linhagens/ total de *Staphylococcus* spp. isolados (%)
ECP		
S. aureus	16/116 (13,79)	01/40 (2,50)
ECN		
S. auricularis	02/116 (1,72)	01/40 (2,50)
S. capitis urealyticus	02/116 (1,72)	01/40 (2,50)
S. caprae	01/116 (0,86)	0/40 (0,00)
S. chromogenes	04/116 (3,45)	0/40 (0,00)
S. epidermidis	42/116 (36,21)	16/40 (42,50)
S. hyicus	01/116 (0,86)	0/40 (0,00)
S. lugdunensis	30/116 (25,86)	15/40 (37,50)
S. pasteuri	01/116 (0,86)	02/40 (5,00)
Staphylococcus spp.	05/116 (4,31)	1/40 (2,50)
S. saprophyticus	0/116 (0,00)	01/40 (2,50)
S. simulans	08/116 (6,90)	01/40 (2,50)
S. xylosus	02/116 (1,72)	0/40(0,00)
S. warneri	02/116 (1,72)	01/40 (2,50)

* ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos; Nº: Número; %: Porcentagem.

5.4 Teste de sensibilidade microbiana “in vitro”

5.4.1 Isolados de leite humano

Amoxacilina com ácido clavulânico (79,62%), vancomicina (73,25%) e cefalexina (71,34%) foram os antimicrobianos mais efetivos frente às linhagens isoladas de LH cru. As maiores taxas de resistência dos isolados foram verificadas para penicilina (89,81%), ampicilina (85,99%) e oxacilina (75,16%).

A multirresistência das linhagens para cinco ou mais antimicrobianos foi observada em 104/157 (66,24%) dos isolados (Tabela 16).

Tabela 16. Perfil de sensibilidade microbiana "in vitro", em estirpes isoladas de 240 amostras de leite provenientes do BLH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011.

	S	PS	R
Antimicrobianos	**Nº linhagens/total isolados (%)**		
Amoxacilina/ ácido clavulânico	125/157 (79,62)	5/157 (3,18)	27/157 (17,20)
Ampicilina	21/157 (13,38)	1/157 (0,64)	135/157 (85,99)
Cefalexina	112/157 (71,34)	6/157 (3,82)	39/157 (24,84)
Cefoperazona	94/157 (59,87)	50/157 (31,85)	13/157 (8,28)
Cefoxitina	66/157 (42,04)	5/157 (3,18)	86/157 (54,78)
Eritromicina	20/157 (12,74)	43/157 (27,39)	94/157 (59,87)
Gentamicina	96/157 (61,15)	9/157 (5,73)	52/157 (33,12)
Neomicina	56/157 (35,67)	61/157 (38,85)	40/157 (25,48)
Oxacilina	36/157 (22,93)	3/157 (1,91)	118/157 (75,17)
Penicilina G	15/157 (9,55)	1/157 (0,64)	141/157 (89,81)
Sulfa/trimetoprim	103/157 (65,61)	6/157 (3,82)	48/157 (30,57)
Vancomicina	115/157 (73,25)	0/157 (0,00)	42/157 (26,75)

* S: Sensível; PS: Parcialmente Sensível; R: Resistente; Nº: Número; %: Porcentagem.

** O número total de isolados refere-se aos micro-organismos isolados do LH, exceto *Bacillus* spp. e leveduras.

Vancomicina (100,00%), amoxacilina com ácido clavulânico (95,24%) e cefalexina (93,33%) foram os antimicrobianos mais efetivos frente aos *Staphylococcus* spp. isolados de LH. As maiores taxas de resistência das

linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de LH foram verificadas para ampicilina (93,33%), penicilina (91,43%) e oxacilina (66,67%). A multirresistência das linhagens para cinco ou mais antimicrobianos foi observada em 58/105 (55,24%) dos *Staphylococcus* spp. isolados (Tabela 17).

Tabela 17. Perfil de sensibilidade "in vitro", de 105 estirpes de *Staphylococcus* spp. isolados de 240 amostras de leite provenientes do BLH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011.

	S	PS	R
Antimicrobianos	**Nº linhagens/total isolados (%)**		
Amoxacilina/ ácido clavulânico	100/105 (95,24)	0/105 (0,00)	5/105 (4,76)
Ampicilina	07/105 (6,67)	0/105 (0,00)	98/105 (93,33)
Cefalexina	98/105 (93,33)	3/105 (2,86)	4/105 (3,81)
Cefoperazona	73/105 (69,52)	26/105 (24,76)	6/105 (5,71)
Cefoxitina	49/105 (46,67)	1/105 (0,95)	55/105 (52,38)
Eritromicina	17/105 (16,19)	33/105 (31,43)	55/105 (52,38)
Gentamicina	60/105 (57,14)	3/105 (2,86)	42/105 (40,00)
Neomicina	43/105 (40,95)	37/105 (35,24)	25/105 (23,81)
Oxacilina	32/105 (30,48)	3/105 (2,86)	70/105 (66,67)
Penicilina G	9/105 (8,57)	0/105 (0,00)	96/105 (91,43)
Sulfa/trimetoprim	71/105 (67,62)	2/105 (1,90)	32/105 (30,48)
Vancomicina	105/105 (100,00)	0/105 (0,00)	0/105 (0,00)

* S: Sensível; PS: Parcialmente Sensível; R: Resistente; Nº: Número; %: Porcentagem.

5.4.2 Isolados de leite de vacas

Nas amostras de leite de vacas com mastite foram observados maiores índices de sensibilidade dos isolados para amoxacilina com ácido clavulânico (87,07%), cefalexina (84,35%), cefoperazona (72,79%) e cefoxitina (72,79%). A maior frequência de resistência dos isolados foi frente a neomicina (61,90%), sulfa/trimetoprim (55,10%), gentamicina (53,06%) [Tabela 18].

Amoxacilina com ácido clavulânico (91,84%), cefalexina (85,7%) e vancomicina (77,55%) foram os antimicrobianos que apresentaram maior efetividade frente aos micro-organismos isolados do leite de vacas sem mastite. As linhagens revelaram maiores taxas de resistência frente a Sulfa/trimetoprim (73,47%), oxacilina (67,35%) e neomicina (42,86%) [Tabela 18].

A multirresistência a cinco ou mais antimicrobianos foi observada em 79/147 (53,74%) e 20/49 (40,82%) dos micro-organismos isolados de leite das vacas com e sem mastite, respectivamente.

Cefoxitina (93,62%), amoxacilina com ácido clavulânico (87,23%) e cefoxitina (85,11%) foram os antimicrobianos mais efetivos frente aos *Staphylococcus* spp. isolados de leite de vacas com mastite. As maiores taxas de resistência das linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas foram verificadas para neomicina (74,47%), gentamicina (68,09%) e eritromicina (59,57%) [Tabela 19].

Amoxacilina com ácido clavulânico (100,00%), cefalexina (93,33%) e vancomicina (86,67%) apresentaram maior efetividade frente aos isolados de *Staphylococcus* spp. isolados de leite de vacas sem mastite. Eritromicina (66,67%), gentamicina (60,00%) e neomicina (60,00%) foram os antimicrobianos com maiores taxas de resistência frente às linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas sem mastite (Tabela 19).

A multirresistência das linhagens para cinco ou mais antimicrobianos foi observada em 27/47 (57,45%) e 08/15 (53,33%) linhagens de *Staphylococcus* spp. isolados de leite de vacas com e sem mastite, respectivamente.

Tabela 18. Perfil de sensibilidade microbiana "in vitro" em estirpes isoladas de 200 amostras de leite de vacas com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

	Vacas com mastite			Vacas sem mastite		
	S	PS	R	S	PS	R
Antimicrobianos	Nº linhagens/total isolados (%)			Nº linhagens/total isolados (%)		
Amoxacilina / ácido clavulânico	128/147 (87,07)	08/147 (5,44)	11/147 (7,48)	45/49 (91,84)	2/49 (4,08)	2/49 (4,08)
Ampicilina	77/147 (52,38)	09/147 (6,12)	61/147 (41,50)	34/49 (69,39)	4/49 (8,16)	11/49 (22,45)
Cefalexina	124/147 (84,35)	08/147 (5,44)	15/147 (10,20)	42/49 (85,71)	2/49 (4,08)	5/49 (10,20)
Cefoperazona	107/147 (72,79)	27/147 (18,37)	13/147 (8,84)	36/49 (73,47)	9/49 (18,37)	4/49 (8,16)
Cefoxitina	107/147 (72,79)	21/147 (14,29)	19/147 (12,93)	36/49 (73,47)	3/49 (6,12)	10/49 (20,41)
Ceftiofur	104/149 (70,75)	20/149 (13,61)	23/147 (15,65)	34/49 (69,39)	7/49 (14,29)	8/49 (16,33)
Enrofloxacina	50/147 (34,01)	27/147 (18,37)	70/147 (47,62)	25/49 (51,02)	7/49 (14,29)	17/49 (34,69)
Eritromicina	43/147 (29,25)	40/147 (27,21)	64/147 (43,54)	21/49 (42,86)	7/49 (14,29)	21/49 (42,86)
Gentamicina	55/147 (37,41)	14/147 (9,52)	78/147 (53,06)	24/49 (48,98)	6/49 (12,24)	19/49 (38,78)
Neomicina	39/147 (26,53)	17/147 (11,56)	91/147 (61,90)	22/49 (44,90)	6/49 (12,24)	21/49 (42,86)
Oxacilina	68/147 (46,26)	06/147 (4,08)	73/147 (49,66)	13/49 (26,53)	3/49 (6,12)	33/49 (62,35)
Penicilina G	64/147 (43,54)	14/147 (9,52)	69/147 (46,94)	28/49 (57,14)	6/49 (12,24)	15/49 (30,61)
Sulfa/trimetoprim	37/147 (25,17)	29/147 (19,73)	81/147 (55,10)	12/49 (24,49)	1/49 (2,04)	36/49 (73,47)
Vancomicina	80/147 (54,42)	01/147 (0,68)	66/147 (44,90)	38/49 (77,55)	0/49 (0,00)	11/49 (22,45)

* S: Sensível; PS: Parcialmente Sensível; R: Resistente; Nº: Número; %: Porcentagem.

** O número total de isolados refere-se aos micro-organismos isolados do leite de vacas com e sem mastite, exceto *Bacillus* spp. e leveduras.

Tabela 19. Perfil de sensibilidade "in vitro" de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de 200 amostras de leite de vacas com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

	Vacas com mastite			**Vacas sem mastite**		
	S	**PS**	**R**	**S**	**PS**	**R**
Antimicrobianos	**Nº linhagens/total de *Staphylococcus* spp. isolados (%)**			**Nº linhagens/total de *Staphylococcus* spp. isolados (%)**		
Amoxacilina / ácido clavulânico	41/47 (87,23)	0/47 (0,00)	06/47 (12,77)	15/15 (100,00)	0/15 (0,00)	0/15 (0,00)
Ampicilina	24/47 (51,06)	0/47 (0,00)	23/47 (48,94)	09/15 (60,00)	0/15 (0,00)	06/15 (40,00)
Cefalexina	44/47 (93,62)	01/47 (2,13)	02/47 (4,26)	14/15 (93,33)	0/15 (0,00)	01/15 (6,67)
Cefoperazona	37/47 (78,72)	08/47 (17,02)	02/47 (4,26)	11/15 (73,33)	03/15 (20,00)	01/15 (6,67)
Cefoxitina	40/47 (85,11)	01/47 (2,13)	06/47 (12,77)	10/15 (66,67)	0/15 (0,00)	05/15 (33,33)
Ceftiofur	37/47 (78,72)	07/47 (14,89)	03/47 (6,38)	09/15 (60,00)	04/15 (26,67)	02/15 (13,33)
Enrofloxacina	22/47 (46,81)	03/47 (6,38)	22/47 (46,81)	08/15 (53,33)	01/15 (6,67)	06/15 (40,00)
Eritromicina	04/47 (8,51)	15/47 (31,91)	28/47 (59,57)	01/15 (6,67)	04/15 (26,67)	10/15 (66,67)
Gentamicina	11/47 (23,40)	04/47 (8,51)	32/47 (68,09)	05/15 (33,33)	01/15 (6,67)	09/15 (60,00)
Neomicina	06/47 (12,77)	06/47 (12,77)	35/47 (74,47)	05/15 (33,33)	01/15 (6,67)	09/15 (60,00)
Oxacilina	32/47 (68,09)	0/47 (0,00)	15/47 (31,91)	07/15 (46,67)	0/15 (0,00)	08/15 (53,33)
Penicilina G	21/47 (44,68)	0/47 (0,00)	26/47 (55,32)	08/15 (53,33)	0/15 (0,00)	07/15 (46,67)
Sulfa/trimetoprim	14/47 (29,79)	06/47 (12,77)	27/47 (57,45)	08/15 (53,33)	0/15 (0,00)	07/15 (46,67)
Vancomicina	30/47 (63,83)	0/47 (0,00)	17/47 (36,17)	13/15 (86,67)	0/15 (0,00)	02/15 (13,33)

* S: Sensível; PS: Parcialmente Sensível; R: Resistente; Nº: Número; %: Porcentagem.

5.4.3 Isolados de leite de cabras

Amoxacilina com ácido clavulânico (96,06%), cefalexina (94,49%) e vancomicina (94,49%) foram os antimicrobianos mais efetivos frente aos micro-organismos isolados do leite de cabras com mastite. As maiores taxas de resistência dos isolados foram observadas para eritromicina (72,44%), neomicina (72,44%) e sulfa/trimetoprim (69,29%) [Tabela 20].

As linhagens isoladas do leite de cabras sem mastite foram sensíveis principalmente para cefalexina (97,73%), amoxacilina com ácido clavulânico (95,35%) e ceftiofur (88,37%). A resistência das linhagens isoladas de leite de cabras sem mastite foi observada predominantemente para sulfa/trimetoprim (84,09%), enrofloxacina (68,18%) e eritromicina (68,18%) [Tabela 20].

A multirresistência a cinco ou mais antimicrobianos foi observada em 84/127 (66,14%) e 32/44 (72,73%) dos micro-organismos isolados de amostras de leite de cabras com e sem mastite, respectivamente.

Amoxacilina com ácido clavulânico (97,41%), cefalexina (96,55%) e cefoxitina (93,10%) foram os antimicrobianos mais efetivos frente às linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de cabras com mastite. As maiores taxas de resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. foram observadas para neomicina (75,00%), eritromicina (74,14%) e sulfa/trimetoprim (70,69%) [Tabela 21].

As linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas do leite de cabras sem mastite foram sensíveis principalmente para cefalexina (100,00%), amoxacilina com ácido clavulânico (97,50%) e ceftiofur (90,00%). A resistência das linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de cabras sem mastite foi observada predominantemente para sulfa/trimetoprim (87,50%), enrofloxacina (75,00%) e eritromicina (75,00%) [Tabela 21].

A multirresistência a cinco ou mais antimicrobianos foi observada em 79/116 (68,10%) e 31/40 (77,50%) das linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite de cabras com e sem mastite, respectivamente.

Tabela 20. Perfil de sensibilidade microbiana "in vitro", em estirpes isoladas de 200 amostras de leite de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

	Cabras com mastite			Cabras sem mastite		
	S	PS	R	S	PS	R
Antimicrobianos	Nº linhagens/total isolados (%)			Nº linhagens/total isolados (%)		
Amoxacilina / ácido clavulânico	122/127 (96,06)	01/127 (0,79)	04/127 (3,15)	42/44 (95,45)	0/44 (0,00)	02/44 (4,55)
Ampicilina	47/127 (37,01)	03/127 (2,36)	77/127 (60,63)	17/44 (38,64)	01/44 (2,27)	26/44 (59,09)
Cefalexina	120/127 (94,49)	0/127 (0,00)	07/127 (5,51)	43/44 (97,73)	0/44 (0,00)	01/44 (2,27)
Cefoperazona	86/127 (67,72)	34/127 (26,77)	07/127 (5,51)	34/44 (77,27)	08/44 (18,18)	02/44 (4,55)
Cefoxitina	115/127 (90,55)	01/127 (0,79)	11/127 (8,66)	38/44 (86,36)	0/44 (0,00)	06/44 (13,64)
Ceftiofur	101/127 (79,53)	12/127 (9,45)	14/127 (11,02)	39/44 (88,64)	02/44 (4,55)	03/44 (6,82)
Enrofloxacina	27/127 (21,26)	21/127 (16,54)	79/127 (62,20)	09/44 (20,45)	05/44 (11,36)	30/44 (68,18)
Eritromicina	16/127 (12,60)	19/127 (14,96)	92/127 (72,44)	07/44 (15,91)	07/44 (15,91)	30/44 (68,18)
Gentamicina	38/127 (29,92)	08/127 (6,30)	81/127 (63,78)	16/44 (36,36)	01/44 (2,27)	27/44 (61,36)
Neomicina	19/127 (14,96)	16/127 (12,60)	92/127 (72,44)	11/43 (25,00)	03/44 (9,09)	29/44 (65,91)
Oxacilina	98/127 (77,17)	03/127 (2,36)	26/127 (20,47)	32/44 (72,73)	0/44 (0,00)	12/44 (27,27)
Penicilina G	46/127 (36,22)	0/127 (0,00)	81/127 (63,78)	20/44 (45,45)	02/44 (4,55)	22/44 (50,00)
Sulfa/trimetoprim	37/127 (29,13)	02/127 (1,57)	88/127 (69,29)	07/44 (15,91)	0/44 (0,00)	37/44 (84,09)
Vancomicina	120/127 (94,49)	0/127 (0,00)	07/127 (5,51)	42/44 (95,45)	0/44 (0,00)	02/44 (4,55)

* S: Sensível; PS: Parcialmente Sensível; R: Resistentem; Nº: Número; %: Porcentagem.

** O número total de isolados refere-se aos micro-organismos isolados do leite de cabras com e sem mastite, exceto *Bacillus* spp. e leveduras.

Tabela 21. Perfil de sensibilidade "in vitro" de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de 200 amostras de leite de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

	Cabras com mastite			**Cabras sem mastite**		
	S	**PS**	**R**	**S**	**PS**	**R**
Antimicrobianos	**Nº linhagens/total de *Staphylococcus* spp. isolados (%)**			**Nº linhagens/total de *Staphylococcus* spp. isolados (%)**		
Amoxacilina / ácido clavulânico	113/116 (97,41)	0/116 (0,00)	3/116 (2,59)	39/40 (97,50)	0/40 (0,00)	1/40 (2,50)
Ampicilina	42/116 (36,21)	0/116 (0,00)	74/116 (63,79)	16/40 (40,00)	0/40 (0,00)	24/40 (60,00)
Cefalexina	112/116 (96,55)	0/116 (0,00)	4/116 (3,45)	40/40 (100,00)	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)
Cefoperazona	79/116 (68,10)	31/116 (26,72)	6/116 (5,17)	31/40 (77,50)	7/40 (17,50)	2/40 (5,00)
Cefoxitina	108/116 (93,10)	0/116 (0,00)	8/116 (6,90)	35/40 (87,50)	0/40 (0,00)	5/40 (12,50)
Ceftiofur	95/116 (81,90)	10/116 (8,62)	11/116 (9,48)	36/40 (90,00)	2/40 (5,00)	2/40 (5,00)
Enrofloxacina	23/116 (19,83)	17/116 (14,66)	76/116 (65,52)	6/40 (15,00)	4/40 (10,00)	30/40 (75,00)
Eritromicina	13/116 (11,21)	17/116 (14,66)	86/116 (74,14)	4/40 (10,00)	6/40 (15,00)	30/40 (75,00)
Gentamicina	29/116 (25,00)	8/116 (6,90)	79/116 (68,10)	12/40 (30,00)	1/40 (2,50)	27/40 (67,50)
Neomicina	17/116 (14,66)	12/116 (10,34)	87/116 (75,00)	7/40 (17,50)	4/40 (10,00)	29/40 (72,50)
Oxacilina	93/116 (80,17)	3/116 (2,59)	20/116 (17,24)	30/40 (75,00)	0/40 (0,00)	10/40 (25,00)
Penicilina G	43/116 (37,07)	0/116 (0,00)	73/116 (62,93)	18/40 (45,00)	0/40 (0,00)	22/40 (55,00)
Sulfa/trimetoprim	33/116 (28,45)	1/116 (0,86)	82/116 (70,69)	5/40 (12,50)	0/40 (0,00)	35/40 (87,50)
Vancomicina	94/116 (81,03)	0/116 (0,00)	22/116 (18,97)	28/40 (70,00)	0/40 (0,00)	12/40 (30,00)

* S: Sensível; PS: Parcialmente Sensível; R: Resistentem; Nº: Número; %: Porcentagem.

5.5 Detecção de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana no leite

5.5.1 Leite humano

Das 240 amostras de leite humano testadas, em 204 (85,00%) foi detectada a presença de resíduos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana.

5.5.2 Leite de vacas

Dentre as amostras de leite de vacas com e sem mastite, em 57/200 (28,50%) e 48/200 (24,00%), respectivamente, foi detectada a presença de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras de multiplicação microbiana (Tabela 22).

A comparação entre a ocorrência de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras de multiplicação microbiana em leite de vacas, com e sem mastite, não apresentou diferença estatística significante (p>0,05) [Tabela 22].

Tabela 22: Comparação dos resultados referente a presença de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana em 200 amostras de leite cru de vacas com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando o teste de qui-quadrado. Botucatu, 2011.

Vacas	Resíduos de antimicrobianos			
	Positivo		Negativo	
	Nº	%	Nº	%
Com mastite	57	28,50	143	71,50
Sem mastite	48	24,00	152	76,00

* Nº: Número; %: Porcentagem; Valor de p (χ^2) =0,3633.

5.5.3 Leite de cabras

Das amostras de leite de cabras com e sem mastite, em 42/200 (21,00%) e 23/200 (11,50%), respectivamente, foi detectado a presença de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras de multiplicação microbiana.

Foi verificada significância estatística (p<0,05) ao comparar a presença de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana em leite de cabras com e sem mastite (Tabela 23).

Tabela 23: Comparação dos resultados referente à presença de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana em 200 amostras de leite cru de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando o teste de qui-quadrado. Botucatu, 2011.

Cabras	Resíduos de antimicrobianos			
	Positivo		Negativo	
	Nº	%	Nº	%
Com mastite	42	21,00	158	79,00
Sem mastite	23	11,50	177	88,50

* Nº: Número; %: Porcentagem; Valor de p (χ^2) =0,0147.

5.6 Investigação fenotípica e genotípica de linhagens MRS e pesquisa de hemólise e toxinas

As linhagens de ECP e ECN isoladas de LH e de leite de vacas e cabras, com e sem mastite, escolhidas com base no antibiograma, com o intuito de avaliar a detecção fenotípica e genotípica de estirpes MRS, a presença de hemólise em ágar acrescido de sangue bovino, bem como a detecção de linhagens com genes *sea, seb*, *sec*, *sed*, *tsst*-1 e produtoras de toxinas SEA, SEB, SEC, SED e TSST-1 estão descritas no quadro 03.

Quadro 03: Número de linhagens de ECP e ECN isolados de leite cru de mulheres, de vacas e cabras com e sem mastite, submetidas a caracterização fenotípica e genotípica de linhagens MRS e pesquisa de toxinas. Botucatu, SP, 2011.

	Mulheres	Vacas com mastite	Vacas sem mastite	Cabras com mastite	Cabras sem mastite
Espécie	**Nº estirpes**	**Nº estirpes**	**Nº estirpes**	**Nº estirpes**	**Nº estirpes**
ECP					
S. aureus	05	16	01	16	01
Staphylococcus spp.	10	0	0	0	0
S. intermedius	0	04	0	0	0
Total	15	20	01	16	01
ECN					
S. auricularis	0	0	0	02	0
S. capitis ureolyticus	0	0	0	01	01
S. caprae	0	0	0	01	0
S. chromogenes	0	03	03	01	0
S. epidermidis	25	03	01	04	09
S. haemolyticus	0	03	0	0	0
S. lugdunensis	01	0	0	03	05
S. pasteuri	0	02	01	01	01
S. saprophyticus	06	04	01	0	01
S. simulans	02	01	03	05	01
S. warneri	0	01	02	01	01
Staphylococcus spp.	04	03	03	0	01
S. xylosus	02	0	0	01	0
Total	40	20	14	20	20

* Nº: Número; ECP: Estafilococos coagulase positivo; ECN: Estafilococos coagulase negativo.

5.6.1 Teste de difusão com discos e CIM para detecção fenotípica de MRS

5.6.1.1 ECP e ECN isolados de leite humano

Foram avaliadas 15 linhagens de ECP isoladas de LH. Destas, cinco (33,33%) apresentaram resistência frente aos discos de oxacilina e/ou cefoxitina, enquanto 14 (93,33%) foram resistentes à penicilina. Apenas uma (6,67%) estirpe classificada como *Staphylococcus* spp. apresentou resistência simultânea frente aos discos de oxacilina, penicilina e a fita de oxacilina.

Dentre as 105 linhagens de ECN isoladas, 40 foram submetidas a detecção fenotípica de MRS. Vinte e sete linhagens de ECN (67,50%) apresentaram resistência ao disco de oxacilina e/ou cefoxitina, enquanto 38 (95,00%) apresentaram resistência para penicilina. Foi observada resistência à fita de oxacilina em 18 (45,00%) linhagens de ECN. A detecção fenotípica e genotípica dos isolados MRS está apresentada na Tabela 24.

Ao comparar a ocorrência de MRS entre linhagens de ECP e ECN isolados de leite humano utilizando-se métodos fenotípicos foi constatada diferença estatística significante ($p<0,05$) apenas para a prova de CIM com oxacilina. Não foi verificada diferença estatística significante entre ECP e ECN isolados de LH para resistência frente à cefoxitina, oxacilina e penicilina (Tabela 25).

5.6.1.2 ECP e ECN isolados de leite de vacas

Dos ECP avaliados de vacas com mastite, em 06/20 linhagens (30,00%) foi constatada resistência frente aos discos de oxacilina e 12/20 (60,00%) à penicilina. Nenhuma linhagem de ECP apresentou resistência frente à cefoxitina e a fita impregnada com oxacilina.

Das 20 linhagens de ECN avaliadas provenientes do leite de vacas mastíticas, 06/20 (30,00) apresentaram resistência frente aos discos de cefoxitina e/ou oxacilina, e 09/20 (45,00%) foram resistentes a penicilina. A ocorrência de resistência e sensibilidade parcial dos isolados às fitas de oxacilina foi verificada em 04 (20,00%) e 02 (10,00%) linhagens de ECN, respectivamente. Uma linhagem de *S. pasteuri* foi resistente na CIM para oxacilina, porém apresentou sensibilidade frente aos discos de oxacilina, cefoxitina e penicilina (Tabela 26).

Foi observada diferença estatística significante ($p<0,05$) entre ECP e ECN isolados de leite de vacas com mastite para cefoxitina e CIM à oxacilina. Porém, não foi verificada diferença estatística significante entre estas linhagens isoladas de vacas com mastite para resistência à oxacilina e penicilina (Tabela 27).

