

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* E DE SUAS
TOXINAS NO LEITE DE TANQUE DE REBANHOS BOVINOS, EM
CONDIÇÕES DE REFRIGERAÇÃO E SOB TEMPERATURA
AMBIENTE

PATRÍCIA YOSHIDA FACCIOLI

Botucatu – SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DETECÇÃO MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus* E DE SUAS
TOXINAS NO LEITE DE TANQUE DE REBANHOS BOVINOS, EM
CONDIÇÕES DE REFRIGERAÇÃO E SOB TEMPERATURA
AMBIENTE

PATRÍCIA YOSHIDA FACCIOLI

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

Orientador: Prof. Titular Helio
Langoni

Co-orientador: Prof^a Dra. Maria
de Lourdes Ribeiro de Souza da
Cunha

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

Faccioli, Patrícia Yoshida.

Detecção molecular de *Staphylococcus aureus* e de suas toxinas no leite de tanque de rebanhos bovinos, em condições de refrigeração e sob temperatura ambiente / Patrícia Yoshida Faccioli. – Botucatu: [134 p.], 2010

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Helio Langoni

Co-Orientador: Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha

Capes: 50502000

1. Estafilococos aureos. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Bovino de leite.

Palavras-chave: Bovino; Enterotoxinas; Leite; PCR; RPLA; *Staphylococcus aureus*.

Patrícia Yoshida Faccioli

Detecção molecular de *Staphylococcus aureus* e de suas toxinas no leite de tanque de rebanhos bovinos, em condições de refrigeração e sob temperatura ambiente.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Helio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Adjunto Márcio Garcia Ribeiro

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Assistente Doutor José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Dr. Luiz Simeão do Carmo

Membro Titular

Departamento de Microbiologia

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG – Belo Horizonte/MG

Prof^a Titular Elizabeth Oliveira da Costa Freitas Guimarães

Membro Titular

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

FMVZ - USP

Prof. Adjunto Paulo Francisco Domingues

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Titular Antonio Nader Filho

Membro Suplente

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal

FCAV - UNESP – Jaboticabal/SP

Prof. Associado Rinaldo Aparecido Mota

Membro Suplente

Departamento de Medicina Veterinária

UFRPE - Recife/PE

Data da Defesa: 06 de agosto de 2010.

DEDICATÓRIA

A Deus

Por iluminar e proteger o meu caminho, me fortalecer nas dificuldades e permitir a felicidade nas minhas conquistas.

A Família

Ao meu pai, por sempre acreditar em mim e me ajudar no que esteve ao seu alcance.

À minha mãe (in memoriam), por um convívio breve, mas que conseguiu passar os principais ensinamentos da vida, o amor, a tranquilidade, o carinho e o respeito.

À minha segunda mãe Gil, pelos seus ensinamentos, mesmo por muitas vezes intensos, mas que me ajudaram a amadurecer.

Ao meu noivo Carlos, companheiro e amigo de todas as horas que tem me apoiado na realização dos meus sonhos.

Aos meus sogros por me apoiarem nessa caminhada, sendo minha segunda família e meus companheiros no dia-a-dia.

Ao meu orientador Prof. Helio Langoni

Que acompanhou meu desenvolvimento profissional a cada dia. Pela paciência e orientação dedicada, sempre buscando o melhor.

A minha co-orientadora Prof^a Maria de Lourdes R. de Souza da Cunha
Pela co-orientação e acompanhamento imprescindíveis. Pela calma nos momentos de preocupação.

AGRADECIMENTOS

Aos professores José Paes de Almeida N. Pinto e Márcio Garcia Ribeiro pelas discussões e sugestões, no exame de qualificação e em outros momentos, importantes para o meu desenvolvimento profissional.

Ao Prof. Luiz Símeão do Carmo

Por ser tão prestativo nos momentos finais de meu trabalho, me auxiliando nas dificuldades com a detecção das enterotoxinas e por aceitar prontamente a participar da banca.

Ao Prof. Carlos Roberto Padovani

Pela realização de análise estatística impecável e pela orientação no delineamento do projeto.

Ao laticínio

Representado pela responsável Maria João B. Serra, por auxiliar na localização das propriedades, fornecer os dados das análises mensais do leite e indicar os motoristas Álvaro José Martins, Marcos Raimundo dos Santos (Marcão), Murilo Scapólio Martins e Sérgio Aparecido Scapol, que foram muito prestativos e imprescindíveis no acesso às propriedades.