A única estirpe de *S. aureus* isolada do leite de vacas sem mastite foi resistente ao disco de oxacilina, mas não apresentou resistência à fita de oxacilina. Dentre as 14 linhagens de ECN pesquisadas, 09/14 (64,28%)

apresentaram resistência frente aos discos de cefoxitina e/ou oxacilina, e 06/14 (42,86%) foram resistentes a penicilina. Na detecção da CIM, 02/14 linhagens (14,29%) identificadas como *S. epidermidis* e *S. simulans* foram resistentes à fita de oxacilina (Tabela 28).

Não houve diferença estatística significante ao comparar o perfil de sensibilidade microbiana e a concentração inibitória mínima para oxacilina entre as linhagens de ECN isoladas de vacas com e sem mastite (Tabela 29).

5.6.1.3 ECP e ECN isolados de leite de cabras

Dentre as linhagens de *S. aureus* obtidas de cabras com mastite, 07/16 isolados (43,75%) apresentaram resistência aos discos de penicilina e 01/16 (6,25%) aos discos de oxacilina e penicilina. Nenhuma estirpe de ECP apresentou resistência à fita de oxacilina. Nos isolados de ECN, 06/20 (30,00%) apresentaram resistência frente aos discos de cefoxitina e/ou oxacilina, e 13/20 (65,00%) à penicilina. A resistência à fita de oxacilina foi verificada em 04/20 (20,00%) ECN isolados de leite de cabras mastíticas, dos quais uma linhagem de *S. simulans* apresentou sensibilidade aos discos de cefoxitina, oxacilina e penicilina (Tabela 30).

Não houve diferença estatística significante ao comparar o perfil de sensibilidade microbiana e a CIM para oxacilina entre linhagens de ECP e ECN isoladas de cabras com mastite (Tabela 31).

A única estirpe de *S. aureus* isolada de leite de cabras sem mastite foi sensível aos discos de cefoxitina, oxacilina, penicilina e a CIM para oxacilina. Das linhagens de ECN isoladas de leite de cabras sem mastite, 12/20 (60,00%) foram resistentes a cefoxitina e/ou oxacilina, e 11/20 (55,00%) à penicilina. Todas as linhagens de ECP e ECN isoladas de leite de cabras negativas para mastite foram sensíveis a CIM para oxacilina (Tabela 32).

Ao avaliar o perfil de sensibilidade para cefoxitina, oxacilina, penicilina e a CIM para oxacilina não foi constada diferença estatística significante entre as linhagens de ECN obtidas de leite de cabras com e sem mastite (Tabela 33).

Tabela 24: Detecção fenotípica e genotípica de linhagens MRS isoladas de leite humano proveniente do BLH, do HC da Faculdade de Medicina da UNESP, Botucatu, SP, 2011.

Resistência / Estafilococos	Cefoxitina Nº de estirpes/total de estirpes (%)	Oxacilina Nº estirpes/total de estirpes (%)	Penicilina Nº estirpes/total de estirpes (%)	CIM à oxacilina Nº estirpes/total de estirpes (%)	Gene *mecA* Nº estirpes/total estirpes (%)
ECP					
S. aureus	01/15 (6,67)	02/15 (13,33)	05/15 (33,33)	0/15 (0,00)	02/15 (13,33)
Staphylooccus spp.	02/15 (13,33)	03/15 (20,00)	09/15 (60,00)	1/15 (6,67)	06/15 (40,00)
Total	03/15 (20,00)	05/15 (33,33)	14/15 (93,33)	01/15 (6,67)	08/15 (53,33)
ECN					
S. epidermidis	13/40 (32,50)	16/40 (40,00)	25/40 (62,50)	12/40 (30,00)	22/40 (55,00)
S. lugdunensis	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)	01/40 (2,50)	01/40 (2,50)	0/40 (0,00)
S. saprophyticus	03/40 (7,50)	04/40 (10,00)	05/40 (12,50)	02/40 (5,00)	03/40 (7,50)
S. simulans	01/40 (2,50)	01/40 (2,50)	02/40 (5,00)	01/40 (2,50)	02/40 (5,00)
Staphylococcus spp.	03/40 (7,50)	02/40 (5,00)	03/40 (7,50)	0/40 (0,00)	02/40 (5,00)
S. xylosus	01/40 (2,50)	01/40 (2,50)	02/40 (5,00)	02/40 (5,00)	01/40 (2,50)
Total	21/40 (52,50)	24/40 (60,00)	38/40 (95,00)	18/40 (45,00)	30/40 (75,00)

* Nº: Número; %: Porcentagem; CIM: Concentração inibitória mínima; *mecA:* Gene codificador para resistência à meticilina; ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos. Botucatu, SP, 2011.

Tabela 25: Comparação do perfil de sensibilidade microbiana e concentração inibitória mínima da oxacilina entre linhagens de ECP e ECN isolados de leite humano proveniente do BLH do HC da Faculade de Medicina da UNESP, utilizando os testes G-Williams e Fisher. Botucatu, SP. 2011.

	ECP			**ECN**		
	S	**PS**	**R**	**S**	**PS**	**R**
Antimicrobianos	**Nº linhagens/total linhagens (%)**			**Nº linhagens/total linhagens (%)**		
Cefoxitina	11/15 (73,33)	1/15 (6,67)	3/15 (20,00)	19/40 (47,50)	0/40 (0,00)	21/40 (52,50)
Oxacilina	8/15 (53,33)	02/15 (13,33)	5/15 (33,33)	15/40 (37,50)	1/40 (2,25)	24/40 (60,00)
Penicilina	1/15 (6,67)	0/15 (0,00)	14/15 (93,33)	2/40 (5,00)	0/40 (0,00)	38/40 (95,00)
CIM	13/15 (86,66)	1/15 (6,67)	1/15 (6,67)	21/40 (52,50)	1/40 (2,50)	18/40 (45,00)

* ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos; S: Sensível; PS: Parcialmente sensível; R: Resistente; Nº: Número; %: Porcentagem; CIM: Concentração inibitória mínima.

** Cefoxitina: Valor de p (G-Willians) = 0,0774; Oxacilina: Valor de p (G-Williams) = 0,1529; Penicilina: Valor de p (Fisher) =0,623404; CIM: Valor de p (G-Williams) = 0,0268.

Tabela 26: Detecção fenotípica e genotípica de linhagens MRS isoladas de leite de vacas com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Resistência	Cefoxitina	Oxacilina	Penicilina	CIM à oxacilina	Gene *mecA*
Estafilococos	Nº de estirpes/total de estirpes (%)	Nº estirpes/total de estirpes (%)	Nº estirpes/total de estirpes (%)	Nº estirpes/total de estirpes (%)	Nº estirpes/total estirpes (%)
ECP					
S. aureus	0/20 (0,00)	05/20 (25,00)	09/20 (45,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. intermedius	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	03/20 (15,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
Total	0/20 (0,00)	06/20 (30,00)	12/20 (60,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
ECN					
S. chromogenes	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	02/20 (10,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. epidermidis	02/20 (10,00)	02/20 (10,00)	02/20 (10,00)	02/20 (10,00)	02/20 (10,00)
S. haemolyticus	01/20 (5,00)	01/20 (5,00)	02/20 (10,00)	01/20 (5,00)	01/20 (5,00)
S. pasteuri	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	02/20 (10,00)
S. saprophyticus	02/20 (10,00)	01/20 (5,00)	02/20 (10,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
S. simulans	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
Staphylococcus spp.	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. warneri	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
S. xylosus	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
Total	05/20 (25,00)	05/20 (25,00)	09/20 (45,00)	04/20 (20,00)	08/20 (40,00)

* Nº: Número; %: Porcentagem; CIM: Concentração inibitória mínima; *mecA:* Gene codificador para resistência à meticilina; ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos. Botucatu, SP, 2011.

Tabela 27: Comparação do perfil de sensibilidade microbiana e concentração inibitória mínima da oxacilina entre linhagens de ECP e ECN isoladas do leite de vacas com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando os testes G-Williams e qui-quadrado. Botucatu, 2011.

	Vacas com mastite					
	ECP			**ECN**		
	S	**PS**	**R**	**S**	**PS**	**R**
Antimicrobianos	**Nº linhagens/total de linhagens (%)**			**Nº linhagens/total de linhagens (%)**		
Cefoxitina	19/20 (95,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	15/20 (75,00)	0/20 (0,00)	05/20 (25,00)
Oxacilina	14/20 (70,00)	0/20 (0,00)	06/20 (30,00)	15/20 (75,00)	0/20 (0,00)	05/20 (25,00)
Penicilina	8/20 (40,00)	0/20 (0,00)	12/20 (60,00)	11/20 (55,00)	0/20 (0,00)	09/20 (45,00)
CIM	20/20 (100,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	14/20 (70,00)	02/20 (10,00)	04/20 (20,00)

* ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos; S: Sensível; PS: Parcialmente sensível; R: Resistente; Nº: Número; %: Porcentagem; CIM: Concentração inibitória mínima.

** Cefoxitina: Valor de p (G-Williams)=0,0341; Oxacilina: Valor de p (χ^2)=1,0000; Penicilina: Valor de p (χ^2)=0,5266; CIM: Valor de p (G-Williams)=0,0193.

Tabela 28: Detecção fenotípica e genotípica de linhagens MRS isoladas de leite de vacas sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Resistência / Estafilococos	Cefoxitina Nº de estirpes/total de estirpes (%)	Oxacilina Nº estirpes/total de estirpes (%)	Penicilina Nº estirpes/total de estirpes (%)	CIM à oxacilina Nº estirpes/total de estirpes (%)	Gene *mecA* Nºestirpes/total estirpes (%)
ECP					
S. aureus	0/01 (0,00)	01/01 (100,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)
Total	0/01 (0,00)	01/01 (100,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)
ECN					
S. chromogenes	0/14 (0,00)	02/14 (14,29)	02/14 (14,29)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)
S. epidermidis	0/14 (0,00)	01/14 (7,14)	01/14 (7,14)	01/14 (7,14)	01/14 (7,14)
S. pasteuri	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)
S. saprophyticus	0/14 (0,00)	01/14 (7,14)	01/14 (7,14)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)
S. simulans	0/14 (0,00)	01/14 (7,14)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)	01/14 (7,14)
Staphylococcus spp.	01/14 (7,14)	01/14 (7,14)	01/14 (7,14)	01/14 (7,14)	0/14 (0,00)
S. warneri	01/14 (7,14)	02/14 (14,29)	01/14 (7,14)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)
Total	02/14 (14,29)	08/14 (57,14)	06/14 (42,86)	02/14 (14,29)	02/14 (14,29)

* Nº: Número; %: Porcentagem; CIM: Concentração inibitória mínima; *mecA:* Gene codificador para resistência à meticilina; ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos. Botucatu, SP, 2011.

Tabela 29: Comparação do perfil de sensibilidade microbiana e concentração inibitória mínima da oxacilina em linhagens de ECN isoladas do leite de vacas com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando os testes G-Williams, Fisher e qui-quadrado. Botucatu, 2011.

	ECN					
	Vacas com mastite			**Vacas sem mastite**		
	S	**PS**	**R**	**S**	**PS**	**R**
Antimicrobianos	**Nº linhagens/total linhagens (%)**			**Nº linhagens/total linhagens (%)**		
Cefoxitina	19/20 (95,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	12/14 (85,71)	0/14 (0,00)	02/14 (14,29)
Oxacilina	14/20 (70,00)	0/20 (0,00)	06/20 (30,00)	06/14 (42,86)	0/14 (0,00)	08/14 (57,14)
Penicilina	08/20 (40,00)	0/20 (0,00)	12/20 (60,00)	08/14 (57,14)	0/14 (0,00)	06/14 (42,86)
CIM	14/20 (70,00)	02/20 (10,00)	04/20 (20,00)	12/14 (85,71)	0/14 (0,00)	02/14 (14,29)

* ECN: Estafilococos coagulase negativos; S: Sensível; PS: Parcialmente sensível; R: Resistente; Nº: Número; %: Porcentagem; CIM: Concentração inibitória mínima.

** Cefoxitina: Valor de p (Fisher)=0,3775; Oxacilina: Valor de p (χ^2)=0,1237; Penicilina: Valor de p (χ^2)=0,8204; CIM: Valor de p (G-Williams)=0,3394.

Tabela 30: Detecção fenotípica e genotípica de linhagens MRS isoladas de leite de cabras com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Resistência	Cefoxitina	Oxacilina	Penicilina	CIM à oxacilina	Gene *mecA*
Estafilococos	Nº de estirpes/total de estirpes (%)	Nº estirpes/total de estirpes (%)	Nº estirpes/total de estirpes (%)	Nº estirpes/total de estirpes (%)	Nº estirpes/total estirpes (%)
ECP					
S. aureus	0/16 (0,00)	01/16 (6,25)	07/16 (43,75)	0/16 (0,00)	01/16 (6,25)
Total	0/16 (0,00)	01/16 (6,25)	07/16 (43,75)	0/16 (0,00)	01/16 (6,25)
ECN					
S. auricularis	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	01/20 (5,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)
S. capitis urealyicus	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
S. caprae	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. chromogenes	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. epidermidis	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	03/20 (15,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
S. lugdunensis	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	03/20 (15,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
S. pasteuri	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. simulans	02/20 (10,00)	01/20 (5,00)	02/20 (10,00)	03/20 (15,00)	03/20 (15,00)
S. xylosus	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. warneri	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
Total	03/20 (15,00)	04/20 (20,00)	13 (65,00)	4/20 (20,00)	07/20 (35,00)

* Nº: Número; %: Porcentagem; CIM: Concentração inibitória mínima; *mecA:* Gene codificador para resistência à meticilina; ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos. Botucatu, SP, 2011.

Tabela 31: Comparação do perfil de sensibilidade microbiana e concentração inibitória mínima da oxacilina entre linhagens de ECP e ECN isoladas do leite de cabras com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando os testes de Fisher, G-Williams e qui-quadrado. Botucatu, SP. 2011.

	Cabras com mastite					
	ECP			**ECN**		
	S	**PS**	**R**	**S**	**PS**	**R**
Antimicrobianos	**Nº linhagens/total linhagens (%)**			**Nº linhagens/total linhagens (%)**		
Cefoxitina	16/16 (100,00)	0/16 (0,00)	0/16 (0,00)	17/20 (85,00)	0/20 (0,00)	03/20 (15,00)
Oxacilina	12/16 (75,00)	03/16 (18,75)	01/16 (6,25)	15/20 (75,00)	01/20 (5,00)	04/20 (20,00)
Penicilina	09/16 (56,25)	0/16 (0,00)	07/16 (43,75)	07/20 (35,00)	0/20 (0,00)	13/20 (65,00)
CIM	16/16 (100,00)	0/16 (0,00)	0/16 (0,00)	16/20 (80,00)	0/20 (0,00)	04/20 (20,00)

* ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos; S: Sensível; PS: Parcialmente sensível; R: Resistente; Nº: Número; %: Porcentagem; CIM: Concentração inibitória mínima.

** Cefoxitina: Valor de p (Fisher)=0,1596; Oxacilina: Valor de p (G-Williams)=0,2276; Penicilina: Valor de p (χ^2)=0,3485; CIM: Valor de p (Fisher)=0,0822.

Tabela 32: Detecção fenotípica e genotípica de linhagens MRS isoladas de leite de cabras sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Resistência	**Cefoxitina**	**Oxacilina**	**Penicilina**	**CIM à oxacilina**	**Gene *mecA***
Estafilococos	**Nº de estirpes/total de estirpes (%)**	**Nº estirpes/total de estirpes (%)**	**Nº estirpes/total de estirpes (%)**	**Nº estirpes/total de estirpes (%)**	**Nº estirpes/total estirpes (%)**
ECP					
S. aureus	0/01 (0,00)	01/01 (100,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)
Total	0/01 (0,00)	01/01 (100,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)
ECN					
S. capitis urealyicus	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
S. epidermidis	03/20 (15,00)	04/20 (20,00)	07/20 (35,00)	0/20 (0,00)	08/20 (40,00)
S. lugdunensis	01/20 (5,00)	03/20 (15,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
S. pasteuri	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
S. saprophyticus	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
S. simulans	01/20 (5,00)	01/20 (5,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
Staphylococcus spp.	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
S. warneri	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)
Total	05/20 (25,00)	10/20 (50,00)	11/20 (55,00)	0/20 (0,00)	15/20 (75,00)

* Nº: Número; %: Porcentagem; CIM: Concentração inibitória mínima; *mecA:* Gene codificador para resistência à meticilina; ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos.

Tabela 33: Comparação do perfil de sensibilidade microbiana e CIM da oxacilina em linhagens de ECN isoladas do leite de cabras com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo, utilizando os testes de Fisher, qui-quadrado e G-Williams. Botucatu, 2011.

	ECN					
	Cabras com mastite			Cabras sem mastite		
	S	PS	R	S	PS	R
Antimicrobianos	Nº linhagens/total de linhagens (%)			Nº linhagens/total de linhagens (%)		
Cefoxitina	17/20 (85,00)	0/20 (0,00)	03/20 (15,00)	15/20 (75,00)	0/20 (0,00)	05/20 (25,00)
Oxacilina	15/20 (75,00)	01/20 (5,00)	04/20 (20,00)	10/20 (50,00)	0/20 (0,00)	10/20 (50,00)
Penicilina	07/20 (35,00)	0/20 (0,00)	13/20 (65,00)	09/20 (45,00)	0/20 (0,00)	11/20 (55,00)
CIM	16/20 (80,00)	0/20 (0,00)	04/20 (20,00)	20/20 (100,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)

* ECN: Estafilococos coagulase negativos; S: Sensível; PS: Parcialmente sensível; R: Resistente; Nº: Número; %: Porcentagem; CIM: Concentração inibitória mínima.

** Cefoxitina: Valor de p (Fisher)=0,34738; Oxacilina: Valor de p (χ^2)=0,1373; Penicilina: Valor de p (χ^2)=0,7468; CIM: Valor de p (Fisher)=0,0530.

5.6.2 Detecção genotípica de linhagens MRS

5.6.2.1 ECP e ECN isolados de leite humano

A presença do gene *mecA* foi observada em 8/15 (53,33%) linhagens de ECP, das quais 06 (75,00%) correspondentes a *Staphylococcus* spp. e 02 (25,00%) a *S. aureus*. Dentre as linhagens de ECN, em 30/40 (75,00%) foi detecatada a presença do gene *mecA*. Destas, 22/40 linhagens (55,00%) foram representadas por *S. epidermidis* (Figura 11).

Em duas (13,33%) linhagens de ECP não foi detectado o gene que confere resistência a meticilina. Em contraste, ambas apresentaram resistência frente aos discos de oxacilina e/ou cefoxitina e penicilina. Em 09 (22,50%) estirpes de ECN não foi detectado o gene *mecA*. No entanto, estas linhagens

apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos testados e duas (5,00%) também foram resistentes na CIM para oxacilina (Tabela 24).

Não foi verificada diferença estatística significante (p>0,05) entre linhagens de ECP e ECN isoladas de LH, quanto a detecção do gene *mecA* (Tabela 34).

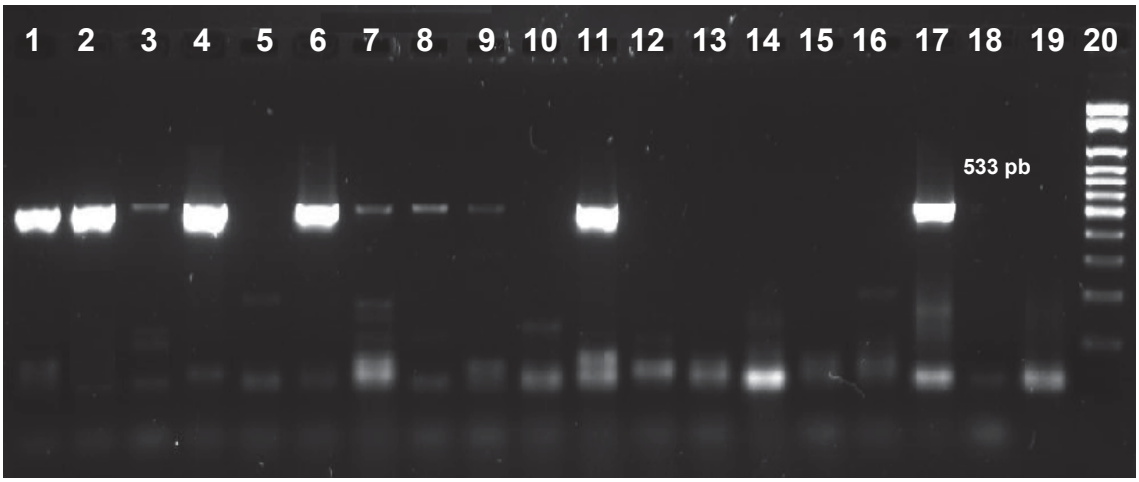


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *mecA* em linhagens de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite humano provenientes do BLH do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. 1-16: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 17: controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591); 18: controle negativo (*S. aureus* ATCC 25923); 19: água MilliQ esterilizada; 20: 100 pb DNA ladder. Botucatu, SP, 2011.

Tabela 34: Comparação entre ECP e ECN isolados de leite humano, provenientes do BLH do HC da Faculdade de Medicina da UNESP, quanto a presença do gene *mecA* utilizando o teste de Fisher. Botucatu, SP. 2011.

Micro-organismo	Detecção do Gene *mecA*					
	Negativos		Positivos		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
ECP	7	46,67	8	53,33	15	27,28
ECN	10	25,00	30	75,00	40	72,72
TOTAL	17	30,90	38	69,10	55	100,0

* ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos; *mecA* Gene codificador para resistência à meticilina Nº: Número; %: Porcentagem.

** Valor de p (Fisher) = 0,1122.

5.6.2.2 ECP e ECN isolados de leite de vacas

Não foi detectado a presença do gene *mecA* em ECP isolados de vacas com e sem mastite. Dentre as 20 linhagens de ECN isoladas de vacas mastíticas, 8/20 (40,00%) apresentaram o gene *mecA*. Destas, 02 (10,00%) linhagens foram sensíveis aos discos de cefoxitina, oxacilina, penicilina e fita de oxacilina (Tabela 26).

Dos ECN identificados em vacas negativas para mastite, em apenas 02/14 isolados (14,28%) foi detectado o gene *mecA*. Destas linhagens, 01 (7,14%) *S. simulans* não foi resistente aos discos de cefoxitina e/ou oxacilina e penicilina (Tabela 28).

Foi verificada diferença estatística significante ($p<0,05$) entre linhagens de ECP e ECN isoladas de leite de vacas com mastite, quanto a detecção do gene *mecA* (Tabela 35). Porém, não foi observada diferença estatística significante entre linhagens de ECN de vacas com e sem mastite para detetecção do gene *mecA* (Tabela 36).

Tabela 35: Comparação entre ECP e ECN isolados de leite de vacas com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo quanto a presença do gene *mecA,* utilizando o teste de Fisher. Botucatu, 2011.

Micro-organismo	Gene *mecA* – Vacas com mastite					
	Negativos		Positivos		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
ECP	20	100,00	0	0,00	20	100,00
ECN	12	60,00	08	40,00	20	100,00
TOTAL	32	80,00	08	20,00	40	100,00

* ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos; *mecA:* Gene codificador para resistência à meticilina Nº: Número; %: Porcentagem.

** Valor de p (Fischer) = 0,0016.

Tabela 36: Comparação entre linhagens de ECN isoladas de leite de vacas com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo quanto a presença do gene *mecA,* utilizando o teste de Fisher. Botucatu, 2011.

Vacas	Gene *mecA* - ECN					
	Negativos		Positivos		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Com mastite	12	60,00	8	40,00	20	100,00
Sem mastite	12	85,71	2	14,29	14	100,00
TOTAL	24	70,59	10	29,41	34	100,00

* ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos; *mecA* Gene codificador para resistência à meticilina Nº: Número; %: Porcentagem.

** Valor de p (Fisher) = 0,1067.

5.6.2.3 ECP e ECN isolados de leite de cabras

Em apenas 01/16 (6,25%) linhagem de *S. aureus* isolada de leite de cabra com mastite foi detectado o gene para resistência à meticilina. Dentre os ECN pesquisados, 07/20 (35,00%) revelaram a presença do gene *mecA*. Um

isolado de ECN *mecA* positivo foi sensível à cefoxitina, oxacilina e penicilina, enquanto o outro foi resistente apenas ao disco de penicilina.

O gene *mecA* não foi detectado na única linhagem de *S. aureus* isolada de leite proveniente de cabras negativas para mastite. Nas linhagens de ECN identificadas em leite sem mastite, 15/20 (75,00%) apredentaram o gene que confere resistência a meticilina. Destas, uma linhagem não apresentou resistência frente aos discos de cefoxitina, oxacilina e penicilina (Tabelas 30 e 32).

Foi verificada diferença estatística significante ($p<0,05$) entre linhagens de ECP e ECN isoladas de leite de cabras com mastite, bem como de linhagens de ECN isoladas de cabras com e sem mastite quanto a detecção do gene *mecA* (Tabelas 37 e 38).

Tabela 37: Comparação entre ECP e ECN isolados de leite de cabras com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo quanto a presença do gene *mecA,* utilizando o teste de Fisher. Botucatu, 2011.

Micro-organismo	Gene *mecA* – Cabras com mastite					
	Negativos		Positivos		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
ECP	15	93,75	01	6,25	16	100,00
ECN	13	65,0	07	35,00	20	100,00
TOTAL	28	77,78	08	22,22	36	100,00

* ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos; *mecA:* Gene codificador para resistência à meticilina Nº: Número; %: Porcentagem.

** Valor de p (Fisher) = 0,0451.

Tabela 38: Comparação entre linhagens de ECN isoladas de leite de cabras com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo quanto a presença do gene *mecA,* utilizando o teste de qui-quadrado Botucatu, 2011.

Cabras	Gene *mecA* - ECN					
	Negativos		Positivos		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Com mastite	13	65,00	07	35,0	20	100,00
Sem mastite	05	25,00	15	75,00	20	100,00
TOTAL	18	45,00	22	55,00	40	100,00

* ECP: Estafilococos coagulase positivos; ECN: Estafilococos coagulase negativos; *mecA:* Gene codificador para resistência à meticilina; Nº: Número; %: Porcentagem.

** Valor de p (χ^2) = 0,0260.

5.6.3 Produção de hemólise em ágar acrescido de sangue em linhagens de *Staphylococcus* spp.

5.6.3.1 Isolados de leite humano

Dentre as 15 linhagens de ECP e 40 de ECN avaliadas, 13 (86,67%) e 30 (75,00%), respectivamente, apresentaram hemólise no meio de ágar sangue bovino. Duas estirpes classificadas como *Staphylococcus* spp. não apresentaram hemólise.

5.6.3.2 Isolados de leite de vacas

Das 20 linhagens de ECP e 20 de ECN avaliadas de leite de vacas mastíticas, 20/20 (100,00%) e 11/20 (55,00%), respectivamente, apresentaram hemólise no meio de ágar sangue bovino.