Às alunas de Iniciação Científica

Marcela de Pinho Manzi, Glaucea Suman e Pamela Merlo Marson pela amizade, pela ajuda e pela participação ativa na execução deste trabalho.

Aos Residentes

Rozeani O. Tomé, Fernanda C. Gaio, Diego Generoso, Felipe Fornazari, Mariana Kikutí e Carla J. Coiro pela amizade e parceria nas atividades laboratoriais.

Aos Pós-graduandos

Ana Paula F. L. Corrêa, Diego Borin Nóbrega, Felipe F. Guimarães, Haroldo Greca Júnior, Leila Ullmann, Lucilene Granuzzio Camossi, Marcella Zampoli Troncarelli e Rodrigo Costa da Silva pela amizade e companheirismo, pelas discussões construtivas, cuja convivência me transformou em uma pessoa melhor, e à Virgínia B. Richini Pereira pela amizade e pela ajuda incondicional na finalização das técnicas biomoleculares.

Ao técnico de laboratório Benedito Donizete Menozzi

Pela amizade desde a residência, por ser sempre prestativo e auxiliar de forma incondicional em todas as atividades do laboratório.

Ao Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Onde tive a honra de conviver por todo esse tempo com professores, funcionários e pós-graduandos com muita satisfação e alegria.

À Seção de Pós-Graduação

Pela disposição e zelo em auxiliar em minha caminhada.

À FAPESP

Pela concessão da bolsa de doutorado direto (processo n° 2009/51603-1) e do auxílio à pesquisa (processo n° 2007/00680-0), indispensáveis para a execução e participação de eventos importantes na divulgação deste trabalho.

Ao CNPq

Pelo apoio financeiro para o desenvolvimento de parte do projeto (processo n° 577972/2008-1).

*“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice.
Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”*

(Leonardo da Vinci)

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Sequência das bases e tamanho do produto amplificado pelos primers <i>S. aureus</i> específicos	27
Tabela 2. Sequência das bases, localização dentro dos genes, e tamanhos detectados dos produtos amplificados pelos primers enterotoxina-específicos	28
Tabela 3. Medidas descritivas das variáveis quantitativas	34
Tabela 4. Medidas descritivas das variáveis quantitativas	35
Tabela 5. Distribuição do tipo de tanque utilizado nas propriedades estudadas	38
Tabela 6. Medidas descritivas das variáveis segundo o tipo de tanque utilizado nas diferentes propriedades	39
Tabela 7. Distribuição do tipo de ordenha utilizado nas propriedades estudadas	40
Tabela 8. Distribuição do tipo de procedimento adotado nas propriedades estudadas	40
Tabela 9. Medidas descritivas das variáveis segundo o tipo de ordenha utilizado nas propriedades estudadas	42
Tabela 10. Distribuição do tipo de assistência técnica recebido nas propriedades estudadas	43
Tabela 11. Medidas descritivas das variáveis segundo o tipo de assistência técnica recebida nas propriedades estudadas	44

Tabela 12. Medidas descritivas da contagem (UFC/mL) de <i>S. aureus</i> segundo o momento	46
Tabela 13. Distribuição dos resultados microbiológicos para <i>S. aureus</i> segundo o momento de avaliação	47
Tabela 14. Resultados da PCR para <i>Staphylococcus aureus</i> em amostras de leite de tanques segundo o momento de avaliação	54
Tabela 15. Distribuição dos resultados da PCR e do microbiológico para <i>S. aureus</i> segundo o momento de avaliação	54
Tabela 16. Medidas descritivas da contagem (UFC/mL) de <i>S. aureus</i> segundo a PCR	55
Tabela 17. Distribuição dos resultados microbiológicos e da PCR para <i>S. aureus</i>	55
Tabela 18. Resultado da pesquisa de genes codificadores das enterotoxinas nas amostras de leite, segundo o momento de avaliação	56
Tabela 19. Resultados da pesquisa de enterotoxinas diretamente das amostras de leite	59
Tabela 20. Distribuição dos resultados da pesquisa de enterotoxinas diretamente das amostras de leite nos diferentes momentos	60
Tabela 21. Distribuição dos resultados de detecção do gene <i>sea</i> e da enterotoxina A nas amostras de leite de tanque nas propriedades pesquisadas	61

Tabela 22. Distribuição dos resultados de detecção do gene <i>seb</i> e da enterotoxina B nas amostras de leite de tanque nas propriedades pesquisadas	61
Tabela 23. Distribuição dos resultados de detecção do gene <i>sec</i> e da enterotoxina C nas amostras de leite de tanque nas propriedades pesquisadas.	62
Tabela 24. Distribuição dos resultados de detecção do gene <i>sed</i> e da enterotoxina D nas amostras de leite de tanque nas propriedades pesquisadas.	62
Tabela 25. Medidas descritivas da contagem (UFC/mL) de <i>S. aureus</i> nas amostras de leite de tanque das propriedades estudadas segundo a enterotoxina	63
Tabela 26. Medidas descritivas da contagem (UFC/mL) de <i>S. aureus</i> nas amostras de leite de tanque que possuíam potencial enterotoxigênico sem expressão fenotípica	64

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ligação entre as células T e APC: um modelo esquemático de interação do superantígeno (SAg) com o TCR e as moléculas de classe II	13
Figura 2. Valores de CCS (células/mL) de cada propriedade nas três coletas	36
Figura 3. Valores de CBT (UFC/mL) de cada propriedade nas três coletas	37
Figura 4. Contagens de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL) nas propriedades em cada coleta. Propriedades de 4 a 33	48
Figura 5. Contagens de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL) nas propriedades em cada coleta. Propriedades de 34 a 56	49
Figura 6. Contagens de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/mL) nas propriedades em cada coleta. Propriedades de 57 a 72	50
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 2%. (A) Limiar de detecção de <i>S. aureus</i> . 1-10: DNA de <i>S. aureus</i> ATCC 13565 em diluições seriadas (1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL, 1 fg/μL, 100 ag/μL, 10 ag/μL e 1 ag/μL), 11: controle negativo (água), 12: marcador de peso molecular 100pb. (B) Limiar de detecção do gene codificador da enterotoxina A – <i>sea</i> . 1: marcador de peso molecular 25pb, 2-6: DNA de <i>S. aureus</i> ATCC 13565 em diluições seriadas (1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL), 7: controle negativo (água)	51
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 2%. (A) Limiar de detecção do gene codificador da enterotoxina B – <i>seb</i> . 1 e 8: marcador de peso molecular 100 pb, 2: controle negativo (água), 3-7: DNA de <i>S. aureus</i> ATCC 14458 em diluições seriadas (1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL). (B) Limiar de	

detecção do gene codificador da enterotoxina C – *sec.* 1 e 8: marcador de peso molecular, 2-6: DNA de *S. aureus* ATCC 19095 em diluições seriadas (1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL), 7: controle negativo (água) 52

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 2%. Limiar de detecção do gene codificador da enterotoxina D – *sed.* 1: marcador de peso molecular 100 pb, 2-6: DNA de *S. aureus* ATCC 13565 em diluições seriadas (100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL). 7: controle negativo (água) 52

Figura 10. Microplaca com diluições seriadas da toxina padrão TSST-1. (A) Visão geral das diluições. Maior detalhe na intensidade das reações em 5 ng/mL (B), 2,5 ng/mL (C), 1,0 ng/mL (D), 0,5 ng/mL (E) e 0,25 ng/mL (F) 57

Figura 11. Microplaca com diluições seriadas da toxina padrão TSST-1. (A) Visão geral das diluições. Maior detalhe na intensidade das reações em 0,5 ng/mL (B), 0,4 ng/mL (C), 0,3 ng/mL (D), 0,2 ng/mL (E) e 0,1 ng/mL (F) 58

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Contagem de células somáticas máxima admitida no leite cru refrigerado	08
Quadro 2. Contagem bacteriana total máxima admitida no leite cru refrigerado	08
Quadro 3. Características observadas para classificação das espécies de estafilococos coagulase positivos	23
Quadro 4. Distribuição dos isolados não característicos	45
Quadro 5. Associação entre os resultados de detecção de <i>S. aureus</i> com a detecção genotípica e fenotípica das enterotoxinas	65

LISTA DE ABREVIACOES

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
RPLA	aglutinação passiva reversa em látex
PCR	reação em cadeia pela polimerase
DNA	cido desoxirribonucléico
ATCC	American Type Culture Collection
TSST-1	Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico
SE	Enterotoxina Estafilocócica
IN 51	Instrução Normativa n 51
PNMQL	Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite
RBQL	Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite
CCS	Contagem de Células Somáticas
CBT	Contagem Bacteriana Total
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
TCR	Receptor da célula T
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
APC	Célula apresentadora de antígeno