Foi detectada hemólise em dois isolados de *S. aureus* obtidos do leite de vacas sem mastite. Dentre as linhagens de ECN avaliadas 05/14 (35,71%) produziram hemólise.

5.6.3.3 Isolados de leite de cabras

Nas dezesseis linhagens de ECP obtidas de cabras com mastite e em 9/20 (45,00%) ECN foi observada hemólise no meio de ágar sangue bovino. A única estirpe de *S. aureus* isolada de leite negativo para mastite e 06/20 (30,00%) linhagens de ECN apresentaram hemólise.

5.6.4 Detecção de genes e produção de toxinas estafilocócicas

5.6.4.1 Isolados de leite humano

O gene *sea* (Figura 12) foi detectado em 03/15 (20,00%) dos ECP isolados. Igual porcentagem também foi identificada para os genes *seb* e *sec*. Dentre as cinco linhagens de *S. aureus* isoladas de leite humano foi verificada a presença dos genes *sea* em duas estirpes*, seb* em uma (Figura 13) e *sec* em duas linhagens. O gene *tsst*-1 foi detectado em 02 (13,33%) linhagens, obtidas de um isolado de *S. aureus* e outro de *Staphylococcus* spp. O gene *sed* não foi observado nas estirpes de ECP isoladas de leite humano.

A ocorrência de dois ou mais genes foi verificada em 04/15 (26,66%) linhagens de ECP. A associação dos genes *sea* e *tsst-1* foi verificada em 02/15 (13,33%) linhagens de ECP, enquanto a associação entre *seb* e *sec* foi observada em 01 (6,67%) estirpe de *Staphylococcus* spp. A detecção conjunta de *sea*, *seb* e *sec* foi constatada em 01 (6,67%) linhagem de *S. aureus*.

Dos 15 ECP avaliados, somente 02 (13,33%) *S. aureus* foram produtores de toxinas. Destes, 01 (6,67%) produziu a enterotoxina A e toxina TSST-1 e outro (6,67%) as enterotoxinas A e C, embora neste último também tenha sido detectado o gene *seb*.

A presença do gene *sea* nos ECN foi detectada em 36/40 (90,00%) linhagens. Em somente 2/40 isolados (5,00%) foi observado os genes *seb* e em 6/40 (15,00%) o *sec*. Dentre as 40 linhagens de ECN, 22/40 (55,00%) representadas por *S. epidermidis* apresentaram gene *sea* e 4/40 (10,00%) o gene *sec*. Nas linhagens de *S. saprophyticus,* em 5/40 (12,50%) foram detectados os genes *sea*, uma (2,5%) *seb* e uma *sec*. Em duas (5,00%) estirpes de *S. simulans* foi identificado o gene *sea*. Os genes codificadores da enterotoxina D e da toxina TSST-1 não foram observados nas estirpes de ECN avaliadas (Tabela 39).

A ocorrência de dois ou mais genes foi verificada em 07/40 (17,50%) linhagens de ECN. A associação dos genes *sea* e *sec* foi encontrada em 05/40 (12,50%) linhagens de ECN, das quais 03 (7,5%) representadas por *S. epidermidis*. A associação entre *sea* e *seb* foi observada em 02/40 (5,00%) estirpes de ECN (Anexo 01).

A produção de enterotoxinas foi observada em 02/40 (5,00%) linhagens de ECN. *S. saprophyticus* demonstrou produção de SEA, enquanto uma linhagem de *Staphylococcus* spp. produziu SEB.

Ao comparar linhagens de ECP e ECN isoladas de LH, quanto a presença de genes codificadores para toxinas estafilocócicas foi verificada significância estatística ($p<0,05$) apenas para o gene *sea.* Não houve diferença estatística significante entre ECP e ECN para os demais genes pesquisados (Tabela 39).

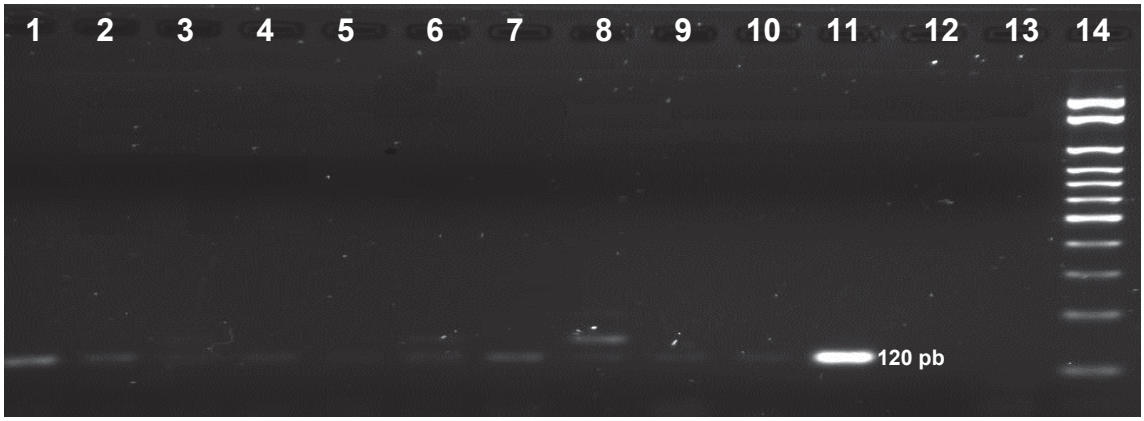


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *sea* em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite humano provenientes do BLH do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. 1-10: linhagens de *Staphylococcus* spp; 11: controle positivo (ATCC 13565); 12: controle negativo; 13: água MilliQ esterilizada; 14: 100 pb DNA ladder. Botucatu, SP, 2011.

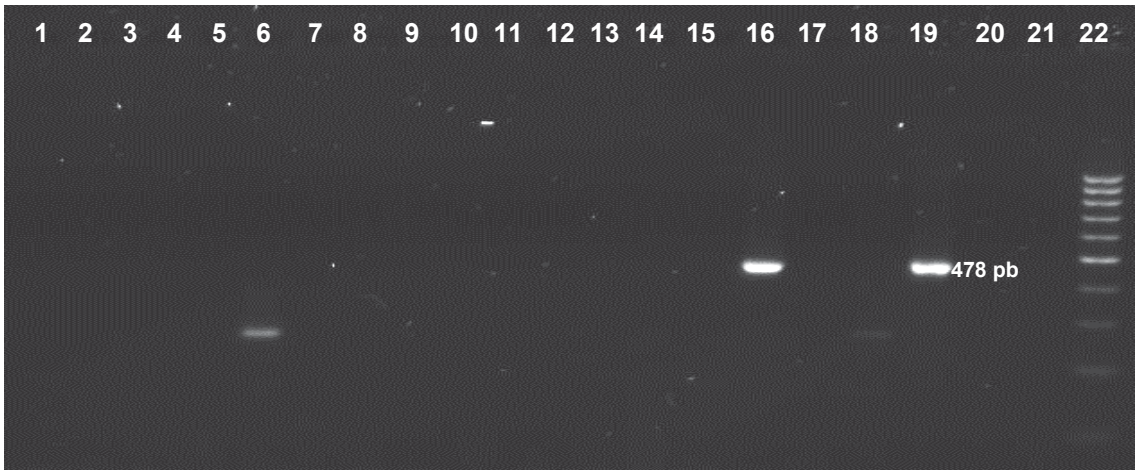


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *seb* em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite provenientes do BLH do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. 1-18: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 19: controle positivo (ATCC 19095); 20: controle negativo; 21: água MilliQ esterilizada; 22: 100 pb DNA ladder. Botucatu, SP, 2011.

Tabela 39. Gene de toxinas investigados em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite humano proveniente do BLH, do HC da Faculdade de Medicina da UNESP. Botucatu, SP, 2011.

Gene	***sea***	***seb***	***sec***	***sed***	***tsst-1***
Estafilococos	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**
ECP					
Staphylococcus spp.	01/15 (6,67)	2/15 (13,33)	01/15 (6,67)	0/15 (0,00)	01/15 (6,67)
S. aureus	02/15 (13,33)	1/15 (6,67)	02/15 (13,33)	0/15 (0,00)	01/15 (6,67)
Total	**03/15 (20,00)**	**3/15 (20,00)**	**03/15 (20,00)**	**0/15 (0,00)**	**02/15 (13,34)**
ECN					
S. epidermidis	22/40 (55,00)	0/40 (0,00)	4/40 (10,00)	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)
S. lugdunensis	01/40 (2,50)	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)
S. saprophyticus	05/40 (12,50)	01/40 (2,50)	01/40 (2,50)	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)
Staphylococcus spp.	04/40 (10,00)	01/40 (2,50)	01/40 (2,50)	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)
S. simulans	02/40 (5,00)	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)
S. xylosus	02/40 (5,00)	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)	0/40 (0,00)
Total	**36/40 (90,00)**	**2/40 (5,00)**	**06/40 (15,00)**	**0/40 (0,00)**	**0/40 (0,00)**

* ECP: Estafilococos coagulase positivo; ECN: Estafilococos coagulase negativo *sea*: Gene codificador da enterotoxina A; *seb*: Gene codificador da enterotoxina B; *sec*: Gene codificador da enterotoxina C; *sed*: Gene codificador da enterotoxina D; *tsst-1:* Gene codificador para toxina da síndrome do choque tóxico; Nº: Número; %: Porcentagem.

** SEA : Valor de p (Fisher) = <0,0001; SEB: Valor de p (Fisher) = 0,1185; SEC: Valor de p (Fisher) = 0,4676; TSST-1: Valor de p (Fisher) = 0,0707.

5.6.4.2 Isolados de leite de vacas

A detecção de genes para enterotoxinas foi verificada em 03/20 linhagens (15,00%) de ECP e 10/20 (50,00%) de ECN isolados de vacas com mastite. O gene *sea* foi detectado em 02/20 linhagens (10,00%) de *S. intermedius* e 01/20 (5,00%) de *S. aureus*. A presença simultânea dos genes *sea* e *sec* foi observada em uma linhagem de *S. intermedius*. Das linhagens de ECN avaliadas, em 07/20 (35,00%) foi detectado o gene *sea*, 02/20 (10,00%) o gene *seb* e 03/20 (15,00%) o gene *sec* (Figura 14).

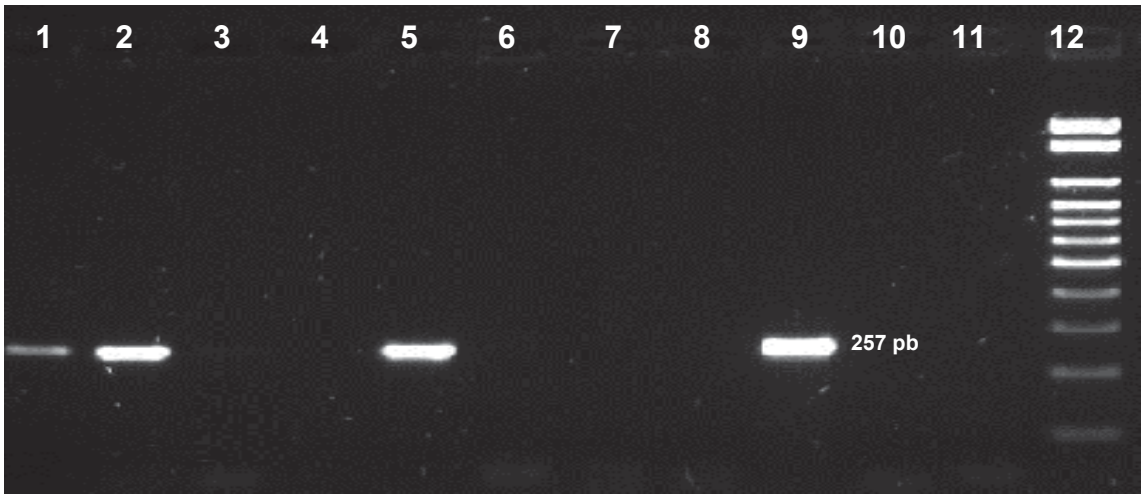


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *sec* em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite de vacas. 1-8: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 9: controle positivo (ATCC 19095); 10: controle negativo; 11: água MilliQ esterilizada; 12: 100 pb DNA ladder. Botucatu, SP, 2011.

A associação dos genes *sea* e *sec* foi verificada em duas estirpes de ECN. Nenhuma estirpe isolada do leite de vacas, com e sem mastite, foi produtora de toxinas quando submetidos à técnica de aglutinação passiva reversa em látex.

Não foram detectados genes codificadores de enterotoxinas na estirpe de *S. intermedius* isolado de leite de vaca sem mastite. Dentre as 14 linhagens de ECN avaliadas, 09/14 (64,28%) apresentaram gene para uma ou mais enterotoxinas. Nestas, em 06 (42,86%) foi detectado o gene *sea*, em 04

(28,57%) o gene *seb* e em 03 (21,43%) o gene *sec*. A associação dos genes *sea*, *seb* e *sec* foi identificada em duas linhagens de ECN isoladas de leite de vacas sem mastite, das quais uma classificada como *S. saprophyticus*. Na outra linhagem que apresentou produção de enterotoxina C na RPLA, não foi possível a classificação bioquímica pelos métodos utilizados, sendo denominada como *Staphylococcus* spp. coagulase negativo. Não houve identificação dos genes codificadores de enterotoxina D e toxina TSST-1 nos isolados avaliados de vacas com e sem mastite (Tabelas 40 e 41).

A análise estatística não foi significante (p>0,05) entre linhagens de ECP e ECN isoladas de leite de vacas com mastite, quando comparadas quanto a presença de genes codififcadores para toxinas estafilocócicas (Tabela 40). Também não se verificou diferença estatística significante entre linhagens de ECN de vacas com e sem mastite contendo os genes para estas toxinas [Tabela 42].

5.6.4.3 Isolados de leite de cabras

Dentre as linhagens de *S. aureus* e ECN isoladas de cabras com mastite, em 08/16 (50,00%) e 11/20 (55,00%), respectivamente, foi detectado um ou mais genes para enterotoxinas. Das 16 estirpes de *S. aureus,* 06 (37,50%) apresentaram o gene *sea*, 02 (12,50%) o gene *seb*, 03 (18,75%) o gene *sec* e 01 (6,25%) o gene *tsst-1* (Tabela 43). A associação dos genes codificadores para as enterotoxinas A, B, C e TSST-1 foi verificada em 01(6,25%) isolado, que produziu as quatro enterotoxinas (Figura 15).

A detecção conjunta dos genes *seb* e *sec* foi verificada em 01 (6,25%) linhagem, que também produziu estas duas toxinas quando submetida à prova de aglutinação passiva reversa em látex. A estirpe de *S. aureus* contendo o gene *sec* também foi produtora desta enterotoxina estafilocócica. Não foi observada a ocorrência de gene para *sed* nas linhagens de *S. aureus* isoladas de cabras.

A presença de genes para as enterotoxinas estafilocócicas foi verificada em 11/20 (55,00%) dos ECN isolados de cabras com mastite, dos quais 08/20 (40,00%) apresentaram o gene *sea* e 04/20 (20,00%) *sec*, identificados em linhagens de *S. caprae, S. epidermidis, S. lugdunensis* e *S. auricularis*. A detecção simultânea dos genes *sea* e *sec* foi observada em uma (5,00%)

linhagem de *S. auricularis*. Apenas uma linhagem de *S. epidermidis* foi produtora de enterotoxina A (Tabela 43).

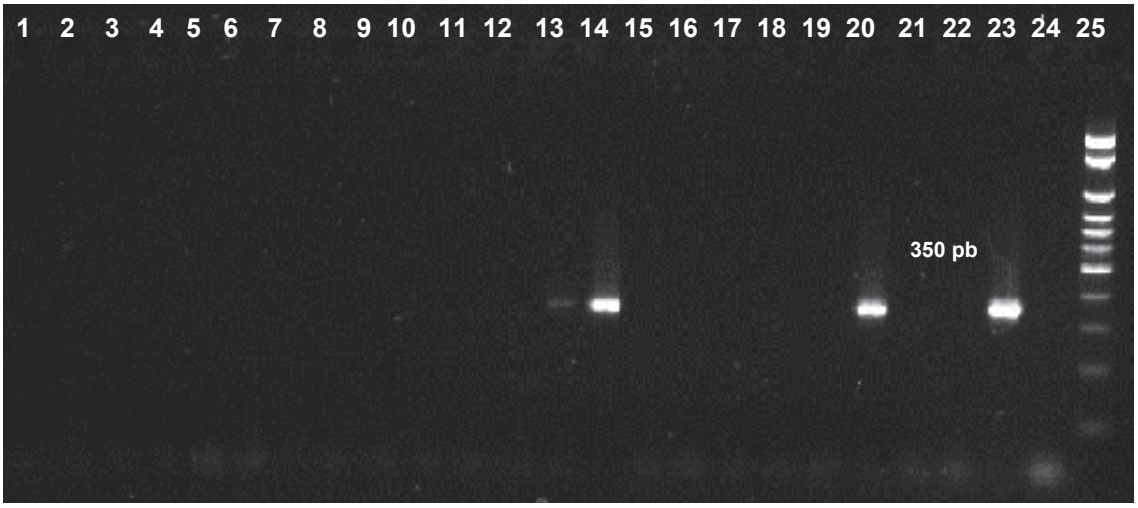


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 2% para a visualização dos produtos de amplificação para a pesquisa do gene *tsst-1* em linhagens de ECP isoladas de amostras de leite de cabras e mulheres. 1-21: linhagens de *Staphylococcus* spp.; 13: ECP isolado de cabra; 14 e 20: ECP isolados de mulheres; 22: controle negativo; 23: controle positivo (ATCC 19095); 24: água MilliQ esterilizada; 25: 100 pb DNA ladder. Botucatu, SP, 2011.

Ao comparar a presença de genes codififcadores para toxinas estafilocócicas entre linhagens de ECP e ECN isoladas de leite de cabras com mastite não foi observada significância estatística ($p>0,05$) [Tabela 43]. De maneira similar, não houve diferença estatisticamente significante entre linhagens de ECN de cabras com e sem mastite que contenham os genes para estas toxinas [Tabela 44].

Não foi detectada a presença de genes codificadores para enterotoxinas e toxina da síndrome do choque tóxico na estirpe de *S. aureus* isolada do leite de cabras negativas para mastite. A detecção de genes para toxinas foi observada em 10/20 (50,00%) linhagens de ECN, das quais 09/20 (45,00%) apresentaram gene *sea* (Tabela 45).

A associação de genes para toxinas foi observada em 04/20 isolados (20,00%) de ECN. Duas estirpes de *S. epidermidis* apresentaram os genes *sea* e *seb,* enquanto outra revelou a presença dos genes *seb* e *sec.* Apenas uma linhagem de *S. lugdunensis* apresentou os genes *sea* e *sec*, com produção da SEC. Não foi detectada a presença do gene *sed* em ECP e ECN isolados de amostras de leite de cabras com e sem mastite.

A presença de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite humano, bovino e caprino que apresentaram os genes *sea*, *seb*, *sec* e *tsst-1*, assim como suas associações estão descritas no anexo 01.

Linhagens de ECP e ECN isoladas de leite humano, bovino e caprino que foram produtoras de enterotoxinas A, B e C e TSST-1, assim como suas associações estão descritas no anexo 02.

Tabela 40. Gene de toxinas investigados em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de vacas com mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Gene	*sea*	*seb*	*sec*	*sed*	*tsst-1*
Estafilococos	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**
ECP					
S. aureus	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. intermedius	02/20 (10,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
Total	03/20 (15,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
ECN					
S. chromogenes	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. epidermidis	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. haemolyticus	02/20 (10,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. pasteuri	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. saprophyticus	02/20 (10,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. simulans	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
Staphylococcus spp.	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. warneri	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. xylosus	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
Total	7/20 (35,00)	01/20 (5,00)	3/20 (10,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)

* ECP: Estafilococos coagulase positivo; ECN: Estafilococos coagulase negativo *sea*: Gene codificador da enterotoxina A; *seb*: Gene codificador da enterotoxina B; *sec*: Gene codificador da enterotoxina C; *sed*: Gene codificador da enterotoxina D; *tsst-1:* Gene codificador para toxina da síndrome do choque tóxico; Nº: Número; %: Porcentagem.

** SEA: Valor de p (χ^2) = 0,2733; SEB: Valor de p (Fisher) = 0,2435; SEC: Valor de p (Fisher) = 0,3024.

Tabela 41. Gene de toxinas investigados em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de vacas sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Gene / **Estafilococos**	***sea*** **Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	***seb*** **Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	***sec*** **Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	***sed*** **Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	***tsst-1*** **Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**
ECP					
S. aureus	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)
Total	**01/01 (00,00)**	**01/01 (00,00)**	**01/01 (00,00)**	**01/01 (00,00)**	**01/01 (00,00)**
ECN					
S. chromogenes	01/14 (7,14)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)
S. epidermidis	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)
S. pasteuri	01/14 (7,14)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)
S. saprophyticus	01/14 (7,14)	01/14 (7,14)	01/14 (7,14)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)
S. simulans	01/14 (7,14)	01/14 (7,14)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)
Staphylococcus spp.	02/14 (14,29)	01/14 (7,14)	02/14 (14,29)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)
S. warneri	0/14 (0,00)	01/14 (7,14)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)	0/14 (0,00)
Total	**06/14 (42,85)**	**04/14 (28,56)**	**03/14 (21,43)**	**0/14 (0,00)**	**0/14 (0,00)**

* ECP: Estafilococos coagulase positivo; ECN: Estafilococos coagulase negativo *sea*: Gene codificador da enterotoxina A; *seb*: Gene codificador da enterotoxina B; *sec*: Gene codificador da enterotoxina C; *sed*: Gene codificador da enterotoxina D; *tsst-1:* Gene codificador para toxina da síndrome do choque tóxico; Nº: Número; %: Porcentagem. Botucatu, SP, 2011.

Tabela 42: Comparação entre linhagens de ECN isoladas de leite de vacas com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo quanto à presença de genes para toxinas estafilocócicas, utilizando os teste de qui-quadrado e Fisher. Botucatu, 2011.

	ECN					
	COM MASTITE			SEM MASTITE		
Genes	Nº linhagens/total de linhagens (%)			Nº linhagens/total de linhagens (%)		
	Negativo	Positivo	TOTAL	Negativo	Positivo	TOTAL
sea	13/20 (65,00)	07/20 (35,00)	20/20 (100,00)	08/14 (57,14)	06/14 (42,86)	14/14 (100,00)
seb	18/20 (90,00)	02/20 (10,00)	20/20 (100,00)	10/14 (71,43)	04/14 (28,57)	14/14 (100,00)
sec	17/20 (85,00)	03/20 (15,00)	20/20 (100,00)	11/14 (78,57)	03/14 (21,43)	14/14 (100,00)
sed	20/20 (100,00)	0/20 (0,00)	20/20 (100,00)	14/14 (100,00)	0/14 (0,00)	14/14 (100,00)
tsst-1	20/20 (100,00)	0/20 (0,00)	20/20 (100,00)	14/14 (100,00)	0/14 (0,00)	14/14 (100,00)

* ECN: Estafilococos coagulase negativo; Nº: Número; %: Porcentagem; *sea*: Gene codificador da enterotoxina A; *seb*: Gene codificador da enterotoxina B; *sec*: Gene codificador da enterotoxina C; *sed*: Gene codificador da enterotoxina D; *tsst-1:* Gene codificador para toxina da síndrome do choque tóxico;.

** SEA: Valor de p (χ^2) = 0,9160; SEB: Valor de p (Fisher) = 0,1734; SEC: Valor de p (Fisher) = 0,4819.

Tabela 43. Gene de toxinas investigados em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de cabras com mastite, provenientes de propriedades do interior de São Paulo. Botucatu, SP, 2011.

Gene	*sea*	*seb*	*sec*	*sed*	*tsst-1*
Estafilococos	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	**Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**
ECP					
S. aureus	06/16 (37,5)	02/16 (12,50)	03/16 (18,75)	0/16 (0,00)	01/16 (6,25)
Total	**06/16 (37,5)**	**02/16 (12,50)**	**03/16 (18,75)**	**0/16 (0,00)**	**01/16 (6,25)**
ECN					
S. auricularis	02/20 (10,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. capitis urealyticus	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. caprae	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. chromogenes	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. epidermidis	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. lugdunensis	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. pasteuri	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. simulans	04/20 (20,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. warneri	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. xylosus	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
Total	**08/20 (40,00)**	**0/20 (0,00)**	**04/20 (20,00)**	**0/20 (0,00)**	**0/20 (0,00)**

* ECP: Estafilococos coagulase positivo; ECN: Estafilococos coagulase negativo *sea*: Gene codificador da enterotoxina A; *seb*: Gene codificador da enterotoxina B; *sec*: Gene codificador da enterotoxina C; *sed*: Gene codificador da enterotoxina D; *tsst-1:* Gene codificador para toxina da síndrome do choque tóxico; Nº: Número; %: Porcentagem. Botucatu, SP, 2011. ** SEA: Valor de p (Fisher) = 0,5766; SEB: Valor de p (Fisher) = 0,1904; SEC: Valor de p (Fisher) = 0,6314; TSST-1: Valor de p (Fisher) = 0,4444

Tabela 44: Comparação entre linhagens de ECN isoladas de leite de cabras com e sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo quanto à presença de genes para toxinas estafilocócicas, utilizando os teste de qui-quadrado e Fisher. Botucatu, SP. 2011.

	ECN					
	Cabras com mastite			Cabras sem mastite		
Genes	Nº linhagens/total de linhagens (%)			Nº linhagens/total de linhagens (%)		
	Negativo	Positivo	TOTAL	Negativo	Positivo	TOTAL
sea	12/20 (60,00)	8/20 (40,00)	20/20 (100,00)	11/20 (55,00)	09/20 (45,00)	20/20 (100,00)
seb	20/20 (100,00)	0/20 (0,00)	20/20 (100,00)	17/20 (85,00)	03/20 (15,00)	20/20 (100,00)
sec	16/20 (80,00)	04/20 (20,00)	20/20 (100,00)	18/20 (90,00)	02/20 (10,00)	20/20 (100,00)
sed	20/20 (100,00)	0/20 (0,00)	20/20 (100,00)	20/20 (100,00)	0/20 (0,00)	20/20 (100,00)
tsst-1	20/20 (100,00)	0/20 (0,00)	20/20 (100,00)	20/20 (100,00)	0/20 (0,00)	20/20 (100,00)

* ECN: Estafilococos coagulase negativo; Nº: Número; %: Porcentagem; *sea*: Gene codificador da enterotoxina A; *seb*: Gene codificador da enterotoxina B; *sec*: Gene codificador da enterotoxina C; *sed*: Gene codificador da enterotoxina D; *tsst-1:* Gene codificador para toxina da síndrome do choque tóxico.

** SEA: Valor de p (χ^2) = 1,0000; SEB: Valor de p (Fisher) = 0,1153; SEC: Valor de p (Fisher) = 0,3307.

Tabela 45. Genes de toxinas investigados em linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de cabras sem mastite, provenientes de propriedades do interior do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Gene / **Estafilococos**	***sea*** **Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	***seb*** **Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	***sec*** **Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	***sed*** **Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**	***tsst-1*** **Nº linhagens / Nº total de linhagens (%)**
ECP					
S. aureus	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)	0/01 (0,00)
ECN					
S. capitis urealyticus	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. epidermidis	05/20 (25,00)	03/20 (15,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. lugdunensis	02/20 (10,00)	0/20 (0,00)	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. pasteuri	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. saprophyticus	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. simulans	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
S. warneri	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
Staphylococcus spp.	01/20 (5,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)	0/20 (0,00)
Total	09 (45,00)	03/20 (15,00)	02/20 (10,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

* ECP: Estafilococos coagulase positivo; ECN: Estafilococos coagulase negativo *sea*: Gene codificador da enterotoxina A; *seb*: Gene codificador da enterotoxina B; *sec*: Gene codificador da enterotoxina C; *sed*: Gene codificador da enterotoxina D; *tsst-1:* Gene codificador para toxina da síndrome do choque tóxico; Nº: Número; %: Porcentagem.

6. DISCUSSÃO

O leite materno é definido como o alimento mais completo para neonatos nos primeiros meses de vida, seguido do leite bovino, seu principal sucedâneo e do leite caprino, indicado principalmente para crianças, em casos de hipersensibilidade às proteínas do leite de vacas (LUZEAU et al., 1983; NOVAK e ALMEIDA, 2002).

As características físico-químicas e microbiológicas do leite humano ordenhado distribuído pelos BLH é assunto de grande interesse no contexto da saúde pública, pois este alimento será fornecido a neonatos nos primeiros dias de vida. Portanto, o consumo de leite contaminado pode transmitir patógenos, contribuindo com as taxas de morbimortalidade infantil (RNBLH, 2006).

A acidez titulável em graus Dornic (^{o}D) e o crematócrito figuram dentre as principais características físico-químicas do LHO. O leite é um sistema tamponante com baixa concentração de íons de hidrogênio livre. A acidez titulável permite aferir a carga ácida do leite (THO e HO, 1978; LUZEAU et al., 1983). A ingestão de leite ácido resulta em acidose metabólica, podendo causar enterocolite necrosante em recém-nascidos prematuros e de baixo peso ao nascimento (THO e HO, 1978). Os valores de acidez do leite humano considerados aceitáveis variam entre 1,0 e 8,0^{o}D (GALHARDO et al., 2002, RNBLH, 2006).

No presente estudo, 95,42% das amostras de LHO apresentaram acidez titulável ≤ 7,5 ^{o}D. De maneira similar, Cavalcante et al. (2005) ao avaliarem 4204 amostras de LH observaram que 91,4% apresentaram acidez titulável ≤ 7,5 ^{o}D. Este valor situa-se dentro do limite aceitável pela RNBLH. No entanto, é lícito afirmar que amostras de leite materno com acidez titulável ≤ 7,5 ^{o}D devem ser pasteurizadas, com o intuito de eliminar micro-organismos patogênicos passíveis de contaminação primária ou secundária, além de cerca de 90,0% da microbiota saprófita ou normal (RNBLH, 2006; ANVISA, 2007).

De acordo com as normas padronizadas pela RNBLH, amostras de leite com acidez titulável ≥ 7,5 ^{o}D devem ser descartadas em virtude da ocorrência de prejuízos nutricionais, como redução dos teores de creme, gordura total e valor energético, além do risco de determinar acidose metabólica e enterocolite necrosante em neonatos (THO e HO, 1978).

Estudos têm demonstrado que o aumento da acidez em teores ≥ 7,0 ^{o}D pode estar relacionado às condições inadequadas de transporte e temperatura interna das caixas isotérmicas conduzidas pelas nutrizes até o BLH (LUZEAU, et al., 1983). O aumento progressivo da temperatura interna da caixa isotérmica e do LHO estimulam a ação fermentativa e das enzimas (proteases, lipases e carboxilases) de bactérias presentes no leite, determinando a degradação dos triglicerídeos pelas lipases produzidas pelos ácidos graxos não esterificados (ácidos graxos livres – AGL), elevando as concentrações de íons H^{+}, com consequente redução do pH e aumento da acidez titulável (LUCAS e ROBERTS, 1979), resultando na redução da qualidade do leite materno fornecido aos neonatos pelos BLH.

No presente estudo também foram avaliados o aporte calórico do leite materno. Foram observados variações de 11,29±1,54 para teor de creme, 7,33±0,65% para gordura e 1044,19±392,77 Kcal/L de valor energético. Vieira et al. (2004) ao avaliarem o percentual de gordura de amostras de leite humano cru ordenhado verificaram que os valores obtidos foram 8,9±4,6%.

A variação no teor de gordura pode ser creditada a vários fatores, que incluem o estágio do ciclo lactacional, a individualidade genética, a dieta da nutriz e diferenças entre grupos étnicos (MORGANO, 2005). Ademais, Askit et al. (2002) demonstraram alterações no porcentual médio de gordura do leite colhido manualmente no início da mamada (2±1,9%), após cinco minutos de mamada (9±2,8%), no décimo minuto de mamada (11,4±4,6%) e ao final da mamada (14,3±3,8%), indicando que a fase da colheita de leite pode influenciar nos teores de gordura do alimento estocado nos BLH.

O leite bovino e o caprino são considerados os alimentos mais nobres e completos de origem animal utilizados no consumo humano. Porém, para exercer sua função nutricional de forma segura, o leite precisa possuir alguns atributos que garantam sua qualidade e de seus derivados. A qualidade do leite é definida, entre outros parâmetros, por possuir baixo número de micro-organismos deteriorantes, ausência de patógenos, baixa contagem de células somáticas e ausência de qualquer resíduo químico e/ou tóxico (ALVES, 2001).

Após a ordenha o leite não deve apresentar fermentação. A acidez natural do produto é decorrente dos componentes presentes no próprio leite, como a caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citrato (PEREIRA et al.,

2001). Depois de certo tempo de decorrida a ordenha, por ação da temperatura e perda dos inibidores naturais, o leite passa a apresentar aumento da acidez como resultado da acidificação da lactose, devido ao metabolismo acelerado de micro-organismos presentes no produto (OLIVEIRA e NUNES, 2003).

A acidez titulável em graus Dornic (^{o}D) de leite fluído bovino aceitável pela legislação brasileira situa-se entre 14-18^{o}D (0,14g a 0,18g de ácido lático/100 mL de leite), enquanto para o leite de cabra esta variação encontra-se entre 13-18 ^{o}D (0,13g a 0,18g de ácido lático/100 mL de leite). O leite com valores de acidez acima ou abaixo do estipulado pela legislação nacional é considerado impróprio para o consumo, devendo ser descartado (BRASIL, 2000,2002).

No presente estudo, 48,50% das amostras de leite de vacas que apresentaram alteração no teste de Tamis ou CMT e 56,0% das amostras de leite bovino sem mastite acusaram acidez dornic dentro dos padrões exigidos pela IN 22 do MAPA (BRASIL, 2002). O baixo índice de acidez dornic do leite de vacas com mastite foi verificado em 36,00% das amostras. Dentre as 200 amostras negativas para mastite bovina, 10,00% apresentaram valores inferiores ao mínimo aceitável pelo MAPA, enquanto 34,00% das amostras revelaram valores acima dos padrões.

Almeida et al. (1999) encontraram valores discordantes dos obtidos no presente estudo, pois ao avaliarem 21 amostras de leite de vacas verificaram que apenas 28,57% apresentaram-se dentro dos valores aceitáveis, enquanto 71,43% situaram-se abaixo do índice mínimo permitido. SILVA et al. (2008) ao analisarem o leite bovino de 17 miniusinas verificaram que 7,5% das amostras apresentaram acidez dornic fora dos padrões exigidos pela legislação. Estes achados indicam a necessidade de otimização das condições de ordenha visando reduzir os riscos de contaminação microbiana do leite, que pode, dentre outros fatores, influenciar na acidez láctica e, consequentemente, na qualidade do produto.

Cunha (2007) ao avaliar o leite de 160 cabras observou ampla variação na acidez, entre 1-18^{o}D. Mello et al. (2010) também verificaram grande variação na acidez dornic de amostras de leite de cabras. No presente estudo, o leite das cabras amostradas também apresentou grande variação de acidez dornic (5 a 32 ^{o}D), das quais 49,00% e 53,50% das amostras com e sem mastite, respectivamente, apresentaram valores satisfatórios. Apenas 9,50% do

leite de cabras com mastite apresentaram índice de acidez abaixo do permitido pela IN 37 (BRASIL, 2000).

A elevada taxa de acidez dornic encontrada nas amostras de leite de animais (pH ≤ 6,5) pode resultar de variações nutricionais, fase de lactação ou demora do translado entre a propriedade e a chegada ao laboratório para o processamento. Mesmo com o armazenamento das amostras de leite em caixas isotérmica e/ou refrigeradas (4-8^{o}C), pode ocorrer elevação da acidez devido a presença de micro-organismos com potencial fermentativo (RODRIGUES et al., 1995; OLIVEIRA e NUNES, 2003).

A presença de índices de acidez dornic abaixo do mínimo permitido pela legislação, geralmente está relacionada a processos infecciosos da glândula mamária. A mastite causa redução dos teores de gordura, lactose e caseína, e aumento de cloretos e soroproteínas, tornando o leite mais alcalino (pH ≥ 6,9), portanto, com menor acidez dornic (RODRIGUES et al., 1995; FONSECA e SANTOS, 2007).

As condições sanitárias inadequadas de processamento do leite de animais de produção favorecem a ocorrência de doenças no rebanho, gerando depreciação e perda de qualidade do produto, com consequente risco à saúde pública (ALVES, 2001; LANGONI et al., 2006). De maneira similar, condições impróprias de coleta e armazenamento do leite materno em BLH podem favorecer a presença de micro-organismos patogênicos. Desta maneira, além das características físico-químicas, o perfil microbiano do leite humano, bovino e caprino tem sido motivo de grande preocupação pelos profissionais da área médica (RNBLH, 2006).

O LH ordenhado não possui proteção física que impeça o acesso de micro-organismos aos seus nutrientes. Assim, o leite materno pode se constituir em via de transmissão de micro-organismos patogênicos aos recém-nascidos, caso não seja manipulado sob condições higiênicas adequadas. A adoção de medidas preventivas reduz os riscos operacionais e a contaminação secundária proveniente do ambiente, de utensílios, das doadoras e dos profissionais da área de saúde, proporcionando ao final, alimento seguro e saudável para neonatos e crianças (OPAS, 2003; RNBLH, 2006).

Staphylococcus spp. são os micro-organismos mais frequentemente isolados de leite humano (LAWRENCE e LAWRENCE, 2007), à semelhança do

leite bovino e caprino (QUINN et al., 2005; RADOSTITS et al., 2007). No presente estudo, *Staphylococcus* spp. foi responsável por 56,45% dos isolados de LH. Estes resultados foram semelhantes aos descritos em estudos similares que ressaltaram a elevada ocorrência do gênero *Staphylococcus* em leite humano (NETO et al., 2001; COSTA et al., 2004).

Dentre as espécies de ECN e ECP identificadas no leite das doadoras amostradas no presente estudo, *S. epidermidis* (39,78%) foram os mais prevalentes, enquanto *S. aureus* foi responsável por apenas 2,69% dos estafilococos isolados. Serafini et al. (2003) ao avaliarem 194 amostras de leite humano cru verificaram elevada prevalência de *S. epidermidis* (20,59%), além de destacarem o isolamento de *S. aureus* em 7,35% das amostras. Delgado et al. (2009) cultivaram o leite de 30 mulheres e também observaram elevada ocorrência de *S. epidermidis* (90,00%) e *S. aureus* (26,66%).

Nas amostras de leite humano obtidas do BLH do HC da UNESP/ Botucatu, SP, também foram isolados leveduras, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp., *Micrococcus* spp. e enterobactérias. Este achado concorda com estudos similares envolvendo a investigação de micro-organismos de origem bacteriana ou fúngica em BLH (NETO et al., 2001; NOVAK et al., 2002; SERAFINI et al., 2003; COSTA et al., 2004) e reforçam a complexidade de patógenos de potencial zoonótico que podem contaminar o produto destinado aos recém-nascidos.

Segundo as normas preconizadas pela RNBLH, os micro-organismos do grupo dos coliformes são utilizados como o principal indicador do controle sanitário para o leite humano ordenhado pasteurizado. O Ministério da Saúde estabeleceu como padrão de qualidade microbiológica a ausência de coliformes em 1 mL de leite, valor que permite elevado grau de segurança do produto, uma vez que a maioria dos enteropatógenos possuem dose infectante para crianças superior a 10^3 UFC/mL (ANVISA, 2007).

No presente estudo, 16,67% dos micro-organismos isolados foram classificados como pertencentes ao grupo das enterobactérias, incluindo *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Hafnia alvei*. Novak et al. (2001) ao avaliarem 837 amostras de LHO, observaram que 56,4% dos isolados foram representados por *Klebsiella pneumoniae*, 35,2% por *Enterobacter cloacae* e 4,2% por *E. coli*. Em contraste, não houve isolamento de *E. coli* no presente

estudo, fato que merece destaque em virtude deste micro-organismo ser considerado como o principal indicador de contaminação em BLH. No entanto, a presença de outras enterobactérias no leite das nutrizes sinaliza a necessidade da otimização das ações de prevenção de contaminação microbiana do leite a partir do ambiente, utensílios e fezes desde a colheita até o estoque, visto que, por vezes, este produto também é oferecido a recém-nascidos debilitados.

Enterobacter spp. (especialmente *E. sakazakii*) e *Klebsiella* spp. tem sido frequentemente reportados como patógenos associados a infecções hospitalares em neonatos (BIERING et al., 1989; CDC, 2001). Estes micro-organismos foram identificados no presente estudo em 15,59% das amostras avaliadas das nutrizes. A presença destas enterobactérias reforça que estas amostras possam ter sido obtidas e/ou estocadas sob condições higiênicas insatisfatórias, representando fator de risco para os recém-nascidos amamentados com leite fornecido pelo BLH.

A presença de diferentes patógenos no leite amostrado das nutrizes no presente estudo reforça a importância da exigência de pasteurização do LHO em banho-maria (mantido a 62,5 ^{o}C por 30 minuto) [RNBLH, 2006; ANVISA, 2007], visando minimizar os riscos de infecção em recém-nascidos pela ingestão deste alimento.

Dentre as amostras de leite bovino com e sem mastite, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium bovis* foram os micro-organismos mais comumente isolados. *S. aureus* e *S. saprophyticus* predominaram no leite de vacas com mastite. Mármore et al. (2006) ao avaliarem 864 amostras de leite de vacas verificaram que o gênero *Staphylococcus* também foi identificado em elevada frequência, responsável por 26,40% dos isolamentos. Este achado também foi descrito por outros autores que estudaram a mastite bovina (ANDRADE et al., 1998; FERREIRA et al., 2007; HARTMAN, et al. 2007), reiterando o predomínio do gênero *Staphylococcus* na etiologia das infecções mamárias em vacas.

No leite de cabras com mastite foram identificados 85,29% de isolados pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, dos quais *S. epidermidis* (36,21%), *S. lugdunensis* (25,86%) e *S. aureus* (13,79%) foram as espécies mais frequentemente identificadas. Estudos similares também verificaram elevada

prevalência de *Staphylococcus* spp. (83,80%) na mastite caprina (MOTA et al., 2000; MURICY, 2003; SCHMIDT et al., 2009; NEVES et al., 2010; GARINO JR. et al., 2011).

Mariano et al. (2007) investigaram as espécies de 184 isolados de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de cabras e obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo, identificando predominantemente linhagens de *S. aureus* (38,8%), *S. lugdunensis* (13,7%), *S. epidermidis* (13,7%). *S. capitis* (2,8%), *S. cohnii* (5,4%), *S. chromogenes* (2,8%), *S. simulans* (13,7%), S. *caprae* (2,8%), *S. haemolyticus* (2,8%) e *S. warneri* (2,8%). Peixoto et al. (2010) ao avaliarem 878 amostras de leite de cabras também verificaram alta prevalência de *Staphylococus* spp. (29,9%), dos quais *S. aureus* corresponderam a 16,9%, *S. hyicus* 11,7%, *S. intermedius* 7,1%, *S. epidermidis* 6,5%, *S. caprae* 7,8% e *S. simulans* 3,0%.

O predomínio de *Staphylococcus* spp. nas infecções mamárias em cabras é atribuído ao habitat deste micro-organismo na pele, mucosas e conjuntivas dos animais, particularmente no úbere de fêmeas (MORONI et al., 2005). O isolamento de espécies de estafilococos no leite de cabras encontradas geralmente em humanos, como *S. epidermidis*, *S. lugdunensis* e *S. auriculares* pode ser atribuído ao contato frequente desta espécie animal com seus tratadores, particularmente no momento da ordenha, que é realizada comumente de forma manual nesta espécie.

A baixa ocorrência de *Pseudomonas* spp., *Streptococcus* spp. e *E. coli* no leite de cabras concorda com os achados encontrados por White e Hinckley (1999) e Almeida (2009), que referem a baixa participação destes micro-organismos na gênese da mastite caprina.

Staphylococcus spp. também foi o agente mais prevalente dentre as estirpes isoladas de tetos de cabras e vacas negativos ao teste de Tamis e/ou CMT. Estes resultados evidenciam elevada ocorrência destas espécies animais como portadoras deste grupo de micro-organismos. Desta forma, reforça-se a necessidade da adoção de melhores práticas de higiene na ordenha, visto que estes micro-organismos não são identificados nas provas de rotina de diagnóstico de mastite clínica (Tamis) e subclínica (CMT), favorecendo a disseminação destes patógenos contagiosos no rebanho (COSTA, et a., 2005),

bem como os riscos em saúde pública pelo consumo de leite contaminado com estes micro-organismos patogênicos.

A preocupação com a utilização indevida de antimicrobianos, assim como o aumento da ocorrência de resistência bacteriana frente aos principais fármacos utilizados na medicina humana e animal, tem sido reiteradamente abordadas na literatura (BRITO et al., 2001; DEL FIOL e MINALI, 2006), principalmente pelos reflexos em saúde pública (ANVISA, 2007).

Os maiores índices de sensibilidade das linhagens aos antimicrobianos no presente estudo foram observados para amoxacilina com ácido clavulânico (79,62%), vancomicina (73,25%) e cefalexina (71,84%). Apesar de não estarem disponíveis antimicrobianos atóxicos, este grupo de fármacos podem ser indicados à nutrizes, visto que apresentam baixa excreção residual no leite e poucos efeitos tóxicos para neonatos em doses terapêuticas (AAP, 2001; BAR-OZ et al., 2003).

Há poucos dados na literatura relacionados ao uso da vancomicina em mulheres gestantes ou lactantes, assim como a ocorrência de reações indesejáveis atribuídas a este fármaco, ficando a indicação deste antimicrobiano restrita aos casos de sensibilidade às penicilinas, e resistência microbiana a eritromicina e clindamicina (WILHELM e ESTES, 1999; SUS, 2011).

As maiores taxas de resistência dos isolados de origem humana foram verificadas para penicilina (89,81%), ampicilina (85,99%) e oxacilina (75,16%). A multirresistência para cinco ou mais antimicrobianos foi observada em 66,24% dos isolados. As linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de LH apresentaram 55,24% de multirresistência frente a cinco ou mais fármacos testados.

Novak et al. (2001) verificaram multirresistência em isolados obtidos de leite humano frente a ampicilina (95,8%), cefalotina (67,0%), cefoxitina (59,1%), cefuroxima (8,4%), sulfametoxazol-trimetoprin (2,8%) e ceftriaxona (1,4%). A alta ocorrência de resistência dos isolados às penicilinas e derivados pode ser justificada pela utilização de fármacos no pós-parto e a automedicação, que contribuem para aumento da pressão seletiva de micro-organismos para este grupo de antimicrobianos.

Dentre as 240 amostras de leite humano analisadas, 85,00% revelaram a presença de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana. Este achado pode ser atribuído à administração destes fármacos na profilaxia das infecções no pós-parto (especialmente em casos de cesariana), pelo uso indiscriminado pelas nutrizes, ou mesmo secundário a ingestão de produtos e derivados de origem animal que contenham resíduos de antimicrobianos. A escassez de literatura abordando a detecção de resíduos de antimicrobianos ou substâncias inibidoras em leite humano indica que estudos similares devem ser conduzidos com o intuito de verificar a presença destes fármacos no leite oferecido aos neonatos e suas implicações aos lactentes.

Estudos envolvendo à sensibilidade microbiana “in vitro” em isolados de leite de vacas com mastite tem demostrado elevada resistência de certos grupos de patógenos a diferentes fármacos, notadamente estafilococos e enterobactérias (GARINO JR. 2000; RIBEIRO et al., 2006; NADER FILHO, et al., 2007a; SURIYASATHAPORN, 2010). Souza et al. (2008) ao avaliarem isolados de origem bacteriana provenientes de vacas positivas ao CMT verificaram elevada sensibilidade microbiana para gentamicina. Neste mesmo estudo, altas taxas de resistência dos isolados foram evidenciadas para ampicilina, amoxacilina, cefalexina, neomicina e trimetoprim.

No presente estudo, a totalidade dos isolados de leite obtidos de vacas com mastite apresentaram altas taxas de sensibilidade frente à amoxacilina com ácido clavulânico, cefalexina, cefoperazona e cefoxitina, enquanto os isolados de vacas sem mastite foram sensíveis principalmente a amoxacilina com ácido clavulânico, cefalexina e vancomicina. As maiores taxas de resistência para bactérias isoladas do leite bovino com mastite foram observadas para neomicina, sulfa/trimetoprim e gentamicina. Por outro lado, as maiores taxas de resistência dos isolados foram observadas para sulfa/trimetoprim, oxacilina, eritromicina e neomicina frente às linhagens obtidas de amostras negativas para mastite.

Estes resultados corroboram com os encontrados por Silva et al. (2008), que ao avaliarem os micro-organismos isolados de vacas com mastite verificaram altas taxas de sensibilidade dos isolados para amoxacilina com ácido clavulânico, cefalotina e cefalexina. Suriyasathaporn (2010) ao comparar

a sensibilidade microbiana de isolados de leite de vacas verificou altos índices de sensibilidade para cefalexina (100%) e cloxacilina (95,00%), e elevada resistência das linhagens frente à estreptomicina (95,65%), ampicilina (43,48%) e sulfametoprim (30,43%). Os achados sinalizam as cefalosporinas como fármacos efetivos para o tratamento de mastite em animais de produção (RIBEIRO, 2008).

A multirresistência aos antimicrobianos, caracterizada por certa linha de pesquisadores como a resistência do micro-organismo para mais de uma classe de antimicrobianos (SIEGEL et al., 2006), ou para mais de três fármacos (RIBEIRO et al., 2009; GARINO JR. et al.; 2011), também foi avaliada no presente estudo.

Foi verificada resistência múltipla a cinco ou mais fármacos em 53,74% e 40,82% dos micro-organismos isolados de leite de vacas com e sem mastite, respectivamente. Este resultado reforça que seria salutar que as abordagens terapêuticas de infecções mamárias em vacas na lactação e/ou no período seco, fossem respaldadas por testes de sensibilidade microbiana “in vitro”, proporcionando melhores taxas de cura, minimizando a pressão seletiva de isolados bacterianos multirresistentes (RIBEIRO, 2008).

Das amostras de leite de vacas com e sem mastite avaliadas verificou-se que 28,50% e 24,00%, respectivamente, foram positivas ao teste para presença de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras no leite. Nascimento et al. (2001) analisaram a ocorrência de resíduos de antimicrobianos em 96 amostras de leite pasteurizado comercializado em Piracicaba, SP, e observaram 50% de positividade. Almeida et al. (2003) investigaram o leite de 158 propriedades rurais situadas em Uberlândia, MG, e detectaram resíduos de beta-lactâmicos em 1,89% das amostras. Em contraste, Mendes et al. (2008) avaliaram 32 amostras de leite bovino comercializado clandestinamente na região de Mossoró, RN, e não obtiveram positividade no Delvotest^{TM}.

A elevada ocorrência de resistência dos isolados observada no estudo e a presença de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana no leite, pode ser justificada pelo uso indevido ou não racional de antimicrobianos no tratamento intramamário ou parenteral de vacas nas propriedades estudada.

Recentemente, também tem se relatado crescente resistência bacteriana “in vitro” aos principais agentes causadores de mastite em cabras frente aos antimicrobianos convencionais (LANGONI et al., 2006). À semelhança do que foi observado para micro-organismos de leite bovino, os isolados de leite de cabras com mastite apresentaram alta sensibilidade a amoxacilina com ácido clavulânico, cefalexina e vancomicina, enquanto os isolados de cabras sem mastite foram sensíveis principalmente para cefalexina, amoxacilina com ácido clavulânico e vancomicina.

Embora a vancomicina não seja indicada no tratamento de afecções em animais, estudos tem verificado a presença de micro-organismos resistentes a este fármaco isolados de fezes de frangos e pombos (POETA et al., 2005). Estes resultados sinalizam de forma preocupante para os riscos de infecções cruzadas entre humanos e animais, por linhagens vancomicina resistentes.

As maiores taxas de resistência para micro-organismos recuperados das cabras amostradas com mastite foram observadas para eritromicina, neomicina e sulfa/trimetoprim. Em contraste, dentre os patógenos obtidos de animais sem mastite a resistência dos isolados foi observada predominantemente para sulfa/trimetoprim, enrofloxacina e eritromicina. A baixa efetividade da neomicina e sulfa/trimetoprim nos animais amostrados pode encontrar justificativa na utilização destes grupamentos de antimicrobianos por várias décadas, no tratamento intramamário das mastites, fato que pode resultar na redução da efetividade frente aos patógenos.

A maioria das espécies de micro-organismos isoladas de leite das cabras, com e sem mastite, foram representadas por linhagens do gênero *Staphylococcus* spp. Schmidt et al. (2009) observaram elevada taxa de resistência de estirpes de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de cabras frente a ampicilina. Langoni et al. (2006) ao avaliarem micro-organismos isolados de leite de cabras com mastite subclínica, observaram sensibilidade das linhagens principalmente para oxacilina e gentamicina, e elevadas taxas de resistência frente a penicilina e ampicilina. Neves et al. (2010) e Garino Jr. et al. (2011) verificaram alta resistência bacteriana para penicilina e ampicilina em isolados obtidos de cabras, à semelhança do presente estudo, nos quais 63,18% e 60,63% dos patógenos isolados de cabras com mastite apresentaram resistência frente a penicilina e ampicilina, respectivamente.

Garino Jr. et al. (2011) salientaram que 42,86% dos micro-organismos isolados de cabras com mastite subclínica apresentaram resistência a três ou mais fármacos. Nas cabras amostradas no presente estudo foi verificado que 66,14% e 72,73% dos isolados de leite de cabras com e sem mastite respectivamente, apresentaram multirresistência a cinco ou mais antimicrobianos testados.

Dentre as linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de cabras com e sem mastite, 68,10% e 77,50% respectivamente, foram multirresistentes a cinco ou mais fármacos testados. Este achado também sinaliza necessidade do uso racional de antimicrobianos em cabras com mastite, com respaldo de testes de sensibilidade “in vitro”, visando melhorar as taxas de cura, bem como reduzir a ocorrência de linhagens multirresistentes isoladas do leite.