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Pecuária leiteira	5
2.2. A legislação	6
2.3. Contagem de células somáticas (CCS)	7
2.4. Contagem bacteriana total (CBT)	8
2.5. A mastite bovina	9
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.7. Enterotoxinas estafilocócicas (SE)	11
2.8. Surtos relatados na literatura	13
2.9. Métodos diretos de detecção de enterotoxinas nos alimentos	16
2.10. Métodos indiretos de detecção de enterotoxinas	17
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Seleção das propriedades	21
4.2. Determinação do perfil dos produtores	21
4.3. Colheita das amostras	21
4.4. Consentimento (ética)	22
4.5. Exame microbiológico	22
4.5.1. Caracterização e contagem dos isolados de <i>S. aureus</i>	23
4.5.2. Meios e testes bioquímicos utilizados no isolamento e identificação de <i>S. aureus</i>	25
4.6. Estudo biomolecular	25

4.6.1. Detecção genotípica de <i>S. aureus</i> e dos genes codificadores de enterotoxinas diretamente do leite	25
4.6.1.1. Extração de DNA	25
4.6.1.2. Amplificação do DNA	27
4.6.1.3. Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados da PCR	29
4.6.1.4. Determinação do limiar de detecção da técnica de PCR ..	29
4.6.1.4.1. Obtenção do inóculo	29
4.6.1.4.2. Extração de DNA	29
4.6.1.4.3. Quantificação de DNA	30
4.7. Detecção e quantificação das enterotoxinas estafilocócicas pelo método de aglutinação em látex (RPLA) diretamente do leite	30
4.7.1. Extração das enterotoxinas	30
4.7.2. Triagem das amostras	31
4.7.3. Quantificação das amostras	31
4.8. Análise Estatística.....	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1. Perfil dos produtores	34
5.2. Exame microbiológico	44
5.2.1. Caracterização dos isolados de <i>S. aureus</i>	44
5.2.2. Dinâmica da contagem de <i>S. aureus</i>	46
5.3. Estudo biomolecular	51
5.3.1. Determinação do limiar de detecção (sensibilidade analítica)	51
5.3.2. Determinação da sensibilidade e especificidade diagnóstica	53

5.3.3. Detecção genotípica de <i>S. aureus</i> e dos genes codificadores de enterotoxinas diretamente do leite	53
5.4. Detecção das enterotoxinas estafilocócicas pelo método de aglutinação em látex (RPLA) diretamente do leite	57
5.4.1. Padronização da quantificação das enterotoxinas	57
5.4.2. Resultados da detecção e quantificação das enterotoxinas	59
5.4.3. Associação entre a detecção genotípica e fenotípica das enterotoxinas	60
5.5.4. Associação entre a contagem de <i>S. aureus</i> e a detecção das enterotoxinas	62
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÃO	80
8. BIBLIOGRAFIA	83
9. TRABALHO CIENTÍFICO	98
Anexos	112

FACCIOLI, P.Y. **Detecção molecular de *Staphylococcus aureus* e de suas toxinas no leite de tanque de rebanhos bovinos, em condições de refrigeração e sob temperatura ambiente.** Botucatu, 2010. 132p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

RESUMO

O leite é de extrema importância na alimentação humana. A exigência quanto à sua qualidade tem aumentado, inclusive com relação à transmissão de patógenos. *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes da mastite bovina e tem grande importância em saúde pública por produzir enterotoxinas. Os objetivos do trabalho foram avaliar o perfil dos produtores da região considerando-se a atual legislação e a qualidade do leite produzido com ênfase na presença de *Staphylococcus* enterotoxigênicos, utilizando a PCR na detecção de *S. aureus* e dos genes codificadores das enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec* e *sed* diretamente do leite de tanque em comparação ao exame microbiológico tradicional, e realizando a detecção das respectivas enterotoxinas pelo método de aglutinação passiva reversa em látex (RPLA) diretamente do leite, comparando com os resultados genotípicos. Utilizaram-se 104 amostras de leite de tanque, estudadas a fresco e após incubação por 5 horas, uma alíquota a 7°C e outra a 25°C concomitantemente. A PCR foi altamente sensível, detectando *S. aureus* em 99% das amostras, mas com moderada concordância com o microbiológico nas amostras positivas. As amostras de *Staphylococcus* enterotoxigênicos apresentaram predomínio do gene *sec* (58,65%), seguido pelo gene *sea* (43,27%), *seb* (23,27%) e *sed* (1,28). Quanto às enterotoxinas, houve a sua detecção em 9% das amostras em quantidades que variaram de 1 a 5 ng/μL. Verifica-se a importância do estudo do potencial do leite como fonte de *S. aureus* enterotoxigênico e de suas enterotoxinas, fornecendo risco para a saúde pública caso o leite não seja refrigerado adequadamente.