No presente estudo pôde-se verificar que o leite de cabras com e sem mastite apresentou, respectivamente, 21,00% e 11,50% de positividade para a presença de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana no leite. Santos (2005) ao avaliar 60 amostras de leite de cabras provenientes de seis miniusinas utilizando o método imunoenzimático para detecção de beta-lactâmicos verificou que 19 (31,66%) amostras foram positivas ao teste. Nardellli et al. (2006) verificaram 15,25% de positividade para presença de beta-lactâmicos em 118 amostras de leite caprino. Araújo (2008) ao avaliar 150 amostras de leite de cabras provenientes de duas miniusinas de dois municípios da Paraíba, utilizando o kit Delvotest^{TM}, detectou a presença de resíduos em 21,1% das amostras em uma propriedade, enquanto na outra, 24,0% das amostras foram positivas.

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite de cabras também merece preocupação e atenção da comunidade científica. O uso de anti-mastíticos elaborado para vacas no tratamento da mastite em cabras, e a ausência de produto específico para o tratamento da mastite em pequenos ruminantes, pode contribuir para a administração de doses elevadas nestes animais, que excedem o esperado de descarte do leite, favorecendo a presença de resíduos de fármacos no leite de cabras (RIBEIRO, 2008).

O uso indiscriminado de antimicrobianos contribui com a ocorrência de micro-organismos resistentes, principalmente do gênero *Staphylococcus*,

considerado problema emergente em saúde pública (CRAWFORD e DAUM, 2005; GRUNDMANN et al., 2006; COELHO et al., 2007).

A introdução da benzilpenicilina em 1944 culminou com as primeiras descrições de estirpes de *Staphylococcus* spp. produtores de betalactamases (KIRBY, 1944). Na década de 60, com o surgimento das penicilinas semi-sintéticas estáveis às betalactamases, como a meticilina e oxacilina, ocorreram os primeiros relatos de linhagens de *S. aureus* resistentes a estes novos fármacos, denominadas *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) [JEVONS, 1961]. Embora no Brasil se utilize a oxacilina em detrimento da meticilina no tratamento de infecções estafilocócicas, a sigla MRS tem sido empregada para designar linhagens de *Staphylococcus* spp. que não respondem ao tratamento com oxacilina (PINHEIRO, 2008).

No fim da década de 80, os isolados MRS receberam grande destaque na literatura científica devido a implicações deste micro-organismo em graves surtos de infecção hospitalar em berçários de unidade de terapia intensiva (MOREL et al., 2002; WINN JR et al., 2008). A possibilidade de veiculação intrafamiliar deste patógeno para neonatos e prematuros também foi reportada (TVENTEN et al., 1991; HOLLIS et al., 1995). Porém, embora MRS estejam implicados frequentemente em epidemias em berçários (MOREL et al., 2002), são pontuais os estudos descritos envolvendo a epidemiologia, com ênfase à transmissão do agente para os neonatos.

Novak et al. (2000) avaliaram 500 amostras de leite humano provenientes de cinco Bancos de Leite de diferentes estados brasileiros. Foram isoladas 171 estirpes de *S. aureus,* das quais 57 (11,40%) apresentaram resistência à meticilina e alta taxa de resistência para oxacilina. Reddy et al. (2007) investigaram 48 linhagens de *S. aureus* isolados de casos de mastite puerperal e verificaram a ocorrência de 21 (43,75%) MRSA isolados de leite humano. Pinheiro (2008) utilizou o método de difusão com discos de cefoxitina e oxacilina no estudo da ocorrência de estirpes de MRSA em dois grupos de lactantes, um com mastite puerperal e o outro negativo para mastite, observando a presença do patógeno em 11,30% e 7,1%, respectivamente.

A identificação fenotípica pelo método de difusão com discos tem mostrado baixa associação quando comparada a detecção do gene *mecA* em linhagens de *Staphylococcus* spp. Desta forma, a identificação genotípica

realizada por técnicas moleculares tem se mostrado fundamental para identificar a presença deste gene que confere resistência a meticilina (SWENSON e TENOVER, 2005; ZHANG et al., 2011). No presente estudo foi verificada elevada ocorrência de MRS em leite humano, visto que 33,33% dos ECP isolados de leite materno provenientes do Banco de Leite apresentaram resistência frente aos discos de cefoxitina e/ou oxacilina, e 93,33% aos discos de penicilina. O gene *mecA* foi detectado em 53,33% dos ECP avaliados. Dentre as 40 linhagens de ECN investigadas, 70,00% apresentaram resistência aos discos de cefoxitina e/ou oxacilina, enquanto 95,00% foram resistentes aos discos de penicilina e o gene *mecA* detectado em 75,00% dos ECN isolados.

Behari et al. (2004) relataram a ocorrência de septicemia e conjuntivite em dois neonatos que receberam leite materno por sonda nasogástrica. A presença de linhagens de MRSA foi verificada após a realização de hemocultura do primeiro bebê e cultura de exsudato conjuntival do segundo. Amostras de leite das duas mães foram cultivadas, identificando a presença de estirpes de MRSA. Todas as linhagens de MRSA foram confirmadas pela técnica de *pulsed-field*. No entanto, mães não apresentaram sinais de mastite puerperal. Este fato reforça os riscos de transmissão de linhagens MRSA pelo leite de mães aparentemente saudáveis para os neonatos, devendo ser levadas em consideração como potencialmente portadoras deste micro-organismo patogênico.

A transmissão de MRSA pelo leite materno também foi descrita nos EUA em dois casos de recém-nascidos, no qual uma menina que veio a óbito, e um menino, apresentaram septicemia por linhagens de MRSA. Estas linhagens foram isoladas do leite das mães, das quais a mãe da menina desenvolveu mastite puerperal, reforçando a preocupação das mães como portadoras de linhagens MRS (LACOUNTY, 2004).

A ocorrência de *Staphylococcus* resistentes a meticilina isolados de humanos motivou a comunidade científica a investigar a presença de MRS em isolados obtidos de animais domésticos (O´MAHONY et al., 2005., BEMIS et al., 2006; COELHO et al., 2007; KLEVENS et al., 2007). Com efeito, estudos nas últimas décadas têm divulgado a ocorrência de linhagens MRS em animais (BEMIS et al., 2006) e ressaltado os riscos da transmissão cruzada destes micro-organismos entre animais e humanos (WEESE et al., 2006; JUHÁSZ-

KASZANYITZKY; VAN LOO et al., 2007., MORGAN, 2008). A ocorrência destas linhagens em alimentos de origem animal e em animais de produção como bovinos, caprinos, suínos e frangos tem sido enfatizada pelos profissionais da saúde (LEE, 2003; KITAI et al., 2005; VOS et al., 2005; CORRENTE et al., 2007; NORMANNO et al., 2007; STASTKOVA, et al., 2009; FEβLER et al., 2010).

Na Coréia, Moon et al. (2007) avaliaram a sensibilidade antimicrobiana de 835 linhagens de *S. aureus* e 763 de ECN isoladas de vacas com mastite. Das linhagens isoladas, 21 (2,5%) *S. aureus* e 19 (2,4%) ECN apresentaram resistência a meticilina quando submetidas a prova de difusão com discos para oxacilina e confirmadas pelo teste de CIM com oxacilina. A presença do gene *mecA* foi observada em 13 linhagens de *S. aureus* e 12 de ECN. Estes resultados diferem dos encontrados no presente estudo, que verificou 06/20 (30,00%) linhagens de ECP e 06/20 (30,00%) de ECN isolados de vacas com mastite, resistentes aos discos de oxacilina, das quais apenas duas estirpes de ECN apresentaram resistência para oxacilina na CIM. Também não foram detectados no presente estudo, isolados de ECP com presença do gene *mecA.* Em contraste, dentre as 20 linhagens de ECN isoladas de vacas mastíticas, 8 (40,00%) apresentaram gene para resistência a meticilina. Destas, duas foram sensíveis aos discos de cefoxitina, oxacilina, penicilina e fita de oxacilina.

De maneira similar, Sawant et al. (2009) verificaram a presença de *mecA* em 32,43% dos ECN isolados do leite de vacas com mastite. Contrariamente, Juhász-Kaszanyitzky et al. (2007) ao avaliarem 375 linhagens de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica verificaram 27 (7,20%) MRSA, dos quais a presença do gene *mecA* foi observada em apenas oito estirpes. Bal et al. (2010) também encontraram número restrito de linhagens contendo o gene *mecA* ao estudar ECN isolados de casos de mastite subclínica em vacas. Porém, Feβler et al. (2010) investigaram a sensibilidade a oxacilina em 121 isolados de ECN utilizando as técnicas de difusão com discos e CIM, e verificaram 16 linhagens com resistência simultânea a estas duas provas, além da presença do gene *mecA* em 15 estirpes.

Com o notório crescimento mundial da caprinocultura leiteira, vários pesquisadores tem se preocupado em melhorar a qualidade do leite e derivados de origem caprina, destinados ao consumo humano. No entanto,

ainda são pontuais os estudos conduzidos na identificação e implicação de *Staphylococcus* spp. produtores de beta-lactamase e/ou linhagens MRS presentes no leite de cabras, bem como na detecção de animais portadores.

No presente estudo, a resistência dos isolados de caprinos frente à penicilina e sensibilidade à cefoxitina foi verificada, respectivamente, em 43,75% e 100,00% das linhagens de ECP, e 65,00% e 75,00% dos ECN isoladas de leite mastítico. Ressalta-se nos isolados das cabras amostradas, a alta ocorrência de resistência a penicilina (55,00%) e oxacilina (50,00%) em linhagens de ECN.

No Irã, Ebrahimi et al. (2010) encontraram dados diferentes ao avaliarem 23 linhagens de *Staphylococcus* spp. isolados de cabras com mastite subclínica. Dentre os isolados, 14 foram classificados como *S. aureus* e nove como *S. epidermidis*. A resistência frente aos discos de penicilina foi verificada em 100,00% dos *S. aureus* e 33,33% dos *S. epidermidis.*

No Brasil, Garino et al. (2011) avaliaram 42 linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de cabras com mastite subclínica quanto a sensibilidade aos antimicrobianos e a produção de beta-lactamase. As maiores taxas de resistência dos isolados foram observadas para penicilina (66,67%) e ampicilina (63,89%), enquanto elevada sensibilidade foi verificada para cefoxitina (97,62%). Neste mesmo estudo, linhagens de *Staphylococcus* spp. (73,81%) foram produtores de beta-lactamase.

Nos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de cabras no presente estudo, foram encontrados resultados semelhantes para resistência à penicilina e sensibilidade a cefoxitina, reforçando a baixa efetividade da penicilina frente ao micro-organismo. Em contraste, a boa efetividade das cefalosporinas nos isolados, sinaliza que este grupo de antimicrobianos pode ser recomendado nos tratamentos de mastite nesta espécie.

O gene para resistência à meticilina nos isolados de caprinos do presente estudo foi detectado em 01 (6,25%) *S. aureus* e 07 (35,00%) ECN identificados em cabras com mastite. O gene *mecA* foi idenificado em 15 (75,00%) dos ECN isolados de cabras negativas para mastite. Em Praga, Stastkova et al. (2009) coletaram 153 amostras de leite de cabras saudáveis e isolaram 34 linhagens de *S. aureus*. Destas, 05 (14,70%) linhagens apresentaram o gene *mecA* e 100,00% foram resistentes a oxacilina utilizando o teste de difusão com discos.

Estes achados divergem dos relatados por Virdi et al. (2010) na Itália, que não detectaram a presença do gene *mecA* em 25 linhagens de *S. aureus* e 75 de ECN isolados de leite de cabras com mastite subclínica. A escassez de investigações envolvendo a pesquisa do gene *mecA* em linhagens de *Staphylococcus* spp. isolados do leite de cabras limitou a comparação dos achados do presente estudo.

A detecção do gene *mecA* em linhagens de ECP e ECN isolados de amostras de leite humano, bovino e caprino evidenciados no presente estudo, alerta para a possibilidade de transmissão deste grupo de patógenos para consumidores de produtos lácteos, bem como aos bezerros e cabritos lactentes. Atenção especial deve ser dada principalmente para o isolamento de linhagens MRS presentes em leite proveniente do BLH, bem como de animais negativos para mastite, em virtude dos riscos, respectivamente, de mulheres e animais como portadores deste micro-organismo, responsável por graves surtos de toxi-infecção, especialmente em pacientes imunossuprimidos.

Além da possibilidade das linhagens de *Staphylococcus* spp. apresentarem resistência aos antimicrobianos - principalmente do grupo dos beta-lactâmicos -, estas bactérias também podem veicular toxinas aos humanos pela ingestão de alimentos (SALES et al., 2000; RADOSTITS et al., 2007; WINN JR., et al, 2008).

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são toxinas pirogênicas de baixo peso molecular, termoestáveis, que resistem à pasteurização e ultrapasteurização, favorecendo sua permanência em alimentos, incluindo o leite e derivados (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). São conhecidas como superantígenos por estimularem resposta inespecífica de linfócitos T e aumentarem a liberação de citocinas, levando a toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune (BALABAN e RASOOLY, 2000).

As elevadas taxas de toxi-infecções em neonatos, particularmente prematuros, têm preocupado os profissionais de saúde (SOHN et al., 2001). A ocorrência de mastite puerperal, a colonização da microbiota materna por micro-organismos patogênicos e oportunistas, a manipulação e o armazenamento inadequado de leite materno ou fórmulas infantis, assim como a introdução de líquidos e/ou alimentos complementares na dieta de neonatos são apontados como as principais causas de intoxicação alimentar em crianças

recém-nascidas (NOVAK e ALMEIDA, 2002; OPAS, 2003; RNBLH, 2006). A presença de micro-organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* com potencial toxigênico tem sido observada com elevada frequência em LHO proveniente de mães sadias (NETO et al., 2001; SERAFINI et al., 2003; COSTA et al., 2004; DELGADO et al., 2009), bem como nos casos de mastite puerperal (SALES et al., 2000).

Na Nigéria, Adekeye e Adesiyun (1984) investigaram a produção de toxinas em estafilococos isolados de 251 mulheres lactantes. Dentre as 216 linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas, 86 foram produtoras de enterotoxinas dos tipos A (19%), B (9,7%) e C (3,7%). Destas, dez estirpes produziram concomitantemente os três tipos de enterotoxinas.

No Brasil, Pereira et al. (1995) investigaram a presença de micro-organismos no leite materno de 19 mulheres, nove sadias e dez com sinais clínicos de mastite. Os autores identificaram *S. aureus* em 13 amostras de leite, das quais oito produziram quantidades detectáveis de enterotoxinas utilizando o método de aglutinação em látex. Neste estudo foram detectadas SEA, SEB, SEC e TSST-1 em três linhagens coagulase positivas e SEA e SEB em cinco estirpes coagulase negativas. Novak et al. (2000) avaliaram a produção de SE em 40 estirpes de *S. aureus* meticilina-resistentes isoladas de leite materno humano, e observaram que apenas duas produziram SEB.

No presente estudo, dentre os 15 isolados de ECP obtidos de leite humano, em 03 (20,00%) linhagens foi detectado o gene *sea* e igual quantidade para os genes *seb* e *sec*, além de identificarmos em duas estirpes o gene *tsst-1*. A associação de dois ou mais genes foi verificada em 26,66% das linhagens, com destaque para duas associações entre *sea* e *tsst-1*, uma entre *sea* e *sec* e outra entre sea, seb e sec. Duas linhagens foram produtoras de toxinas estafilocócicas, das quais uma produziu SEA e TSST-1, e a outra SEA e SEC.

Recentemente no Brasil, Carneiro et al. (2004) ao avaliarem 54 estirpes de *Staphylococcus* spp. isolados de leite humano provenientes de um hospital do Rio de Janeiro, verificaram elevada ocorrência de ECN. Do total de amostras, foram isoladas predominantemente linhagens de *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus* e *S. aureus*, todas identificadas por Multiplex PCR para detecção de genes para SE. Foram detectados nos isolados os genes

sea, *seg* e *seh* em três linhagens de *S. epidermidis*. No presente estudo, dentre as 40 amostras de ECN isoladas de leite humano, 90,0% apresentaram o gene codificador para SEA, 5,00% para SEB e 15,00% para SEC. Vinte e três linhagens de *S. epidermidis* apresentaram o gene *sea.* A associação de dois ou mais genes foi verificada em 17,50% das linhagens, representadas pelos genes *sea* e *sec* (12,50%) e por *sea* e *seb* (5,00%). Ademais, uma linhagem de *S. warneri* produziu SEA e outra de *S. simulans* produziu SEB. Os achados do presente estudo alertam para o risco dos ECN na gênese de toxi-infecções neonatais

Diferentes estudos tem demonstrado a detecção de vários tipos de enterotoxinas em linhagens de *Staphylococcus* spp. provenientes de humanos sadios (OMOE et al., 2002), manipuladores de alimentos (RAPINI et al., 2005; RALL et al., 2010) e em outras espécimes clínicos de humanos (HATA et al., 2008). No entanto, atenção especial deve ser dada à capacidade toxigênica de ECP e ECN isoladas de leite humano, em fórmulas lácteas oferecidas a recém nascidos e na mastite puerperal.

Estudos epidemiológicos em âmbito nacional e internacional têm demonstrado a presença do gênero *Staphylococcus* em aproximadamente 50% dos casos de infecção da glândula mamária de bovinos (BRABES et al., 1999). A predominância de ECP e ECN em isolados de casos de mastite bovina (LAMAITA et al., 2005; STAMFORD et al., 2006; FERREIRA et al., 2007; BORGES et al., 2008) e caprina (MOTA et al. 2000; MARIANO et al., 2007; SCHMIDT et al., 2009; PEIXOTO et al., 2010) tem sido ressaltada também por diversos pesquisadores.

A capacidade de produzir uma ou mais toxinas é encontrada entre 30 a 50% das linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite, das quais as enterotoxinas A, B, C e D são, notadamente, as mais patogênicas tanto para humanos quanto para animais (CARDOSO et al, 1999; DINGES et al., 2000; PEIXOTO et al., 2010). A produção de SEA, SEB, SEC e SED, isoladas ou em associação, tem sido descrita em linhagens de *Staphylococcus* spp. provenientes de leite bovino cru (GARCIA et al., 1980; LAMAITA et al., 2005). A detecção destas enterotoxinas também já foi referida em isolados provenientes de amostras de queijo analisadas na França (ROSEC et al., 1997) e no Brasil (BORGES et al., 2008).

No Brasil, tem-se observado a preocupação dos pesquisadores na última década, em investigar os genes codificadores para as enterotoxinas A, B, C, D e TSST-1 e/ou a detecção destas toxinas. Em Minas Gerais, Cardoso et al. (2000) avaliaram 127 linhagens de *S. aureus* isolados de mastite bovina e verificaram a produção de TSST-1 (47,00%), SED (30,00%), SEB (19,00%), SEC (9,00%) e SEA (4,00%). Em Londrina, Santana et al. (2006) investigaram 18 linhagens de ECN e 106 de ECP isoladas de leite bovino para a produção de enterotoxinas, e verificaram produção de SEA (5,5%) em ambas as estirpes. Em Recife, Luz (2008) avaliou 94 linhagens de *S. aureus* isolados de leite de vacas mastíticas e de queijo coalho, e detectaram os genes *seg, seh, sei* e *sej,* responsáveis pela produção de toxinas em 93,6% dos isolados.

Santana et al. (2010) pesquisaram a detecção de gene para enterotoxinas em 51 estirpes de *Staphylococcus* spp. isolados de leite cru bovino obtidos de animais do Paraná e Santa Catarina, e verificaram que 14 isolados apresentavam o gene *sea*. No Piauí, Oliveira et al. (2011) ao pesquisarem 574 linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite cru de vacas verificaram a produção de SEA e SED, e detectaram os genes *sea* (32,75%), *seb* (3,44%), *sec* (39,65%) e *sed* (3,44%).

No presente estudo, 15,00% dos ECP e 50,00% dos ECN isolados de leite de vacas com mastite apresentaram pelo menos um gene para uma das enterotoxinas pesquisadas. Foi detectado o gene *sea* em 10,00% dos ECP isolados de vacas com mastite e uma estirpe apresentou associação entre os genes *sea* e *sec.* Dentre os ECN avaliados, foram observados a presença dos genes *sea* (25,00%), *seb* (10,00%) e *sec* (5,00%). A associação entre *sea* e *sec* também foi observada em dois isolados. Linhagens coagulase negativas isoladas de leite de vacas sadias apresentaram a presença dos genes *sea* (21,42%), *seb* (14,29%) e *sec* (7,14%). Duas linhagens apresentaram associação entre *sea, seb, sec* e *sed*, sendo que uma delas foi produtora de SEC. Diferentemente do reportado em estudos similares, nas vacas amostradas, não foram isoladas linhagens de ECP ou ECN de leite de vacas com ou sem mastite, que indicasse a presença do gene para a enterotoxina D e toxina da síndrome do choque tóxico.

Pesquisas em outros países também tem demostrado a preocupação com o isolamento de *S. aureus* produtores de toxinas, e a ocorrência de novas

enterotoxinas em amostras de leite. Nos EUA, foram descritas linhagens de *S. aureus* isoladas de leite de vacas produtoras de SEC e SED (CENCI-GOGA, et al. 2003). A detecção de genes *sen* e *seo* foi descrita por Blaiotta et al. (2004) na Itália, em linhagens de *S. aureus* provenientes de propriedades leiteiras. Na Palestina, Adwan et al. (2005), encontraram linhagens de *S. aureus* provenientes de leite cru contendo os genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed.* No Japão, Hata et al. (2008) ao pesquisarem a presença de genes para enterotoxinas em linhagens de *S. aureus* isolados de leite de vacas com mastite verificaram em 109/231 (47,18%) isolados a presença do gene *sec*. Na Turquia, Karahan et al. (2009) encontraram, respectivamente, genes para pelo menos uma enterotoxina e toxina da síndrome do choque-tóxico em 29,30% e 3,3% das linhagens de *S. aureus* isolados de vacas mastíticas.

Linhagens de *Staphylococcus* spp. produtoras de enterotoxinas isoladas de leite caprino também tem sido alvo de estudos, uma vez que o consumo deste produto tem aumentado, estimulado pela fácil digestibilidade, aliado a suas propriedades hipoalergênicas (MARIANO et al., 2007; LAGUNA, 2010). Espécies toxigênicas de ECN isoladas de leite caprino produtoras de SEA, SEB, SEC, SED e SEE foram detectadas em diferentes países (VALLE et al., 1990; VERNOZY-ROZAND et al. 1996; MARIANO et al., 2007). Em contraste, Buyser et al. (1987) na França e Harvey e Gilmour (1988) na Irlanda , não detectaram linhagens toxigênicas em ECN isolados do leite de cabras.

Na Suíça, Scherrer et al. (2004) detectaram o gene para enterotoxinas estafilocócica e *tsst-1* em 191 linhagens de *S. aureus* isolados de 127 amostras de leite de cabras e de ovelhas, obtidas de tanques de expansão. Além dos genes *sea, seb, sec, sed* e *see* também foram identificados *seg, sei, sej* e *tsst-1* em estafilococos isolados do leite de cabras e ovelhas provenientes de tanque de expansão.

No Brasil, Silva et al. (2005) ao avaliarem 36 linhagens de *S. aureus* isoladas de mastite caprina detectaram o gene *sec* em 86% das estirpes estudadas. Poiatti et al. (2005) investigaram a capacidade de produção de enterotoxinas em 255 amostras de leite de cabra ”in natura”, pasteurizado e congelado. Neste estudo foram isoladas 143 linhagens de *Staphylococcus* spp., das quais 32,7% de ECP e 67,3% ECN. Dentre os coagulase positivos, 10,6% dos isolados obtidos de leite “in natura” produziram SEA e SEB e 6,5%

SEA, SEB e SEC. No presente estudo, dentre as linhagens de *S. aureus* e ECN isoladas de cabras com mastite, 50,00% e 55,00%, respectivamente, apresentaram um ou mais genes para enterotoxinas.

À semelhança do que se tem observado em outros estudos, 37,50% dos isolados de ECP apresentaram gene *sea*, 12,50%, 18,75% o gene *sec* e 6,25% o *tsst-1*. A associação dos genes *seb* e *sec* foi verificada em 6,25% das linhagens. Mariano et al. (2007) verificaram a ocorrência associada dos genes *seb* e *sec* (16,7%), *sec* e *sed* (11,1%) e *seb, sec* e *sed* (5,6%). No presente estudo, apenas uma (6,25%) linhagem de ECP isolada de leite de cabras com mastite produziu quatro toxinas pesquisadas (A, B, C e TSST-1). Diferentemente de outros autores, não foi detectada a presença de linhagens contendo o gene que codifica a enterotoxina D. Dentre os ECN avaliados nos isolados de cabras foram detectados os genes *sea* (40,00%) e *sec* (20,00%).

A associação de *sea* e *sec* foi verificada em apenas uma linhagem. A detecção de genes para enterotoxinas foi observado em 50,00% dos ECN isolados de cabras sem mastite. Destes, 30,00% apresentaram o gene *sea*.

A presença de ECN produtores de enterotoxinas no leite humano, bovino e caprino, bem como em seus derivados reforça a necessidade de estudos continuados na detecção de linhagens toxigênicas do gênero *Staphylococcus*. Salienta também a importância de boas práticas na obtenção da ordenha higiênica, particularmente no tocante a adoção de ações de controle dos micro-organismos contagiosos, cujo gênero *Staphylococcus* é o principal agente causal de mastite.