Palavras-chave: bovino, enterotoxinas, leite, PCR, RPLA, *Staphylococcus aureus*.

FACCIOLI, P.Y. **Molecular detection of *Staphylococcus aureus* and its toxins in bulk tank milk of dairy herds, on refrigeration condition, and on room temperature.** Botucatu, 2010. 132p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

ABSTRACT

Milk has extreme importance to human feed. The demand for quality milk has increased, including pathogens transmission. *Staphylococcus aureus* is one of the main agents of mastitis and has importance in public health for producing enterotoxins. The study aims were to evaluate the region producer's profile, considering the present legislation and the quality of milk produced with emphasis in enterotoxigenic *Staphylococcus* presence, using PCR in detection of *S. aureus* and enterotoxins encoding genes *sea*, *seb*, *sec* and *sed* directly from bulk tank milk in comparison with traditional microbiological test, and carrying out the detection of respective enterotoxins by reverse passive latex agglutination method (RPLA) directly from milk comparing with genotypic results. A total of 104 samples of bulk tank milk were used, studied fresh and after 5-hour storage, one bracket at 7°C the another at 25°C concurrently. PCR was highly sensitive, detecting *S. aureus* in 99% of samples, but with moderate concordance with microbiological test in positive samples. The samples of enterotoxigenic *Staphylococcus* presented predomination of *sec* (58.65%), followed by *sea* (43.27%), *seb* (23.27%) and *sed* (1.28%) genes. As the enterotoxins, its detection occurred in 9% of samples in quantities that ranged from 1 to 5 ng/μL. The importance of the study of milk potential as enterotoxigenic *S. aureus* and enterotoxins source is verified, providing risk to public health if milk is not refrigerated properly.

Keywords: bovine, enterotoxins, milk, PCR, RPLA, *Staphylococcus aureus*.

***I*ntrodução**

1. INTRODUÇÃO

O leite é de extrema importância na alimentação humana, principalmente nos primeiros anos de vida, pois é fonte de proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais, com destaque para o cálcio. O seu consumo tem aumentado e é necessário a obtenção de um produto de qualidade nutricional e inócuo à saúde. Para os animais, constitui-se no primeiro alimento do recém nascido e é importante na transmissão da imunidade passiva (COSTA, 1991; FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), constatando o atraso da legislação sanitária federal quanto à produção de leite, elaborou a Instrução Normativa nº 51 de 2002 (IN 51), buscando o aperfeiçoamento e a modernização das normas, segundo a realidade de cada região do país, e a conseqüente melhoria da pecuária leiteira (BRASIL, 2002). Muitos produtores ainda não se adaptaram às exigências e ainda produzem e transportam o leite de forma inadequada antes de entregá-lo ao laticínio.

Para os produtores a mastite é um dos principais problemas do rebanho por afetar a qualidade do leite, pela alta prevalência, causar prejuízos devido à diminuição da produção, ao comprometimento funcional da glândula mamária e, ocasionalmente, pela morte do animal. Constitui-se em ameaça à saúde pública pelo risco de transmissão de patógenos aos humanos pelo leite (COSTA, 1991; MOTA et al., 2004; RADOSTITS et al., 2007).

Nas mastites infecciosas contagiosas podemos destacar *Staphylococcus aureus* como um dos mais importantes agentes (NADER-FILHO et al., 1985; COSTA, 1998; LANGONI et al., 1998; MOTA et al., 2004). Essa bactéria tem grande importância em saúde pública por ser produtora de enterotoxinas termorresistentes associadas ao choque tóxico, intoxicações alimentares, diversas formas de alergias e doenças autoimunes (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

Nos últimos anos houve aumento significativo no desenvolvimento de métodos genéticos para a detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. A introdução da biologia molecular estabeleceu uma alternativa viável aos métodos tradicionais de cultura para o diagnóstico microbiano. Entre as vantagens pode-se destacar o maior poder de tipificação e discriminação,

maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de se trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura utilizados na rotina (SILVA; GANDRA, 2004).