7. CONCLUSÕES

- As características físico-químicas (acidez e crematócrito) de leite materno, proveniente do BLH do HC da Faculdade de Medicina de Botucatu, encontram-se em sua maioria dentro dos limites acetáveis pela RNBLH, sinalizando condições satisfatórias de obtenção de leite das nutrizes;
- Os valores de acidez dornic do leite de vacas e cabras, com e sem mastite, apresentaram ampla variação indicando que outros fatores, além da contaminação microbiana do leite, podem interferir nos índices de acidez, limitando o uso isolado deste parâmetro na avaliação da qualidade do produto;
- A alta frequência de isolamento de *Staphylococcus* spp. no leite das mulheres reforça o predomínio deste patógeno no alimento, e a necessidade de intensificação das condições de higiene na obtenção e estoque do leite das nutrizes no BLH;
- A presença de outros patógenos no leite das nutrizes, particularmente da família enterobacteriaceae (*Enterobacter* spp., e *Klebsiella* spp) geralmente associados a infecções hospitalares neonatais, sinaliza riscos de contaminação do leite por micro-organismos presentes no ambiente, em utensílios e/ou material fecal, devido principalmente, a falta de higiene pessoal;
- A alta frequência de isolamento de *Staphylococcus* spp., *Streptococus* spp. e *Corynebacterium bovis* no leite de vacas e *Staphylococcus* spp. em leite de cabras indica o predomínio destes micro-organismos contagiosos na gênese da mastite nestas espécie;
- A presença de micro-organismos em cerca de 25,00% das amostras de leite de vacas e cabras sem mastite alerta para a presença de animais portadores de patógenos no rebanho, e a necessidade de adoção contínua de boas práticas de ordenha e de medidas de profilaxia e controle da mastite;
- Amoxacilina com ácido clavulânico, cefalexina e vancomicina foram os antimicrobianos mais efetivos frente aos micro-organismos isolados de leite humano, podendo ser recomendados no pós-parto ou no tratamento da mastite lactacional em mulheres;
- Amoxacilina com ácido clavulânico e as cefalosporinas foram os fármacos mais efetivos frente aos micro-organismos isolados de leite de vacas

e cabras com e sem mastite. Estes antimicrobianos - especialmente àqueles pertencentes ao grupo das cefalosporinas - podem ser indicados no tratamento de afecções mamárias em bovinos e caprinos devido a boa efetividade e disponibilidade comercial para aplicação intra-mamária;

- As elevadas taxas de multirresistência dos micro-organismos isolados em leite humano alertam para o uso indiscriminado de fármacos pelas nutrizes e reforçam a importância do uso de antimicrobianos de forma racional e respaldados por testes de sensibilidade microbiana “in vitro”;
- A multirresistência microbiana dos isolados de leite de vacas e cabras com e sem mastite ressalta a importância do uso de antimicrobianos no tratamento ou profilaxia das infecções na criação respaldados em testes de sensibilidade microbiana “in vitro”;
- A detecção de resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras da multiplicação microbiana em amostras de leite humano, bovino e caprino alerta para os riscos de reações orgânicas adversas representadas pelo consumo de leite pelos recém-nascidos, ou consumo de produtos e derivados lácteos pela população em geral;
- A ocorrência de linhagens resistentes a cefoxitina e/ou oxacilina, bem como a detecção de estirpes que expressem o gene *mecA* encontradas em amostras de LH indica que o leite das mães pode ser considerado via de transmissão de bactérias multirresistentes para os neonatos;
- A presença de linhagens MRS em leite bovino e caprino alerta para os riscos de veiculação destes patógenos para humanos pela ingestão de leite;
- A presença de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite proveniente de BLH, contendo os genes *sea*, *seb*, *sec* e *tsst-1* e produtoras de enterotoxinas e toxina da síndrome do choque tóxico revela preocupação com a colheita e armazenamento do leite em BLH e fornecimento deste alimento a neonatos, especialmente, prematuros e imunossuprimidos;
- A presença de linhagens de *Staphylococcus* spp. toxigênicas ou que contenham os genes para toxinas isoladas de leite de vacas e cabras, com e sem mastite, reforça a preocupação com os riscos de toxinfecções alimentares, pelo consumo de leite e derivados oriundos de animais de produção.

8. REFERÊNCIAS

AAP - American Academy of Pediatrics. Working Group on Breast-feeding: The transfer of drugs and other chemicals into human milk. **Pediatrics**, v.108, p.776-789, 2001.

ADEKEYE, J.D.; ADESIYUN, A.A. Frequency of isolation of enterotoxigenic staphylococci from milk of nursing mothers in Kaduna, Nigeria. **Journal of Hygiene**, v.93, p.531–538, 1984.

ADWAN, G.; ABU-SHANAB, B.; ADWAN, K. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw milk in the North of Palestine. **Turkey Journal of Biology**, v.29, p.229-232, 2005.

AKSIT, S.; OZKAVIN, N.; CAGLAYAN, S. Effect of sucking characteristics on breast milk creamatocrit. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v.16, p.355-360, 2002.

ALBUQUERQUE, L.M.B.; MELO, V.M.; MARTINS, S.C.S. Investigação sobre a presença de resíduos de antibióticos em leite comercializado em Fortaleza. **Revista Higiene Alimentar**, v.10, p.29-32, 1996.

ALMEIDA, A.C.; SILVA, G.L.M.; FONSECA, Y.M.; BUELTA, T.T.M.; FERNANDES, E.C. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru consumido na cidade de Alfenas, MG. **Revista da Universidade de Alfenas**, v.2, p.165-168, 1999.

ALMEIDA, J.A.G. **Amamentação um híbrido natureza-cultural**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1999, 120p.

ALMEIDA, J.F. **Agentes infecciosos causadores de mastite e parâmetros físico-químicos na qualidade do leite de cabra *in natura.*** 2009. 106f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2009.

ALMEIDA, L.P.; VIEIRA, R.L.; ROSSI, D.A.; CARNEIRO, A.L.; ROCHA, M.L. Resíduos no leite de propriedades rurais da região de Uberlândia – MG. **Bioscience Journal**, v.19, p.83-87, 2003.

ALVES, D. R. **Industrialização e comercialização do leite de consumo no Brasil.** Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. 532 p.

ANDRADE, M.A.; MESUITA, A.J.; DIAS FILHO, F.C.; JAYME, V.S. Prevalência e etiologia de mastite bovina subclínica em propriedades do Estado de Goiás que utilizaram ordenhadeiras na obtenção de leite. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária de Goiás**, 28, p.29-42, 1998.

ANVISA **-** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos**. Brasília: Anvisa, 2007. 156 p.

ARAÚJO, V.J.A. **Qualidade do leite de cabra in natura processado em mini-usinas do médio sertão e cariri paraibano: estudo comparativo**. 2008. 62f. Monografia - Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2008.

ARCHER, G.L.; CLIMO, M.W. Antimicrobiol susceptibility of coagulase negative *Staphylococci*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, p.2231-2237, 1994.

ARIAS-CAMISON, J.M. Late onset group B Streptococcal infection from maternal expressed breast milk in a very low birth weight infant. **Journal of Perinatology**, v.23, p.691-692, 2003.

BAIRD-PARKER, A.C. The Staphylococci: an introduction. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v19, p.1S-8S,1990.

BAKER, J.S. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.19, p.875-879, 1984.

BAL, E.B.B.; BAYAR, S.; BAL, M.A. Antimicrobial susceptibilities of coagulase-negative staphylococci (CNS) and streptococci from bovine subclinical mastitis cases. **The Journal of Microbiology**, v.48, p.267-274, 2010.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.61, p.1-10, 2000.

BAR-OZ, B.; BULKOWSTEIN, M.; BENYAMINI, L.; GREENBERG, R.; SORIANO, I.; ZIMMERMAN, D.; BORTNIK, O. BERKOVITCH, M. Use of Antibiotic and Analgesic Drugs during Lactation. **Drug Safety**, v.26, p.935-25, 2003.

BEHARI, P.; ENGLUND, J; ALCASID G.; GARCIA-HOUCHINS, S.; WEBER, S.G. Trasmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to preterm infants through breast milk. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.25, p.778-780, 2004.

BEMIS, D.A.; JONES, R.D.; HIATT, L.E.; OFORI, E.D.; ROHRBACH, B.W.; FRANK, L.A.; KANIA, S.A. Comparison of tests to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* isolates from canine hosts. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.3374-3376, 2006.

BERGDOLL, M.S.; CHESNEY, P.J. **Toxic shock syndrome**. Boston: CRC, 1991. 235p.

BERGDOLL, M.S. Importance of staphylococci that produce nanogram quantities of enterotoxin. **Zentralblatt fur Bakteriologie**, v.282, p.1-6, 1995.

BIERING, G.; KARLSSON, S.; CLARK, N.C.; JÓNSDÓTTIR, K.E., LÚDVÍGSSON, P., STEINGRÍMSSON, O. Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. **Journal Clinical Microbiology**, v.27, p.2054-2056, 1989.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE AND, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. Strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seL in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.719-730, 2004.

BORGES, M.F.; NASSU R.T.; PEREIRA, J.L. et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**. v.38, p.1431-1438, 2008.

BRABES, K.C.S.; CARVALHO, E.P.; DIONÍSIO, F.L.; PEREIRA, M.L.; GARINO, F.; COSTA, E.O. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Napgama**, p.4-11, 1999.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.37 de 31 de outubro de 2000.** Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra. 2000. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/InstruçãoNormativa37>. Acesso em 10 abr 2011.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.051 de 18 de setembro de 2002. **Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel**. 2002. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/InstruçãoNormativa51>. Acesso em 28 mai 2011.

BRASIL - Ministério da Agricultura**. Instrução Normativa n.22 de 14 de abril de 2003. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produto lácteos**. Brasília, 2003. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/. Titulação em graus dornic. Leite>. Acesso em: 28 mai 2011.

BRANDÃO, S.C.C; MATEDI, M.A.L.; CARDOSO, M.G.L.O. **Alergia e Intolerância ao Leite de Vaca.** 2003. Disponível em: <http://www.dta.ufv.br/artigos/tolerancia.htm>, Acesso em 30 jul 2011.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.531-537, 2001.

BRITO, M.A.V.P. Diagnóstico microbiológico da mastite bovina. In: Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009. Belo Horizonte, **Anais...**Belo Horizonte, v.8, p.13, 2009.

BUYSER, M.L.; DILASSER, F.; HUMMEL. R.; BERGDOLL, M.S. Enterotoxins and Toxic Shock Syndrome Toxin- I production by staphylococci isolated from goat's milk. **International Journal of Food Microbialogy,** v.5, p.301 309, 1987.

CARDOSO, H.F.T.; SILVA, N.; SENA, M.J.; CARMO, L.S. Production of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.347-349, 1999.

CARDOSO, H. F. T.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque-tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, p.7-10, 2000.

CARDOSO, S.M.M.; LIPINSKI, J.M.; SCHNEIDER, R.R. Atuação do enfermeiro na promoção e manutenção do aleitamento materno. In: Congresso brasileiro de enfermagem, 2005. Goiânia, **Anais eletrônico...** Goiânia v.1, p.36-43, 2005.

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 Brasil. **Food Microbiology,** v.19, p.9-14, 2002.

CARNEIRO, L.A.M.; QUEIROZ, M.L.P.; MERQUIOR, V.L.C. Antimicrobial-resistance and enterotoxin-encoding genes among staphylococci isolated from expressed human breast milk. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.761–768, 2004.

CAVALCANTE, J.L.P.; TELLES, F.J.S.; PEIXOTO, M.M.L.V.; RODRIGUES, R.C.B. Uso da acidez titulável no controle de qualidade do leite humano ordenhado. **Ciência** e **Tecnologia de Alimentos**, v.25, p. 103-108, 2005.

CARVALHO, L.A.; NOVAES, L.P.; GOMES, AT.;MIRANDA, J.E.C.; RIBEIRO, A.C.C.L. **Sistema de produção de leite (zona da mata).** 2003, Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br.htm>, Acesso em: 04 de julho de 2011.

CENCI-GOGA, B.T.; KARAMA, M.; ROSSITO, P.V.; MORGANTE, R.A.; CULLOR, J.S. Enterotoxin production by *S. aureus* isolated from mastitic cows. **Journal of Food Protection,** v.66, p.1693-1696, 2003.

CDC - Centers for Disease Control and Prevetion. *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula – Tennessee, 2001. **Morbidity and Mortality Weekly Report,** v.51, p.298-300, 1989.

CHAVES, R.G.; LAMOUNIER, J.A.; CÉSAR, C.C. Medicamentos e amamentação: atualização e revisão aplicadas à clínica materno-infantil, **Revista Paulista de Pediatria**, v.25, p. 276-288, 2007.

CLIVER, D.O. **Foodborne disease handbook:** diseases caused by bacteria. New York: Marcel Dekker, 1994. 613p.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement.** v.30, nº 01, CLSI document M100-S20. USA, 2010.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard –** 9.ed., v.26 CLSI document M2-A9. USA, 2006.

COELHO, S.M.O.; MORAES, R.A.M.; SOARES, L.C.; PEREIRA, I.A.; GOMES, L.P.; SOUZA, M.M.S. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mec*A em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência Rural**, v.37, p.195-200, 2007.

CORDEIRO, P.R.C.; CORDEIRO, A.G.P.C. A produção de leite de cabra no Brasil e seu mercado. In: X Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas e Media Mogiana, 2009, Espírito Santo do Pinhal, **Anais**... Espírito Santo do Pinhal, p.1-7, 2009.

CORRENTE, M.; NORMANNO, G.; MARTELLA, V.; BELLACICCO, A.L.; QUAGLIA, N.C.; DAMBROSIO, A.; BUONAVOGLIA, M.D.; BUONAVOGLIA, C. Comparison of methods for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from food products. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.535-539, 2007.

COSTA, A.C.; SOUZA, C.P.; FILHO, L.S. Caracterização microbiológica do leite humano processado em banco de leite de João Pessoa – PB. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.36, p.225-229, 2004.

COSTA, A.L. **Leite caprino: um novo enfoque de pesquisa**. Disponível em: <http://www.fmvz.unesp.br/Informativos/ovinos/utilid09.htm>. Acesso em 28 jul 2011.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; GARINO JR., F.; SILVA, J.A.B.; WATANABE, E.T.; DEBLIRE, E.; LEÃO, E.F. Portador: um importante elo na epidemiologia de mastite infecciosa bovina, **Revista Napgama**, v.8, p.3-5, 2005.

COSTA, H.F.; ÁVILA, I.; GONÇALVES, M.M. Antibioticoterapia profilática em obstetrícia: comparação entre esquemas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.20, p.509-515, 1998.

CRAWFORD, S.E.; DAUM, R.S. Epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: modern times for ancient pathogen. **Pediatric Infectious Disease Journal**. v.24, p.459-460, 2005.

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**, v.19, p. 299-305, 2005.

CUNHA, F.L. **Avaliação da qualidade microbiológica, fisico-química e contagem de células somáticas em leite de cabra produzido na região de Nova Friburgo-RJ:** Metodologia tradicional versus metodologia eletrônica. 2007. 73f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2007.

CUNHA, M.L.R.S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R.A.O.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.70-74, 2006.

CUNHA, M.L.R.S.; SENZATO, Y.K.; SILVEIRA, L.V.A. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative Staphylococci. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.855-860, 2004.

DEBEUF, J.P.; MORAND-FEHR, P. RUBINO,R. Situation, changes and future of goat industry around the world. **Small Ruminant Research**, v.51, p. 165-173, 2004.

DEL CIAMPO, L.A.; RICCO, R.G. Aleitamento materno e antimicrobianos. **Revista Paulista de Pediatria**, v.24, p. 57-61, 2006.

DEL FIOL, F.S.; MINALI, B.L. Uso de antibióticos durante a amamentação. **Revista Brasileira de Medicina**, p.208-212, 2006.

DELGADO, S.; ARROYO, R.; JIMÉNEZ, E.; MARÍN, M.L.; DEL CAMPOS, R.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, J.M. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. **Microbiology**, v. 9, p.82, 2009.

DONNELLY, C.B.; LESLIE, J.E.; BLACK, L.A.; LEWIS, K.H. Serological identification of enterotoxigenic estafilococócica from cheese. **Letters in Applied Microbiology,** v.15, p.1382-1387, 1967.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus.* **Clinical Microbiological Review**, v.13, p.16–34, 2000.

EBRAHIMI, A.; SHAMS, N.; SHAHROKH, S.; MIRSHOKRAEI, P. Characteristics of Staphylococci isolated from mastitic goat milk in Iranian dairy herds. **Veterinary World**, v. 3, p.205-208, 2010.

EUZÉBY, L.P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Staphylococcus***, 2011. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.htm>. Acesso em: 28 jul 2011.

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

FERREIRA, J.L.; LINS, J.L.F.H.A.; CAVALCANT, T.V.; MACEDO, N.A.; BORJAS, A.R. Prevalência e etiologia da mastite bovina no município de Teresina, Piauí. **Ciência Animal Brasileira,** v.8, p. 261-266, 2007.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Value of agricultural production,** 2009. Disponível em: <http://www.faofast.fao.org > Acesso em: 20 jul 2011.

FEßLER, A.; BILLERBECK, C.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.5, p.1-7, 2010.

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz. **Banco de leite humano.** Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/redeblh/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>, Acesso em 6 jul 2011.

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

FONSECA, L.F.; SANTOS, M.V. **Estratégia para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite.** 2 ed. Manole: Barueri, 2007. p.314.

FOXMAN, B.; D'ARCY, H.; GILLESPIE, B.; BOBO, J.K.; SCHWARTZ, K. Lactation Mastitis: Occurrence and Medical Management among 946 Breastfeeding Women in the United States**. American Journal of Epidemiology**, v.155, p.103-114, 2002.

GALHARDO, A.L.S.M.; ARAÚJO, W.M.C.; BORGO, L.A. Acidez Dornic como parâmetro de qualidade em bancos de leite humano. **Higiene Alimentar**, v.16, p.16-27, 2002.

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

GARINO JR., F.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B; RIBEIRO, M.G.; COSTA, E.O. Avaliação da susceptibilidade "in vitro" aos antimicrobianos e pesquisa de produção de β-lactamase de cepas de *Escherichia coli*, isoladas de mastite bovina. **Revista Napgama**, v.3, n.2, p. 19-22, 2000.

GARINO JR., F.; CAMBOIM, E.K.A.; NEVES, P.B et al., Suscetibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no semi-árido paraibano. **Arquivo do Instituto Biológico**. v.78, p.103-107, 2011.

GONÇALVES, H. C.; SILAV, M. A.; WECHSLER, F. S.; RAMOS, A. A. Fatores genéticos e de meio na produção de leite de caprinos leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia** , v. 30, p. 719-729, 2001.

GOTTARDI, C.P.T; MURICY, R.F.; CARDOSO, M.; SCHMIDT, V. Qualidade higiênica de leite caprino por contagem de coliformes e estafilococos. **Ciência Rural**, v.38, p.743-748, 2008.

GREINER, T. **History of breastfeeding**. New York: WABA-World Alliance for Breastfeeding Action, 1998, 4p.

GRUNDMANN, H.; SOUSA, M.A.; BOYCE, J.E, TIEMERSMA, E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. **Lancet**, v.38, p.874-885, 2006.

GYLES, C. L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.734-746, 1992.

GRZESIAK, T. O leite de cabra: leite do futuro para as crianças. In: Interesses nutritivos e dietéticos do leite de cabra, Niort. **Anais...**Paris: INRA, 1997, p. 22-37.

HALLANDER, H. Production of large quantities of entrotoxin B and other staphylococcal toxins on solid media. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica,** v. 63, p. 299-305, 1965.

HARBARTH, S.; RUTSCHMANN, O.; SUDRE, P.; PITTET, D. Impact of methicillin resistance on the outcome of patients with bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. **Archive of International Journal of Medical Science**, v.158, p.182-189, 1998.

HARTMAN, M.; FACCIOLI, P.Y; MATOS, A.V.R.; LANGONI, H. Perfil microbiológico na mastite bovina durante a lactação. In: IV Encontro de Pesquisadores de Mastite, 2007, Botucatu, **Anais**...Botucatu, p.101, 2007.

HATA, E,; KATSUDA, K.; NISHIMORI, K.; UCHIDA, I; HIGASHIDE, M; ISHIKAWA, E; SASAKI, T.; EGUCHI, M. Bacteriological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from humans and bulk milk. **Journal of Dairy Science,** v.91, p.564-569, 2008.

HARVEY, J.; GILMOUR, A. Isolation and Characterization of staphylococci from ewe and goat milk produced in Northern Ireland. **Letters in Applied Microbiology,** v.7, p.79-82, 1988.

HOLLIS, R.J.; BARR, J.L.; DOEBBELING, B.N.; PFALLER, M.A.; WENZEL, R.P. Familial carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and subsequente infection in a premature neonate. **Clinical. Infectious. Disease**, v.21, p.328-332, 1995.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção pecuária municipal.** Brasília: IBGE, v.34, p.1-62, 2006.

JARDIM, W.R. **Criação de caprinos**. São Paulo: Nobel, 1984, 239p.

JEVONS, M.P. "Celbenin" resistant staphylococci. **British Medical Journal,** v.1, p.124-125, 1961.

JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, E.P.; ASHTON, F.E.; POLLARD, D.R.; ROZEE, K.R. Detection of genes of enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in the *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.426-430, 1991.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, E.; JÁNOSI, S.; SOMOGYI, P.; DÁN, A.; BLOOIS, L.G.; DUIJKEREN, E.; WAGENAAR, J.A. MRSA transmission between cows and humans. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.630-632, 2007.

JUNQUEIRA, A.L.N. Prevalência de estafilococos resistentes a meticilina em profissionais de saúde de uma Unidade de Terapia Intensiva de Goiânia – Goiás. **Revista Eletrônica de Enfermagem (on-line)**, v.4, p.63, 2002. Disponível em <http://www.revistas.ufg.br/index.php/fen>, Acesso em 09 jul 2011.

KARAHAN, M.; AÇIK, M.N.; ÇETINKAYA, B. Investigation of toxin genes by polymerase chain reaction in *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Turkey. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, 1029-1035, 2009.

KIRBY, W.M.M. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. **Science**, v.99, p.452-453, 1944.

KITAI, S.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; SATO, E.; NAKANO, C.; UJI, T.; KITAGAWA, H. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.67, p.107-110, 2005.

KLEVENS R.M.; MORRISON, M.A.; NADLE, J; PETIT, S; GERSHMAN, K; RAY, S; HARRISON, L.H.; LYNFIELD, R; DUMYATI, G; TOWNES, J.M.; CRAIG, A.S.; ZELL, E.R.; FOSHEIM, G.E.; MCDOUGAL, L.K.; CAREY, R.B.; FRIDKIN, S.K. Invasive methicillin-resitant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **Journal of the American Medical Association**, v.298, p.1763-1771, 2007.

LACOUNTY - Departamento de Saúde Pública de Los Angeles. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection from breast milk, two case reports. **Acute Communicable Disease Control**, p.35-38, 2004. Disponível em: <http://www.lapublichealth.org/acd/reports/spclrpts/2004/Mrsa2_SS04.pdf>. Acesso em: 9 jul 2011.

LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D.A.; PENNA, C.F.M.A.; SOUZA, M.R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veteterinária e Zootecnia,** v.57, p.702-709, 2005.

LANGONI, H. Complexidade Etiológica da Mastite Bovina. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITE, 3, 1999, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 1999. p.3-18.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.13, p.51-54, 2006.

LAGUNA, L.E. **O leite de cabra como alimento funcional.** Disponível em: <http://www.capritec.com.br/artigos_embrapa030609a.htm>. Acesso em 01 dez 2010.

LAWRENCE, R.A.; LAWRENCE, R.M. **La lactancia materna:** una guia para la professión médica. 6. ed. Madrid: Mosby, 2007. 1184p.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v.2, p.63-76, 2003.

LEE, J.A. Methicillin (oxacillin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied Environmental Microbiology,** v.69, p.6489-6494, 2003.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p. 38-43, 2003.

LINA, G.; BOHACH, G.A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K.; JOUVIN-MARCHE, E.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **Journal Infection Disease**. v.189, p.2334–2336, 2004.

LO, C.W.; KLEINMAN, R.E. Infant formula, past and future: opportunities for improvement. **American Journal Clinical Nutric**, v.63, p.646-650,1996.

LORENZONI, R. P. **O Leite de Cabra na Alimentação e sua situação atual no Rio Grande do Sul**. 2005. 38f. Monografia (Especialização em Tecnologia e Controle de Qualidade em Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2005.

LUCAS, A.; GIBBS, J. A.; LYSTER, R. L. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk**.** **British Medical Journal,** v.22, p.1018-1020, 1978.

LUCAS, A.; ROBERTS, C.D. Bacteriological quality control in human milk-banking. **British Medical Journal**, v.1, p. 80-82, 1979.

LUZEAU, R.; BARROIS, V.; ODIEVRE, M. Acides gras non estérifiés et acidité titrable du lait maternel. **Archives Francaises de Pediatrie,** v.40, p. 449-451, 1983.

LUZ, I.S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da Região do Agreste de Pernambuco**. 2008, 125f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

MALM, H.; MARTIKAINEN, J.; KLAUKKA, T.; NEUVONEN, P.J. Prescription drugs during pregnancy and lactation – a Finnish register-based study. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.59, p.127-133, 2003.

MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases.** 6.ed. Elsevier Churchill Livingstone: EUA, 2005. v.2, 3661p.

MARIANO, F.A.; FOLLY, M.M.; TEIXEIRA, G.N.; CARMO, L.S.; MOTA, O.V. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de leite de cabras do estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária,** v.14, p.105-110, 2007.

MÁRMORE, C.; RAIA, R.; SANTOS, F.G.; PERES, A.A.; CARVALHO, C.A.B.; MOTA, R.; COSTA, E.O. Influência da mastite nas características do queijo minas frescal. **Revista Napgama**, v.9, p.17-21, 2006.

MARTINS, F.J. **Como e porque amamentar**. São Paulo: Sarvier, 1984, 220p.

MARTINS, A.; CUNHA, M.L.R.S. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* e coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. **Microbiology and Immunology**, v.51, p.787-795, 2007.

MASON, W.J.; BLEVINS, J.S.; BEENKEN, K.; WIBOWO, N.; OJHA, N.; SMELTZER, M.S. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.3332-3338, 2001.

MCLAUCHLIN, J.; NARAYANAN, G.L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.63, p. 479-488, 2000.

MEDEIROS, N. G. A.; CARVALHO, M. G. X.; LEITE, E. O; PEREIRA, J. M.; PONTES, M. P. S. Detecção de antibióticos no leite "in natura" consumido no município de Patos-PB. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 4, 1999, Recife. **Anais...** Recife: SPEMVE, 1999. p.225-226.

MELLO, F.A.; PINTO, A.T.; ZANELA, M.B.; SCHMIDT, V. Estabilidade térmica e ao álcool do leite de cabras saanen e alpina, **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, p. 165-169, 2010.

MENDES, C.G.; SAKAMOTO, S.M.; SILVA, J.B.A.; LEITE, A.I. Pesquisa de resíduos de beta-lactâmicos no leite cru comercializado clandestinamente no município de Mossoró, RN, utilizando o Delvotest SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, p.95-98, 2008.

MITCHELL, J.M.; GRIFFITHS, M.W.; MCEWEN, S.A.; MCNAB, W.B.; YEE, A.J. Antimicrobial drug residues in milk and meat: Causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance: A review. **Journal of Food Protection**, v.61, p.742-756, 1998.

MOON, J.S.; LEE, A.R.; KANG, H.M.; LEE, E.S.; KIM, M.N.; PALK, Y.H.; PARK, Y.H.; JOO, Y.S.; KOO, H.C. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1176-1185, 2007.

MOREL, A.S.; WU, F.; DELLA-LATTA, P.; CRONQUIST, A.; RUBENSTEIN, D.; SAIMAN, L. Nosocomial transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a mother to her preterm quadruplet infants. **American Journal Infection Control**, v.30, p.170-173, 2002.

MORGAN, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? **Journal Antimicrobial Chemotherapy,** v.62, 1181-1187, 2008.

MORGANO, M.A.; SOUZA, L.A.; NETO, J.M.; RONDÓ, P.H.C. Composição mineral do leite materno de bancos de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p. 819-824, 2005.

MORONI, P.; PIONI, G.; ANTONINI, M.; RUFO, G.; VARISCO, G.; BOETTCHER P. Subclinical mastitis and antimicrobial suscetibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p.1694-1704, 2005.