Seguindo este delineamento, a detecção de *S. aureus* do leite de tanque de expansão por técnicas biomoleculares despense menor tempo e é mais sensível quando comparada aos métodos tradicionais. Além disso, permite a diferenciação de linhagens enterotoxigênicas das não produtoras de toxinas, não havendo necessidade de se isolar o agente para posterior verificação da produção de toxinas, o que pode ser realizado pela detecção dos genes codificadores das enterotoxinas, como por exemplo, *sea*, *seb*, *sec* e *sed* (JOHNSON et al., 1991).

É possível também realizar a detecção direta das enterotoxinas correspondentes aos genes (A, B, C e D) pela técnica de aglutinação passiva reversa em látex (RPLA), que são citadas na literatura como as mais comuns nos casos de intoxicação alimentar (SÁ et al., 2004; SILVA; GANDRA, 2004; FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

Houve motivação para a elaboração desta pesquisa tendo-se em vista a corrente implantação de uma legislação mais criteriosa quanto à qualidade do leite bovino, os possíveis riscos de transmissão de patógenos pelo leite e a ausência de trabalhos na literatura que detectem as enterotoxinas estafilocócicas diretamente do leite de tanques de expansão.

*R*evisão da literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pecuária leiteira

A cadeia leiteira tem sofrido grandes modificações nos últimos anos, e ainda não está definido claramente o rumo que será tomado. Estão havendo mudanças no mercado consumidor, aumento do consumo de leite longa vida, a maior preocupação com a qualidade de vida e a escolha por produtos diferenciados. Houve a implantação intensa do resfriamento do leite nas propriedades e granelização pela ação da nova legislação. O processo de transformação em andamento tem sido importante para que o Brasil mude sua condição histórica de grande importador para uma condição de auto-suficiência, havendo expectativas de que o país aumente significativamente a sua produção, a ponto de se tornar um exportador de peso no mercado exterior (CARVALHO et al., 2007). Esse cenário favorece a melhoria da qualidade do leite, o que será benéfico para o mercado consumidor interno e para a cadeia produtiva leiteira.

O rebanho leiteiro e a produção de leite tem aumentado gradativamente, contabilizando 21,5 milhões de vacas ordenhadas e 27,8 bilhões de litros de leite em 2008 (BRASIL, 2009). A produção de leite está dispersa por todo o território nacional e é caracterizada pela grande heterogeneidade no que diz respeito ao tamanho das propriedades, ao tipo de produtor, rebanho e às tecnologias de produção adotadas, ou seja, ao processo produtivo. Existem produtores especializados, que investem em tecnologia, obtêm ganhos de escala e produzem com melhor qualidade, recebendo melhor remuneração pelo produto. Estão concentrados principalmente (mas não exclusivamente) nas bacias leiteiras como as dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e do Paraná. Há, em outro extremo, produtores de pequeno porte, que muitas vezes permanecem à margem desse processo, mas que representam, tanto em número como em quantidade da produção, volume significativo a ponto de serem priorizados em políticas públicas, especialmente após 2003. Esses produtores vivem da renda gerada na atividade leiteira, em grande parte compondo o que se denomina agricultura familiar, conforme observado por Zoccal et al. (2004). O Brasil, em uma análise geral, parece indicar que ao menos em médio prazo, trilha um caminho diferente de alguns dos principais

produtores de leite, em que o aumento na escala de produção por meio de ganhos de produtividade, foi a condição fundamental para a permanência na atividade. Assim como o Brasil, vale lembrar a Índia e o Paquistão, grandes produtores de leite que lastreiam a produção na agricultura familiar (CARVALHO et al., 2007).

2.2 A legislação

O leite brasileiro nem sempre apresenta a qualidade necessária. A partir desta evidência, o MAPA começou uma discussão no início da década de 90, envolvendo os setores científicos e econômicos da cadeia leiteira buscando alternativas para melhorar a qualidade do leite produzido no Brasil. Dessa discussão surgiu a portaria nº 166 (BRASIL, 1998) que estabeleceu um grupo de trabalho para analisar e propor um programa de medidas visando o aumento da competitividade e a modernização do setor leiteiro no Brasil. O grupo desenvolveu uma versão do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), projeto que já vinha sendo desenvolvido desde 1996, e o submeteu à consulta pública pela Portaria nº 56 (BRASIL, 1999). A Instrução Normativa nº 51 (IN 51) publicada em 2002 (BRASIL, 2002) foi a versão definitiva das novas normas para a produção leiteira, no que diz respeito à produção, identidade e qualidade de leite tipos A, B, C, pasteurizado e cru refrigerado, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Um incentivo para a modernização dos produtores foi a resolução nº 3088 (BRASIL^b, 2003), que aprovou o financiamento de equipamentos de resfriamento e coleta a granel. A principal razão de todas essas medidas foi a necessidade de adequação das normas publicadas no RIISPOA (Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal) às atuais realidades de produção e consumo de leite no Brasil (NERO et al., 2005).

A IN 51 está sendo implantada gradativamente, para que os produtores e as indústrias possam se adaptar às novas normas. Em junho de 2005 foi estabelecido o prazo de 6 meses como fase de transição, tendo o objetivo de levantar as informações sobre as condições higiênico-sanitárias do leite produzido e/ou distribuído nas regiões sul, sudeste e centro-oeste. Nesse

período foi obrigatório o envio de amostras de leite para análise, mas sem a aplicação de medidas de caráter fiscal, e sim de caráter orientativo (BRASIL, 2005a).

Em dezembro de 2005 (BRASIL, 2005^b) reforçou-se a obrigatoriedade do envio de amostras de leite para análise, o cumprimento do Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte à Granel, em especial os itens 9.1.3. Implantação de Programa de Controle de Qualidade da matéria-prima e 9.1.4. Implantação de Programa de Educação Continuada dos Participantes.

Em 2006, após um ano de vigência da IN 51, os primeiros dados foram liberados pelos laboratórios integrantes da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle de Qualidade do Leite (RBQL) no II Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. De todos os quesitos avaliados, a contagem bacteriana total mostrou ser o grande problema a ser enfrentado. Dos seis laboratórios, cinco tinham na CBT 18,4 a 68,99% das amostras acima do limite estipulado (PINTO; ISIDORO, 2007).

Quanto à questão do recebimento do leite na plataforma do laticínio sem refrigeração dos produtores que ainda não possuem tanque segue um dado importante que deve ser levado em consideração. O Anexo IV da IN 51 (BRASIL, 2002) admite o transporte do leite em latões ou tarros em temperatura ambiente, desde que o laticínio aceite, a matéria-prima atinja os padrões de qualidade afixados e o leite seja entregue ao laticínio no máximo até 2 horas após a conclusão da ordenha. Considerando-se que com o tempo de ordenha e de transporte do leite até o laticínio, ele fica exposto à temperatura ambiente por aproximadamente 5 horas, é importante verificar a influência deste tempo na qualidade final do leite.

2.3 Contagem de Células Somáticas (CCS)

A CCS avalia a quantidade de células inflamatórias por mililitro de leite, sendo um indicativo de mastite subclínica, principalmente causada por agentes contagiosos. A presença de mastite subclínica demonstra indiretamente a presença de agentes infecciosos e de alterações na composição do leite, com consequente redução de sua qualidade. Para um panorama geral do rebanho realiza-se esta contagem em amostra do leite do tanque da propriedade.

Com a IN 51 (BRASIL, 2002), foram determinados limites máximos para a CCS de acordo com a região do país:

QUADRO 1. Contagem de células somáticas máxima admitida no leite cru refrigerado		
A partir de 01/07/2005 nas regiões CO, SE e S e a partir de 01/07/2007 nas regiões N e NE.	A partir de 01/07/2008 nas regiões CO, SE e S e a partir de 01/07/2010 nas regiões N e NE.	A partir de 01/07/2011 nas regiões CO, SE e S e a partir de 01/07/2012 nas regiões N e NE.
1.000.000 células/mL	750.000 células/mL	400.000 células/mL

Fonte: Modificado de BRASIL, 2002.

Atualmente está em vigência o valor de 750.000 células/mL. O leite acima deste limite está sendo comprado pelo laticínio com um valor menor, mas no futuro a intenção é que esse leite seja rejeitado.