MOTA, R.A.; CASTRO, F.J.C.; SILVA, L.B.G.; OLIVEIRA, A.A.F. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **A Hora Veterinária**, v.19, p.26-29, 2000.

MUNSON, S.H.; TERMAINE, M.T.; BETLEY, M.J. WELCH, R.A. Identification and Characterization of Staphylococcal Enterotoxin Types G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v.66, p.3337-3348, 1998.

MURAKAMI, K.; MINAMIDE, K.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.2240-2244, 1991.

MURICY, R.F. **Ocorrência de mastite subclínica em caprinos e qualidade higiênico-sanitária do leite produzido em propriedades associadas à Coopertativa Languiru, Teutônia, RS**. 2003, 84f. Dissertação (Mestrado) –

Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L. A. ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isolados na mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.1316-1318, 2007a.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, p.1-4, 2007b.

NARDELLI, M.J.; NOGUEIRA, F.R.B.; SIQUEIRA, CARVALHO, M.G.X. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos no leite de cabras produzido no município de Prata, PB. In: Congresso Nacional de Laticínios, 23, 2006, Juiz de Fora, **Anais...**Juiz de Fora,2006, p.204-206.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, v.14, p.119-129, 2001.

NETO, A.C.A.; PEREIRA, M.M.G.; PEREIRA, T.G.; SANTOS M.C.M. Perfil microbiológico do leite materno do Banco da Maternidade Evangelina Rosa – Teresina (Piauí). **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos,** v.19, p.5-84, 2001.

NEVES, P.B.; MEDEIROS, E.S.; VALEZKA, V. et al. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.379-384, 2010.
NORMANNO, G.; CORRENTE, M.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N.C.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISETTI, E.; CELANO, G.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of

animal origin product in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.219-222, 2007.

NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.; WARNKEN, M.B.; FERREIRA-CARVALHO, B.T.; HAGLER, A.N. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in human milk. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, p.29-33, 2000.

NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.; ASENSI, M.D.; MORAES, B.A.;RODRIGUES, D.P. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. **Caderno de Saúde Pública**, v.17, p.713-717, 2001.

NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G. Teste alternativo para a detecção de coliformes em leite humano. **Jornal de Pediatria**, v.78, p.587-591, 2002.

NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.; SANTOS, M.J.S.; WANKE, B. Qual seria a fonte de fungos miceliais encontrados em leite humano ordenhado? **Caderno de Saúde Pública**, v.18, P.873-875, 2002.

NUNES, M. T.; D`ANGELINO, J. L. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite, em fazendas produtoras e no leite pronto para consumo. **Revista Higiene Alimentar,** v.21, p.57-61, 2007.

OLIVEIRA, M. M. A.; NUNES, I. F. Análise microbiológica e físico-química do leite pasteurizado tipo “C” comercializado em Terezina, PI. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, p. 92-94, 2003.

OLIVEIRA, A.M.; PADOVANI, C.R.; MIYA, N.T.N.; SANT’ANA, A.S.; PEREIRA, J.L. High incidence of enterotoxin D producing *Staphylococcus* spp. in Brazilian cow’s raw milk and its relation with coagulase and thermonuclease enzymes. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, p.159-163, 2011.

O’MAHONY, R.; ABBOTT, Y.; LEONARD, F.C.; MARKEY, B.K.; QUINN, P.J.; POLLOCK, P.J.; FANNING, S.; ROSSNEY, A.S. Methicillin-resistant

Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from animals and veterinary personnel in Ireland. **Veterinary Microbiology** 109, 285-296, 2005.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; SHIMODA,Y.; HU D.L.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of *seg, seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg, seh* or *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p. 857-862, 2002.

OMOE, K.; HU, D.L.; OMOE, H.T.; NAKANE A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, v.71, p.6088-6094, 2003.

OMOE, K.; IMANISHI, K.; HU, D.L.; KATO, H.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; UCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K. Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxin Type R**. Infection and Immunity**, v.72, p.3664-3667, 2004.

ONO, H.K.; OMOE, K.; IMANISHI, K.; IWAKABE, Y.; HU, D.L.; KATO, H., SAITO, N.; NAKANE, A.; UCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins, types S and T. **Infection and Immunity.** v.76, p.4999-5005, 2008.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Amamentação.** 2003. Disponível em: <http//www.opas.org.br/sistema/fotos/amamentar.pdf>. Acesso em 5 maio 2011.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D.Y.M.; DONAHUE, H.L.; NOVICK, R.P.; SCHLIEVERT, P.M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v.69, p.360-366, 2001.

ORWIN, P.M; FITZGERALD, J.R.; LEUNG, D.Y.M.; GUTIERREZ, J.A.; BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M. Characterization of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin L. **Infection and Immunity**, v.71, p.2916-2919, 2003.

OSTREA, E.M. JR.; MANTARING, J.B.; SILVESTRE, M.A. Drug that affect the fetus and newborn infant via the placenta or breast milk. **Pediatric Clinics of North America**, v.51, p.539-579, 2004.

PANDYA, A.J.; GHODKE, K.M. Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. **Small Ruminant Research**, v.68, p. 193-206, 2007.

PEIXOTO, R.M.; FRANÇA, C.A.; JÚNIOR, A.F.S.; VESCHI J.L.A.; COSTA, M.M. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v.30, p.735-740, 2010.

PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J.; SELLOS, I.T.; BERGDOLL, M.S. Staphylococci in breast milk from women with and without mastitis. **Revista de Microbiologia,** v.26, p.117-120, 1995.

PEREIRA, D.B.C.; SILVA, P.H.F.; COSTA JÚNIOR, L.C.G.; OLIVEIRA, L.L. **Físico-química do leite e derivados:** métodos analíticos**.** 2. ed. Juiz de Fora : EPAMIG, 2001. p.234.

PINHEIRO, M.S. **Mastite puerperal e seus condicionantes na nutriz portadora de *Staphylococcus aureus.*** 2008. 144f. Tese (Doutorado). Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

POETA, P.; ANTUNES, T.; RODRIGUES, J. *Enterococos* spp. resistentes à vancomicina isolados de fezes de frangos, pombos, gamos e ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, p.412-414, 2005.

POIATTI, M.L.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; RAGAZANI, A.V.F.; HATAYDE, M.C.; GARCIA, G.R. Detection of enterotoxigenic Staphylococcus isolatd from the goat milk sold at São Paulo State. **ARS Veterinária**. v.21, p.164-167, 2005.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648p.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, E.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. São Paulo: Artmed, 2005. 512 p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary medicine. A textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats.** 10.ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. 2156p.

RALL, V.L.M.; SFORCIN, J.M.; AUGUSTINI, V.C.M.; WATANABE, M.T.; FERNANDES JR, A.; RALL, R.; SILVA, M.G.; ARAÚJO JR., J.P. Detection of enterotoxin genes og *Staphylococcus* sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. **Brazilian Journal of Microbiology,** v.41, p.59-65, 2010.

RAPINI, L.S.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S.; VERAS, J.F.; SOUZA, M.R. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.57, p.825-829, 2005.

REDDY, P.; QI, C.; ZEMBOWER, T.; NOSKIN, G.A.; BOLON, M. Pospartum mastitis and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.298-301, 2007.

RIBEIRO, M.G.; LARA, G.H.B.; BICUDO, S.D.; SOUZA, A.V.G.; SALERNO, T.; SIQUEIRA, A.K.; GERALDO, J.S. An usual gangrenous goat mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli* co-infection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.810-812, 2007.

RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: ANDRADE, S.F. (Ed). **Manual de terapêutica Veterinária**. 3.ed. Roca: São Paulo, p.759-771, 2008.

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

RNBLH - Rede Nacional de Bancos de Leite Humano. **Normas técnicas para Banco de Leite Humano - BLH-IFF NT-29.05: Determinação da acidez titulável. Método dornic. Rio de janeiro: Fiocruz,** 2006. Disponível em <http://www.bvsam.cict.fiocruz.br/normastecnicas/normastecnicasblh.htm>. Acesso em: 1 dezembro 2010.

RODRIGUES, R.; FONSECA, L.M.; SOUZA, M. R. Acidez do leite. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG**, n.13, p.63-72, 1995.

ROSEC, J. P. GUIRAUD, J.P.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **International Journal of Food Microbiology**, v.35, p.213-221, 1997.

ROSEC, J.P.; GUIRAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v.77, p.61-70, 2002.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A.O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxinas do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.321-326, 2004.

SALES, A.N.; VIEIRA, G.O.; MOURA, M.S.Q.; ALMEIDA, S.P.T.M.A.; VIEIRA, T.O. Mastite puerperal: estudo de fatores predisponentes. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.22, p.627-632, 2000.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; MORAES, L.B.; TAMANINI, R.; SILVA, W.P. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. **Semina: Ciências Agrárias,** v. 27, p. 639-646, 2006.

SANTANA, E.H.W.; CUNHA, M.L.R.S.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; MORAES, L.B.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; BELOTI, V. Assessment of the risk of raw milk consumption related to staphylococcal food poisoning. **Ciência Animal Brasileira,** v.11, p.643-652, 2010.

SANTOS, M.G.O. **Monitoramento do Leite de cabras processado em mini usinas do Cariri paraibano através do sistema de análise de perigo e pontos críticos de controle – APPCC.** 2005. 80f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2005.

SCHALM, O. W.; CARROL, E.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. 360p.

SCHERRER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J.E.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Veterinary Microbiology,** v.101, p.101–107, 2004.

SCHIRM, E.; SCHWAGERMANN, M.P.; TOBI, H.; JONG-VAN DEN BERG, L.T. Drug use during breast-feeding. A survey from the Netherlands. **European Journal of Clinical Nutrition,** v.58, p.386-390, 2004.

SCHMIDT, V.; PINTO, A.T.; SCHNEIDER, R.N.; SILVA, S.S.P.; MELLO, F.A. Caracterização da mastite subclínica em caprinos produzidos em sistema

orgânico no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 774-778, 2009.

SERAFINI, A.B.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; RODRIGUES, M.A.V. KIPNIS, A.; CARVALHO, C.O.; CAMPOS, M.R.H.; MONTEIRO, E.C.; MARTINS, F.; JUBÉ, T.F.N. Qualidade microbiológica do leite humano obtido em banco de leite. **Revista de Saúde Pública,** v.37, p.775-779, 2003.

SCHANLER, R.J. **Conveniência do leite humano para neonato de baixo-peso**. Clínicas de Perinatologia: Interlivros, v.1, 1995. p.200-220.

SHINGAKI, M.H.; IGARASHI, H.; FUJIKAWA, H.; USHIODA, H.; TERAYAMA, T.; SAKAI, S. Study on reverved passive látex agglutination for the detection of staphylococcal enterotoxins A-C. **Annual Report of Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health**, v.32, p.128-131, 1981.

SHORT, R. **Amamentação, fertilidade e crescimento populacional.** São Paulo: UNICEF/IBFAN, 1997, 17p.

SIEGEL, J.D.; RHINEHART, E.; JACKSON, M.; CHIARELLO, L. **Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings**, 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroGuideline2006.pdf>. Acesso em 18 jul 2011.

SILVA, A.A.M. **Amamentação: Fardo ou Desejo? Estudo Histórico-Social dos saberes práticos sobre aleitamento na sociedade brasileira**. 1990. f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto,1990.

SILVA, E.R.; SIQUEIRA, A.P.; MARTINS, J.C.D.; Ferreira W.P.B.; Silva N. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. **Small Ruminant Research**, v.55, p.45-49, 2004.

SILVA, E.R.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology,** v.106, p.103-107, 2005.

SILVA, M.C.D.; SILVA, J.V.L.; RAMOS, A.C.S.; MELO, R.O.; OLIVEIRA, J.O. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas**. Ciência e Técnologia dos Alimentos Campinas**, v.28, p.226-230, 2008.

SOHN, A. H.; GARRETT, D. O.; SINKOWITZ-COCHRAN, R.L.; GROHSKOPF, L.A.; LEVINE. G.L.; STOVER, B.H., SIEGEL, J.D.; JARVIS, W.R. Prevalence of nosocomial infections in neonatal intensive care unit patients: results from the first national point-prevalence survey. **Journal of Pediatrics**. v.139, p.821–827, 2001.

SOUZA, E.; BARRETO, S. Doenças transmitidas por alimentos: *Staphylococcus aureus*. **Boletim de divulgação Técnica e Científica**, n.7, p.6-7, 2000. Disponível em: <http://www.ccs.saude.gov.br/visa/publicacoes/arquivos/bol7.pdf>, Acesso em 20 mai 2011.

SOUZA, M.R.; SANTOS, L.M.; RIBEIRO, R.J. Resistência dos microrganismos causadores de mastite no gado leiteiro da região de Garça S.P frente a seis antimicrobianos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.11, 2008.

STAMFORD, T.L.M; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxignicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos,** v.26, p.41-45, 2006.

STASTKOVA, Z.; KARPISKOVA, S.; KARPISKOVA, R. Occurrence of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* at a goat breeding farm. **Veterinarni Medicina**, v.54, p.419-426, 2009.

SWENSON, J.M.; TENOVER, F.C. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.3818-3823, 2005.

SURIYASATHAPORN, W. Milk Quality and Antimicrobial Resistance against Mastitis Pathogens after Changing from a Conventional to an Experimentally Organic Dairy Farm. **Asian-Australian journal of animal science**, v.23, p.659-664, 2010.

SUS – Sistema Único de Saúde. **Protocolo de prevenção da infecção neonatal pelo estreptococo do grupo B**. Disponível em <http://ww2.prefeitura.sp.gov.br//arquivos/secretarias/saude/mulherProt_estreptococo_B. pdf>, Acesso em 15 jul 2011.

THOMAS, D.Y.; JARRAUD, S.; LEMERCIER, B.; COZON, G.; ECHASSERIEAU, K; ETIENNE, J.; GOUGEON, M.L.; GERARD, L.; VANDENESCH, F. Staphylococcal enterotoxin-like toxin U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster, **Infection and Immunity**, v.74, p. 4724-4734, 2006.

TOH, C.C.; HO, N.K. pH Titratable acidity & osmolality of human breast milk & some infant milk formulae. **Journal Singing Pediatrics Society,** v.20, p.88-92, 1978.

VAN LOO, I.; HUIJSDENS, X.; TIEMERSMA, E.; DE NEELING, A.; VAN DE SANDE-BRUINSMA, N.; BEAUJEAN, D.; VOSS, A.; KLUYTMANS, J. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p.1834-1839, 2007.

VINAGRE, R.D.; DINIZ, E.M.A. VAZ. F.A.C. **Leite humano: um pouco de sua história**. 2001. Disponível em: <http://www.pediatriasaopaulo.usp.br/upload/html/543/body/08.htm>, Acesso em 30 jul 2011.

VIRDIS, S.; SCARANO, C.; COSSU, F.; SPANU, V.; SPANU, C.; DE SANTIS, EP. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from goats with subclinical mastitis. **Veterinary Medicine International**. v.2010, p.01-06, 2010.

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

TVENTEN, Y.; KRISTIANSEN, B.E.; ASK, E. DNA fingerprinting of isolates of *Staphylococcus aureus* from newborns and their contacts. **Journal of Clinical Microbiology,** v.29, p.1100-1105, 1991.

VALLE, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S.; GOYACHE, J.; ORDEN, J.A.; VADILLO, S. Enterotoxin production by *Staphylococci* isolated from healthy goat's. **Applied Environmental Microbiology,** v.56, p.1323-1326, 1990.

VEISSEYRE, R. **Lactología Técnica:** Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche**.** Acribia: Zaragoza, 1988. 629p.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOS, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology,** v.30, p.271-280, 1996.

VERONESI, R.F. **Tratado de infectologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 2167p.

VIEIRA, A.A.; MOREIRA, M.E.L.; ROCHA, A.D.; PIMENTA, H.P.; LUCENA, S.L. Análise do conteúdo energético do leite humano administrado a recém-nascidos de muito baixo peso ao nascimento**. Jornal de Pediatria**, v.80, p. 490-494, 2004**.**

VEIGA, J.B.; FREITAS, C.M.K.H.; POCCARD-CHAPUIS, R. Criação do gado de leite na zona bragantina: Cadeia Produtiva do Leite. Embrapa, Sistema de

Produções, 2005. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/GadoLeiteiroZonaBragantina/paginas/qualidade.htm>, Acesso em 04 jul 2011.

VOSS, A.; LOEFFEN, F.; BAKKER, J.; KLAASSEN, C.; WULF, M. Methicillinresistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. **Emerging Infectious Disease,** v.11, p.1965-1966, 2005.

WASIKSIRI, S. Quality aspects of raw goat milk in lower southern Thailand. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.32, p.109-113, 2010.

WEESE, J.S.; DICK, H.; WILLEY, B.M.; McGEER, A.; KREISWIRTH, B.N.; INNIS, B.; LOW, D.E. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the house hold. **Veterinary Microbiology,** v.115, p.148-155, 2006.

WEFFORT, V.R.S.; LAMOUNIER, J.A.; LEÃO, E.; STARLING, A.L.; NORTON, R.C.; FIGUEIREDO FILHO, P.P.; DIAMANTE, R.; INABA, M.K.; PARIZZI, M.R. **Alimentação da criança nos dois primeiros anos de vida.** Sociedade Mineira de Pediatria. Disponível em <htpp//:www.smp.org.br>. 2005, Acesso em 24 mai 2011.

WELSH, J. K.; MAY, J. T. Anti-infective properties of breast milk. **The Journal of Pediatrics**, v,94, p.1-9, 1979.

WHITE, E.C.; HINCLEY, L.S. Prevalence of pathogens in a goat milk. **Small Ruminant Research**, v.33, p.117-121, 1999.

WHO - World Health Organization. **Mastitis causes and management**. Genebra: WHO, 2000. (WHO/FHC/CAH/00.13).

WILHELM, M.P.; ESTES, L. Vancomicin. **Mayo Clinic Proceedings**, v.74, p.928-935, 1999.

WINN JR., W. C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. **Koneman Diagnóstico Microbiológico**. texto e atlas colorido. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565p.

ZHANG, Y.; WANG, X.; LEJEUNE, J.T.; ZERVOS, M.; BHARGAVA, K. Comparison of phenotypic methods in predicting methicillin resistance in coagulase-negative *Staphylococcus* (CoNS) from animals. **Research in Veterinary Science**, v.90, p.23-25, 2011.

ZOCCAL, R. **Produção, Industrialização e Comercialização**. Juiz de Fora: EMBRAPA/CNPGL, 2011. Disponível em: (www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao). Acesso em 1 ago 2011.

9. TRABALHO CIENTÍFICO

9.1 Normas da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo Científico. É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão e Conclusões. O número total de páginas não deve exceder a 15.

Relato de Caso. Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Seções do texto: Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes). O número total de páginas não deve exceder a 10.

Comunicação. É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico. Levantamentos de dados (ocorrência, diagnósticos, etc.) também se enquadram aqui. Deve ser compacto, com no máximo seis páginas impressas, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo Científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

Política editorial

Publicar trabalhos científicos originais (artigos, relatos de casos e comunicações) que sejam de interesse para o desenvolvimento da ciência animal. Serão recomendados para publicação somente os trabalhos aprovados pelos editores, baseados na recomendação de dois revisores científicos da área pertinente e/ou do corpo editorial.

Preparação dos manuscritos para publicação

Os trabalhos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o Webster's Third New International Dictionary. Para ortografia em português adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras. Os trabalhos submetidos em inglês deverão conter resumo em português e vice-versa.

Os trabalhos e ilustrações deverão ser apresentados em Microsoft Word, folha no formato A4, fonte Times New Roman tamanho 12, espaço entre linhas 1,5, margens de 3cm, com páginas e linhas numeradas (numeração contínua).

Seções de um trabalho

Título. Em português e em inglês. Deve ser o resumo do resumo e não ultrapassar 100 dígitos.

Autores. Os nomes dos autores virão abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. Deve estar indicado o autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e e-mail.

Resumo e Abstract devem conter no máximo 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase é uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

Introdução. Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência, relevância e os objetivos do trabalho.

Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos.
Nos trabalhos que envolvam animais ou organismos geneticamente modificados deverá constar o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança.

Resultados. Apresentar clara e objetivamente os principais resultados encontrados.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho.
Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto.

Conclusões. As conclusões devem estar apoiadas nos dados da pesquisa executada.

Ilustrações. São tabelas e figuras. Toda ilustração que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, dados sobre a fonte (autor, data) e a correspondente referência deve figurar na lista bibliográfica final.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação do cabeçalho e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas.

Figura. Qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. As legendas recebem

inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As figuras devem ser enviadas em arquivo separado, extensão.jpg.

Agradecimentos. Devem ser concisamente expressados.

Referências bibliográficas. As referências devem relacionadas em ordem alfabética.

Citações bibliográficas

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

autoria única: **(Silva, 1971)** ou **Silva (1971)**; **(Anuário..., 1987/88)** ou **Anuário... (1987/88)**

dois autores: **(Lopes e Moreno, 1974)** ou **Lopes e Moreno (1974)**

mais de dois autores: **(Ferguson et al., 1979)** ou **Ferguson et al. (1979)**

mais de um trabalho citado: **Dunne (1967)**; **Silva (1971)**; **Ferguson et al. (1979)** ou **(Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979)**, sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para trabalhos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Na listagem de referência, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte da lista de referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

Referências bibliográficas

São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, simplificadas conforme exemplos:

Periódicos

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. Am. J. Vet. Res., v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. Not. Med. Vet., n.1, p.13-20, 1984.

Publicação avulsa

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. Anais... São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C. F. A. Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Documentos eletrônicos

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <http://www.org/critca16.htm>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more cambative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-Related Articles/>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Submissão dos trabalhos

A submissão dos trabalhos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico
www.abmvz.org.br

Taxas de publicação

Taxa de submissão. O pagamento, no valor de R$30,00, será feito por meio de boleto bancário (emitido quando da submissão do artigo). O autor deverá informar os dados para emissão da nota fiscal (Nome ou Razão Social, CPF ou CNPJ, Endereço).

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R$55,00, por página impressa, será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. Se houver necessidade de impressão em cores, as despesas correrão por conta dos autores.

9.2 Comprovante de submissão de artigo

9.3 Artigo

Multirresistência bacteriana, detecção de resíduos de antimicrobianos e acidez em leite de cabras com e sem mastite

Bacterial multidrug resistance, antimicrobials residues and acidity detection in milk from goats with and without mastitis

Salerno, T., *Ribeiro*, M.G., *Siqueira*, A.K.; *Condas*, L.A.Z., *Basso*, K.; *Listoni*, F.J.P.; *Pinto*, J.P.A.N.

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Distrito de Rubião Júnior s/n, Cep: 18.608-970, Botucatu, SP.

Email: tativet@ig.com.br

ABSTRACT

Etiology, multidrug resistance, antimicrobials residues detection and acidity values were evaluated in milk samples from goats with and without mastitis. Staphylococcus *spp. (mainly* S. aureus*,* S. epidermidis*,* and S. lugdunensis), *followed by* Bacillus spp.*,* Streptococcus *spp.,* Micrococcus *spp.,* Pseudomonas aeruginosa*,* Escherichia coli*, and* Mannheimia haemolytica*, were the most common microorganisms isolated from animals with and without mastitis. Cephaloporins and amoxicillin/clavulanic acid were the most effective antimicrobials against isolates. In contrast, more than 80% of isolates showed multidrug resistance to three or more drugs. Antimicrobial residues were identified in 21.0% and 11.5% in goats with and without mastitis, respectively. The acidity goat milk measured in dornic degrees presents great variation (5-32 ^{o}D).*

Keywords: *antimicrobials residues, bacterial resistance, goat, mastitis, milk acidity*

INTRODUÇÃO

O leite apresenta grande valor econômico e inestimável papel na dieta humana devido ao elevado teor protéico, mineral, vitamínico, além de carboidratos e gorduras essenciais para o desenvolvimento e manutenção da saúde (Fonseca e Santos, 2000). No

entanto, cerca de 3 a 8% das crianças em todo o mundo apresentam sensibilidade alérgica às proteínas do leite de vaca (Laguna, 2010).

O leite de cabra pode ser indicado como alimento alternativo tanto para crianças como idosos que apresentam hipersensibilidade ao leite bovino, em virtude de seu elevado valor nutricional, fácil digestibilidade e, especialmente, por ser reconhecido como alimento hipoalergênico (Laguna, 2010; Costa, 2011).

Para que o leite de cabra cumpra seu papel nutricional de forma segura é necessário que apresente baixa celularidade, ausência de patógenos e/ou substâncias químicas - como resíduos de antimicrobianos e pesticidas - garantindo a inocuidade e a qualidade deste alimento (Brasil, 2000).

A presença de micro-organismos no leite causada por infecções da glândula mamária de animais é uma das principais causas que exerce influencia prejudicial na composição e características físico-químicas do produto (Brasil, 2000/02), além de gerar agravos à saúde do consumidor devido aos riscos de veiculação de patógenos multirresistentes e com potencial toxigênico (Mariano et al., 2007; Garino Jr.et al., 2011).

A presença de índices de acidez abaixo do mínimo permitido pela legislação, geralmente está relacionado a presença de micro-organismos no leite, devido a processos infecciosos da glândula mamária, responsáveis pela redução das porcentagens de gordura, lactose e caseína e aumento de cloretos e soroproteínas, acarretando em diminuição da acidez (Rodrigues et al., 1995; Fonseca e Santos, 2007).

O presente estudo investigou o perfil microbiológico, a resistência antimicrobiana, a acidez e a presença de resíduos/substâncias inibidoras da multiplicação de micro-organismos no leite de cabras, com e sem mastite.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita das amostras de leite

Foram colhidas 200 amostras de leite de cabras com mastite (clínica ou subclínica) e 200 de cabras negativas à prova de Tamis e CMT de seis criatórios leiteiros de pequeno e médio porte, com sistema de ordenha mecânica ou manual, situados no interior paulista.

Após a antissepsia dos tetos com solução de álcool 70%, as amostras de leite foram colhidas e acondicionadas em tubos Falcon, com fundo cônico, esterilizados e transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável (4ºC). As amostras foram

congeladas a -20^{o}C até serem processadas no Laboratório de Diagnóstico Microbiológico da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, visando o cultivo microbiano, detecção de acidez (graus dornic) e resíduos de antimicrobianos no leite.

Diagnóstico de mastite nos animais

A mastite clínica foi diagnosticada com base nas alterações macroscópicas do leite observadas na prova da caneca de fundo escuro (Tamis) e na presença de sinais de inflamação na glândula mamária e/ou sistêmicos nos animais (Radostits et al., 2007). O diagnóstico da mastite subclínica foi realizado utilizando o método clássico do "California Mastitis Test" – CMT (Schalm et al., 1971). Para o isolamento microbiano foram utilizados tetos com escore 2+ e 3+. As amostras de leite de cabras negativas ao teste de Tamis e CMT foram colhidas aleatoriamente nas propriedades.

Análise de acidez em graus dornic (^{o}D)

A acidez titulável expressa em graus Dornic (Dº) foi determinada conforme determinado pela Instrução Normativa 22 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (Brasil, 2003).

Isolamento e caracterização microbiana

Foi semeado 0,1 mL (volume fixo) de todas as amostras de leite, em meios de ágar sangue bovino (5%) desfibrinado e ágar MacConkey, mantidos em condições de aerobiose a 37ºC, por 72 horas, com leituras diárias. Simultaneamente, as amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose e mantidas por sete dias em aerobiose, a 37ºC. Os micro-organismos isolados foram identificados segundo características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo (Quinn et al., 1994, 2005; Winn Jr. et al., 2008).

As colônias isoladas em ágar MacConkey, fermentadoras ou não de lactose, foram submetidas a provas bioquímicas para identificação de enterobactérias utilizando meios de cultura sólidos e semi sólidos distribuídos em tubos, visando determinar a fermentação da glicose, a produção de gás, L-TD (L-triptofano-desaminase), H_2S, urease, citrato de Simmons, lisina, motilidade e indol (Quinn et al., 2005; Winn Jr. et al., 2008). Colônias bacterianas sugestivas de *Staphylococcus* spp. foram coradas pelo método de Gram e as linhagens que apresentaram cocos agrupados, Gram-positivos foram submetidas às provas bioquímicas ou de utilização de diferentes substratos

(Quinn et al., 2005; Winn Jr. et al., 2008), com vistas a identificar linhagens de estafilococos coagulase positivos ou negativos.

Perfil de sensibilidade microbiana e detecção de linhagens multirresistentes

Todos os micro-organismos isolados foram submetidos à prova de sensibilidade microbiana pelo método de difusão com discos (CLSI, 2006). Foram utilizados princípios ativos de diferentes antimicrobianos, a saber: amoxacilina/ácido clavulânico (10/20 μg), ampicilina (10 μg), cefalexina (30 μg), cefoperazona sódica (75 μg), cefoxitina (30 μg), ceftiofur (30 μg), enrofloxacina (5 μg), eritromicina (15 μg), gentamicina (10 μg), neomicina (30 μg), oxacilina (5 μg), penicilina (10 UI), sulfametrim (25 μg) e vancomicina (30 μg). A ocorrência de linhagens multirresistentes foi considerada quando houve resistência múltipla simultânea a três ou mais antimicrobianos testados (Garino Jr. et al., 2011).

Detecção de resíduos de antimicrobianos

A determinação de resíduos de antimicrobianos foi realizada utilizando o *kit* Delvotest^{TM3} de acordo com as normas do fabricante. Este teste microbiológico tem como objetivo detectar a presença de substâncias antibacterianas no leite pela inibição da multiplicação do *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, sensível aos principais grupamentos de antimicrobianos de uso veterinário.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 200 tetos avaliados de cabras com mastite, 05 (2,50%) apesentaram mastite clínica com presença de grumos no leite, enquanto em 195 (97,50%) foi diagnosticado mastite subclínica pelo CMT. Este resultado demonstra o predomínio da mastite subclínica em capris leiteiros, e a necessidade em realizar, periodicamente, testes diagnósticos de mastite como o CMT, com o intuito de identificar animais com mastite subclínica, em virtude de representarem fonte de infecção no rebanho e pelos prejuízos na produção das glândulas afetadas.

No processo de ordenha, a acidez natural do leite é decorrente dos componentes presentes no próprio produto, como a caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citrato (Pereira et al., 2001). Horas depois da ordenha, devido a ação da temperatura e

[3] Delvotest^{TM}: *DSM Food Specialties Dairy Ingredients – The Netherlands*.

perda dos inibidores naturais, o leite passa a apresentar aumento da acidez devido a acidificação da lactose, ou nos animais infectados pela multiplicação dos micro-organismos (Oliveira e Nunes, 2003).

A acidez titulada em graus Dornic (^{o}D) de leite fluído caprino aceitável pela legislação (IN-37) encontra-se entre 13-18 ^{o}D (0,13g a 0,18g de ácido lático/100 mL de leite). O leite com valores de acidez acima ou abaixo do estipulado pela legislação é considerado impróprio para o consumo e deve ser descartado (Brasil, 2000). No presente estudo, a acidez do leite de cabras apresentou grande variação entre 5 a 32 ^{o}D, das quais 49,00% e 53,50% das amostras com e sem mastite, respectivamente, apresentaram valores satisfatórios relativos a acidez ^{o}D (Tabela 01). Cunha (2007) e Mello et al. (2010) também encontraram grande variação da acidez em amostras de leite de cabras.

A elevada taxa de acidez encontrada no presente estudo, acima de 18^{o}D, pode ser devido a fatores nutricionais, fase da lactação ou demora no translado entre a propriedade e o laboratório para o processamento. Rodrigues et al. (1995) e Oliveira e Nunes (2003) referiram que as amostras de leite podem apresentar elevação da acidez mesmo que sejam armazenadas em caixas isotérmica e/ou refrigeradas a 4^{o}C, devido a presença de micro-organismos com potencial fermentativo.

Dentre as 200 amostras de leite de cabras com e sem mastite, 64 (32,00%) e 150 (75,00%) respectivamente, não apresentaram isolamento microbiano. Dentre as 136 e 50 linhagens isoladas de animais com e sem mastite, respectivamente, o gênero *Staphylococcus* foi observado com maior frequência, representando 85,29% dos patógenos recuperados de amostras com mastite e 80,00% isolado de animais sem mastite. Estes resultados evidenciam elevada ocorrência de animais reservatórios na criação, havendo a necessidade de adoção de melhores práticas de higiene, visto que estes micro-organismos não são diagnosticados nas provas de rotina (caneca telada e CMT), favorecendo a disseminação destes patógenos no rebanho (Costa et al., 2005).

Nos caprinos amostrados com mastite clínica ou subclínica o gênero *Staphylococcus* foi o micro-organismo mais prevalente, seguido de *Bacillus* spp. (5,88%), *Streptococcus* spp. (2,94%), *Micrococcus* spp. (1,47%), *Pseudomonas aeruginosa* (1,47%), *Escherichia coli* (1,47%), *Mannheimia haemolytica* (0,74%) e leveduras (0,74%). Nos animais sem mastite, *Bacillus* spp. (12,00%), *Actinomyces* spp. (2,00%), *Mannheimia haemolytica* (2,00%), *Micrococcus* spp. (2,00%) e *Nocardia* spp. (2,00%) foram as linhagens isoladas.

Dentre os micro-organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* isolados de cabras com mastite foram identificados 16 (11,76%) *S. aureus,* 42 (30,88%) *S. epidermidis,* 30 (22,06%) *S. lugdunensis,* 08 (5,88%) *S. simulans*, 04 (2,94%) *S. chromogenes*, 02 (1,47%) *S. auriculares*, 02 (1,47%) *S. capitis urealyticus*, 02 (1,47%) *S. xylosus*, 02 (1,47%) *S. warneri*, 01 (0,74%) *S. caprae* e 01 (0,74%) *S. hyicus*.

S. epidermidis (34,00%) e *S. lugdunensis* (30,00%) também foram as espécies de estafilococos mais frequentemente isoladas em leite de cabras sem mastite, seguidas de *S. pasteuri* (4,00%), *S. aureus* (2,00%), *S. auriculares* (2,00%), *S. capitis urealyticus* (2,00%), S. *saprophyticus* (2,00%), *S. simulans* (2,00%) e *S. warneri* (2,00%).

Estudos similares também verificaram elevada ocorrência de *Staphylococcus* spp. na mastite caprina (Mota et al., 2000; Muricy, 2003; Schmidt et al., 2009; Neves et al., 2010, Garino Jr. et al., 2011). Mariano et al. (2007) investigaram 184 isolados de *Staphylococcus* spp. e encontraram resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo, identificando também *S. aureus*, *S. lugdunensis*, *S. epidermidis, S. capitis*, *S. cohnii*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. caprae*, *S. haemolyticus* e *S. warneri*. Peixoto et al. (2010) ao avaliarem 878 amostras de leite de cabras verificaram maior ocorrência de *Staphylococus* spp. (29,9%), com predomínio de *S. aureus* (16,9%), seguido de *S. hyicus* (11,7%), *S. intermedius* (7,1%), *S. epidermidis* (6,5%), *S. caprae* (7,8%) e *S. simulans* (3,0%).

Staphylococcus spp. são micro-organismos comumente isolados em leite de cabras (Quinn et al., 2005; Radostits et al., 2007). O predomínio deste agente em infecções mamárias, incluindo nos animais amostrados no presente estudo, pode ser atribuído a presença desta bactéria na microbiota da pele, mucosas e conjuntivas dos animais, particularmente no úbere e tetos de fêmeas domésticas (Moroni et al., 2005). O habitat dos estafilococos na pele do úbere e tetos favorece a infecção das fêmeas caprinas por este grupo de micro-organismos contagiosos, cuja transmissão ocorre fundamentalmente no momento da ordenha, de forma manual ou mecânica (Radostits et al., 2007). A baixa ocorrência de enterobactérias (*E. coli*) e *Pseudomonas aeruginosa* nas cabras amostradas também tem sido observada em estudos similares que investigaram a etiologia da mastite em cabras (White e Hincley, 1999; Almeida, 2009), e reforça a menor participação dos micro-organismos ambientais na casuística da mastite caprina.

No presente estudo, os isolados de leite de cabras, com e sem mastite, apresentaram altas taxas de sensibilidade para cefalosporinas e amoxacilina

potencializada pelo ácido clavulânico. Este achado indica que estes grupamentos de antimicrobianos podem ser recomendados como de escolha no tratamento da mastite caprina (Radostits et al., 2007). Em contraste, recentemente tem se verificado crescente resistência bacteriana "in vitro" dos principais agentes causadores de mastite em cabras frente aos antimicrobianos convencionais (Langoni et al., 2006). As maiores taxas de resistência para micro-organismos recuperados de cabras com mastite foram observadas para eritromicina, neomicina e sulfametrim, enquanto patógenos isolados de animais sem mastite apresentaram elevada resistência para sulfametrim, enrofloxacina e eritromicina (Tabela 02).

Langoni et al. (2006) ao avaliarem micro-organismos isolados de leite de cabras com mastite subclínica observaram elevada sensibilidade para oxacilina e gentamicina, e altas taxas de resistência dos isolados frente a penicilina e ampicilina. Neves et al. (2010) e Garino Jr. et al. (2011) também verificaram elevada resistência de linhagens bacterianas isoladas do leite de caprinos para penicilina (66,67%) e ampicilina (63,89%). Estes resultados são semelhantes aos encontrados no presente estudo, onde 63,18% e 60,63% dos patógenos isolados de cabras com mastite apresentaram resistência frente à penicilina e ampicilina, respectivamente. Ademais, Garino Jr. et al. (2011) verificaram que 42,86% dos micro-organismos isolados de cabras com mastite subclínica apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos. No presente estudo, foram identificados acima de 80% dos isolados resistentes a três ou mais antimicrobianos.

Tabela 01. Resultado da acidez titulada em graus Dornic (^{o}D) de 200 amostras de leite cru de cabras com mastite e 200 amostras negativas para mastite provenientes de propriedades do interior de São Paulo. Botucatu, SP, 2011.

Acidez titulável (^{o}D)	Leite caprino com mastite Nº de amostras (%)	Leite caprino sem mastite Nº de amostras (%)
5,0	01 (0,50)	01 (0,50)
9,0	02 (1,00)	01 (0,50)
10,0	08 (4,00)	0 (0,00)
11,0	01 (0,50)	04 (2,00)
12,0	07 (3,50)	04 (2,00)
13,0	09 (4,50)	06 (3,00)
14,0	14 (7,00)	15 (7,50)
15,0	23 (11,50)	13 (6,50)
16,0	10 (5,00)	16 (8,00)
17,0	12 (6,00)	20 (10,00)
18,0	30 (15,00)	37 (18,50)
19,0	14 (7,00)	18 (9,00)
20,0	10 (5,00)	16 (8,00)
21,0	10 (5,00)	13 (6,50)
22,0	10 (5,00)	11 (5,50)
23,0	13 (6,50)	08 (4,00)
24,0	06 (3,00)	06 (3,00)
25,0	11 (5,50)	05 (2,50)
26,0	01 (0,50)	02 (1,00)
27,0	02 (1,00)	0 (0,00)
28,0	05 (2,50)	0 (0,00)
29,0	01 (0,50)	01 (0,50)
30,0	0 (0,00)	01 (0,50)
31,0	0 (0,00)	01 (0,50)
32,0	0 (0,00)	01 (0,50)
TOTAL	**200 (100,00)**	**200 (100,00)**

* ^{o}D: graus Dornic, Nº: número, %: porcentagem.

O uso de fármacos de forma indiscriminada em capris leiteiros pode contribuir para o aumento de linhagens multirresistentes. Adicionalmente, favorece a presença de

resíduos de antimicrobianos no leite de animais, que podem gerar agravos à saúde humana (Ribeiro, 2008).

Apesar do uso da vancomicina ser restrito ao tratamento de afecções em humanos, estudos em animais têm verificado a presença de micro-organismos resistentes a este fármaco, isolados de fezes de frangos e pombos (Poeta et al., 2005). No presente estudo, foram identificadas linhagens obtidas de cabras com e sem mastite, resistente a vancomicina. (Tabela 2). Este achado sinaliza a necessidade de estudos de perfil de sensibilidade de linhagens obtidas de animais, frente à vancomicina, visto que este fármaco é amplamente utilizado em medicina humana, particularmente no tratamento de afecções estafilocócicas (Winn Jr., 2008).

Das amostras de leite de cabras com e sem mastite, 42/200 (21,00%) e 23/200 (11,50%) respectivamente, apresentaram resíduos de antimicrobianos e/ou substâncias inibidoras. Santos (2005) ao avaliar 60 amostras de leite provenientes de seis miniusinas utilizando o método imunoenzimático para detecção de β-lactâmicos verificou que 19 (31,66%) amostras foram positivas ao teste. Nardelli et al. (2006) verificou 15,25% de positividade para presença de beta-lactâmicos em 118 amostras de leite caprino. Araújo (2008) ao avaliar 150 amostras de leite de cabras provenientes de duas miniusinas de dois municípios da Paraíba, utilizando o kit Delvotest^{TM}, verificou que uma apresentou detecção de resíduos em 21,1% das amostras, enquanto a segunda e, 24,0% das amostras de leite avaliadas.

A presença de resíduos de antimicrobianos ou substâncias inibidoras da multiplicação de micro-organismos nas cabras amostradas pode ser decorrente do uso incorreto de antimicrobianos, principalmente por via parenteral, utilizados no tratamento de outras afecções além da mastite, aliado a falta de informação dos produtores sobre período de descarte do leite pós-tratamento intramamário com antimicrobianos. A presença de resíduos de antimicrobianos alerta para a necessidade do uso racional de antimicrobianos no tratamento de afecções em caprinos, particularmente na mastite.

Tabela 02. Perfil de sensibilidade microbiana, em estirpes isoladas de 200 amostras de leite caprino cru com mastite e 200 amostras negativas para mastite, provenientes de propriedades rurais do interior de São Paulo. Botucatu, SP, 2011.

Antimicrobianos	Amostras com mastite			Amostras sem mastite		
	S	PS	R	S	PS	R
	nº linhagens/total isolado (%)			nº linhagens/total isolado (%)		
Amoxacilina / ácido clavulânico	122/127 (96,06)	1/127 (0,79)	4/127 (3,15)	42/44 (95,45)	0/44 (0,00)	2/44 (4,55)
Ampicilina	47/127 (37,01)	3/127 (2,36)	77/127 (60,63)	17/44 (38,64)	1/44 (2,27)	26/44 (59,09)
Cefalexina	120/127 (94,49)	0/127 (0,00)	7/127 (5,51)	43/44 (97,73)	0/44 (0,00)	1/44 (2,27)
Cefoperazona	86/127 (67,72)	34/127 (26,77)	7/127 (5,51)	34/44 (77,27)	8/44 (18,18)	2/44 (4,55)
Cefoxitina	115/127 (90,55)	1/127 (0,79)	11/127 (8,66)	38/44 (86,36)	0/44 (0,00)	6/44 (13,64)
Ceftiofur	101/127 (79,53)	12/127 (9,45)	14/127 (11,02)	39/44 (88,64)	2/44 (4,55)	3/44 (6,82)
Enrofloxacina	27/127 (21,26)	21/127 (16,54)	79/127 (62,20)	9/44 (20,45)	5/44 (11,36)	30/44 (68,18)
Eritromicina	16/127 (12,60)	19/127 (14,96)	92/127 (72,44)	7/44 (15,91)	7/44 (15,91)	30/44 (68,18)
Gentamicina	38/127 (29,92)	8/127 (6,30)	81/127 (63,78)	16/44 (36,36)	1/44 (2,27)	27/44 (61,36)
Neomicina	19/127 (14,96)	16/127 (12,60)	92/127 (72,44)	11/43 (25,00)	3/44 (9,09)	29/44 (65,91)
Oxacilina	98/127 (77,17)	3/127 (2,36)	26/127 (20,47)	32/44 (72,73)	0/44 (0,00)	12/44 (27,27)
Penicilina G	46/127 (36,22)	0/127 (0,00)	81/127 (63,78)	20/44 (45,45)	2/44 (4,55)	22/44 (50,00)
Sulfametrim	37/127 (29,13)	2/127 (1,57)	88/127 (69,29)	7/44 (15,91)	0/44 (0,00)	37/44 (84,09)
Vancomicina	120/127 (94,49)	0/127 (0,00)	7/127 (5,51)	42/44 (95,45)	0/44 (0,00)	2/44 (4,55)

* S: Sensível; PS: Parcialmente Sensível; R: Resistente, %: porcentagem

CONCLUSÃO

A ampla variação da acidez dornic mostra que a mesma é influenciada por diferentes fatores que podem levar ao aumento ou decréscimo dos índices de acidez titulável no leite, sendo que a presença de micro-organismos no leite é considerada uma das principais causas de alteração da acidez láctica.

A presença de elevada ocorrência de micro-organismos isolados de amostras de leite de cabras sem mastite salienta a importância de adoção de práticas higiênicas durante a ordenha devido a presença de animais portadores no rebanho, considerados importantes fontes de infecção na casuística de mastites.

O uso indiscriminado de antimicrobianos e a produção de novas drogas favoreceram o surgimento de micro-organismos multirresistentes. Dentre eles, o gênero *Staphylococcus* tem se destacado como patógeno responsável por diversas infecções, e considerado problema emergente em saúde pública. Desta forma, ressalta-se a importância da vigilância no uso indiscriminado destes fármacos em animais domésticos, sendo que a adoção de tratamento de animais com respaldo no cultivo de amostras, isolamento do microrganismo e realização de antibiograma, podem minimizar a pressão seletiva bacteriana frente aos principais grupamentos de antimicrobianos utilizados no combate às afecções no rebanho. Ademais, a detecção de resíduos de antimicrobianos em amostras de leite alerta para os riscos em saúde pública.

Contudo, a adoção de medidas preventivas reduz os riscos operacionais e a contaminação secundária proveniente do ambiente e de utensílios, proporcionando produto final seguro e saudável para o consumidor, especialmente crianças e idosos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.F. *Agentes infecciosos causadores de mastite e parâmetros físico-químicos na qualidade do leite de cabra in natura.* 2009. 106f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

ARAÚJO, V.J.A. *Qualidade do leite de cabra in natura processado em mini-usinas do médio sertão e cariri paraibano: estudo comparativo.* 2008. 62f. Monografia (Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande. Paraíba.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa n.37 de 31 de outubro de 2000.* Regulamento técnico de produção, identidade e

qualidade do leite de cabra. 2000. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/InstruçãoNormativa37>. Acesso em: 10 abr 2011.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa n.051 de 18 de setembro de 2002.* Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel. 2002. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/Instrução Normativa 51>. Acessado em: 28 mai. 2011.

BRASIL - Ministério da Agricultura. *Instrução Normativa n.22 de 14 de abril de 2003.* Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produto lácteos. Brasília, 2003. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/. Titulação em graus dornic. Leite>. Acessado em: 28 mai. 2011.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard*, 9.ed. Wayne: CLSI, 2006. (CLSI document M2-A9, v.26).

COSTA, A.L. *Leite caprino: um novo enfoque de pesquisa.* Disponível em: <http://www.fmvz.unesp.br/Informativos/ovinos/utilid09.htm>. Acessado em: 28 jul. 2011.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; GARINO JR, F. et al. Portador: um importante elo na epidemiologia de mastite infecciosa bovina, *Rev. Napgama*, v.8, p.3-5, 2005.

CUNHA, F.L. *Avaliação da qualidade microbiológica, fisico-química e contagem de células somáticas em leite de cabra produzido na região de Nova Friburgo-RJ. Metodologia tradicional versus metodologia eletrônica.* 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

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

GARINO JR., F.; CAMBOIM, E.K.A.; NEVES, P.B et al., Suscetibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no semi-árido paraibano. *Arq. Inst. Biol*. v.78, p.103-107, 2011.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Rev. Bras. Ciênc. Vet*., v.13, p.51-54, 2006.

LAGUNA, L.E. *O leite de cabra como alimento funcional*. Disponível em: <http://www.capritec.com.br/artigos_embrapa030609a.htm>. Acessado em: 01 ago. 2011.

MARIANO, F.A.; FOLLY, M.M.; TEIXEIRA, G.N. et al. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de leite de cabras do estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.* v.14, p.105-110, 2007.

MELLO, F.A.; PINTO, A.T.; ZANELA, M.B. et al. Estabilidade térmica e ao álcool do leite de cabras saanen e alpina, *Acta Sci. Vet*., v.38, p. 165-169, 2010.

MORONI, P.; PIONI, G.; ANTONINI, M. et al. Subclinical mastitis and antimicrobial suscetibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian goat herds. *J. Dairy Sci*. v.88, p.1694-1704, 2005.

MOTA, R.A.; CASTRO, F.J.C.; SILVA, L.B.G. et al. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. *Hora Vet*., v.19, p.26-29, 2000.

MURICY, R.F. Ocorrência de mastite subclínica em caprinos e qualidade higiênico-sanitária do leite produzido em propriedades associadas à Coopertativa Languiru, Teutônia, RS. 2003, 84f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NARDELLI, M.J.; NOGUEIRA, F.R.B.; SIQUEIRA, et al. Ocorrência de resíduos de antimicrobianos do grupo beta-lactâmicos no leite de cabras produzido no município de Prata, PB. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 23, 2006, Juiz de Fora, *Anais...* Juiz de Fora [s.n.], 2006. p.204-206 (Resumo).

NEVES, P.B.; MEDEIROS, E.S.; VALEZKA, V. et al. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras*. V. 30, p.379-384, 2010.

OLIVEIRA, M. M. A.; NUNES, I. F. Análise microbiológica e físico-química do leite pasteurizado tipo "C" comercializado em Terezina, PI. *Rev. Hig. Alim*., v. 17, p. 92-94, 2003.

POETA, P.; ANTUNES, T.; RODRIGUES, J. *Enterococos* spp. resistentes á vancomicina isolados de fezes de frangos, pombos, gamos e ratos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. v.58, p. 412-414, 2005.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. et al. *Clinical veterinary microbiology*. London: Wolfe, 1994. 648p.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E. et al. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.* São Paulo: Artmed, 2005. 512 p.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. et al. *Veterinary medicine. A textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* 10.ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. 2156p.

RIBEIRO, M.G. Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia. In: ANDRADE, S.F. (Eds). *Manual de Terapêutica Veterinária*. 3.ed. Roca: São Paulo, 2008. p.759-771.

RODRIGUES, R.; FONSECA, L.M.; SOUZA, M. R. Acidez do leite. Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG, n.13, p.63-72, 1995.

SANTOS, M.G.O. *Monitoramento do Leite de cabras processado em mini-usinas do Cariri paraibano através do sistema de análise de perigo e pontos críticos de controle.* 2005, 80f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba.

SCHALM, O. W.; CARROL, E.; JAIN, N. C. *Bovine mastitis*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. 360p.

SCHMIDT, V.; PINTO, A.T.; SCHNEIDER, R.N. et al. Caracterização da mastite subclínica em caprinos produzidos em sistema orgânico no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras*., v.29, p. 774-778, 2009.

WHITE, E.C.; HINCLEY, L.S. Prevalence of pathogens in a goat milk. *Small Rum. Res*. v.33, p.117-121, 1999.

WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W. et al. *Koneman: Diagnóstico microbiológico. Texto e atlas colorido.* 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1565p. 2008.

Anexo 01. Ocorrência, isolada ou em associação, dos genes de toxinas e de resistência à meticilina em linhagens de ECP e ECN isoladas de leite humano, bovino e caprino. Botucatu, SP, 2011.

Genes	*sea*	*seb*	*sec*	*sea+seb*	*sea+sec*	*sea+tsst-1*	*sea+seb+sec*	*sea+seb+sec+tsst-1*	*seb+sec*	*mecA*
Micro-organismo										
ECP humanos	01	0	0	0	0	02	01	0	0	08
ECN humanos	29	0	01	02	05	0	0	0	0	30
ECP vacas com mastite	03	0	0	0	01	0	0	0	0	0
ECN vacas com mastite	05	02	01	0	02	0	0	0	0	08
ECP vacas sem mastite	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ECN vacas sem mastite	04	02	01	0	0	0	02	0	0	02
ECP cabras com mastite	05	0	01	0	0	0	0	01	01	01
ECN cabras com mastite	07	0	03	0	01	0	0	0	0	07
ECP cabras sem mastite	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ECN cabras sem mastite	06	0	0	02	01	0	0	0	01	15

* ECP: Estafilococos coagulase positivo; ECN: Estafilococos coagulase negativo *sea*: Gene codificador da enterotoxina A; *seb*: Gene codificador da enterotoxina B; *sec*: Gene codificador da enterotoxina C; *sed*: Gene codificador da enterotoxina D; *tsst-1:* Gene codificador para toxina da síndrome do choque tóxico; mecA: Gene codificador para resistência à meticilina.

Salerno, T., 2011.

Anexo 02. Ocorrência, isolada ou em associação, de produção de toxinas estafilocócicas em linhagens de ECP e ECN isoladas de leite humano, bovino e caprino. Botucatu, SP, 2011.

Toxinas	SEA	SEB	SEC	SED	TSST-1	SEA+TSST-1	SEA+SEC	SEA+SEB+SEC+TSST-1	SEB+SEC
Micro-organismo									
ECP humanos	0	0	0	0	0	01	01	0	0
ECN humanos	01	01	0	0	0	0	0	0	0
ECP vacas com mastite	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ECN vacas com mastite	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ECP vacas sem mastite	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ECN vacas sem mastite	0	0	01	0	0	0	0	0	0
ECP cabras com mastite	0	0	01	0	0	0	0	01	01
ECN cabras com mastite	01	0	0	0	0	0	0	0	0
ECP cabras sem mastite	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ECN cabras sem mastite	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* ECP: Estafilococos coagulase positivo; ECN: Estafilococos coagulase negativos; SEA: Enterotoxina A; SEB: Enterotoxina B; SEC: Enterotoxina C; SED: Enterotoxina D; TSST-1: Toxina da síndrome do choque tóxico.