2.4 Contagem Bacteriana Total (CBT)

A CBT é a avaliação da contagem de bactérias aeróbicas em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de leite. Essa contagem indica a higiene do leite, demonstrando indiretamente se a ordenha, armazenamento e transporte foram realizados corretamente, e se em todas estas etapas os utensílios e equipamentos foram higienizados adequadamente. É uma forma de fazer o diagnóstico de uma propriedade com uma amostra do tanque, assim como com a CCS.

Pela IN 51 (BRASIL, 2002), também foram determinados limites para a CBT, que deverão ser reduzidos gradualmente. Atualmente o limite é de 750.000 UFC/mL.

QUADRO 2. Contagem bacteriana total máxima admitida no leite cru refrigerado		
A partir de 01/07/2005 nas regiões CO, SE e S e a partir de 01/07/2007 nas regiões N e NE.	A partir de 01/07/2008 nas regiões CO, SE e S e a partir de 01/07/2010 nas regiões N e NE.	A partir de 01/07/2011 nas regiões CO, SE e S e a partir de 01/07/2012 nas regiões N e NE.
1.000.000 UFC/mL	750.000 UFC/mL	400.000 UFC/mL

Fonte: Modificado de BRASIL, 2002.

Baixa CCS e CBT resultam em um produto com maior vida de prateleira, que mantém suas características sensoriais, nutritivas e de segurança, importantes para o consumidor e para a indústria (SANTOS, 2007).

2.5 A mastite bovina

A mastite é o problema mais sério nos rebanhos leiteiros pela alta prevalência, prejuízos devido à diminuição da produção, ao comprometimento funcional da glândula mamária e, ocasionalmente, pela morte de animais. Constitui-se em ameaça à saúde pública pelo risco de transmissão de patógenos ou de suas toxinas aos humanos. Trata-se de inflamação da glândula mamária, de natureza fisiológica, traumática, alérgica, metabólica ou infecciosa. Caracteriza-se por uma série de alterações físicas, químicas e microbiológicas do leite e modificações patológicas do tecido glandular, traduzidas por grumos ou coágulos de pus, sangue e presença de grande número de leucócitos (COSTA, 1991; MOTA et al., 2004; RADOSTITIS et al., 2007).

Esta afecção pode se apresentar de duas formas: clínica e subclínica. Na forma clínica há alterações da glândula mamária com aumento de temperatura, rubor, edema, dor e fibrose. No leite aparecem grumos ou coágulos de pus, sangue, ou leite aguado em dessora (COSTA, 1998). A forma subclínica caracteriza-se pela ausência de sinais clínicos, observando-se aumento de células somáticas, diminuição da produção leiteira dos quartos afetados e alteração da composição do leite (ZAFALON et al., 2007; CUNHA et al., 2008).

Os agentes da mastite bovina são classificados em dois grupos, quanto à origem e modo de transmissão: os contagiosos e ambientais. Vários são os patógenos contagiosos, entretanto, os mais patogênicos são *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae*. São chamados de “vaca dependentes” e transmitidos de vacas infectadas ou portadoras sadias para outras pelas mãos do ordenhador, ordenhadeira mecânica, toalhas para higienização dos tetos, e por outros fômites de uso comum entre os animais. A alta prevalência de *S. aureus* nas mastites se deve à capacidade de causar infecções de longa duração e resistência a antimicrobianos, tendendo à cronicidade, com baixa taxa de cura e levando à queda na produção leiteira (SABOUR et al., 2004; ZAFALON et al., 2007). Os patógenos ambientais são os microrganismos da família

Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., além de *Pseudomonas* spp., leveduras, fungos e algas, e algumas espécies de *Streptococcus*. A via de transmissão é o ambiente e os microrganismos são veiculados pelo manejo inadequado como camas úmidas, excesso de sujidade nas áreas de permanência dos animais, ordenha de úberes sujos e molhados, higiene inadequada no preparo de pré-ordenha, objetos nas instalações e nos pastos que favoreçam a ocorrência de lesões nos tetos (COSTA, 1998; RADOSTITIS et al., 2007).

2.6 *Staphylococcus aureus*

Espécie pertencente à família Staphylococaceae, gênero *Staphylococcus* o qual é composto atualmente por 43 espécies (EUZÉBY, 2010). São geralmente encontrados na pele e mucosas (principalmente nasal) dos humanos e de animais saudáveis. Entre as espécies coagulase-positiva, *S. aureus* é a mais importante por possuir inúmeros fatores de virulência, entre eles as enterotoxinas, e ocorrer com alta frequência. É importante ressaltar que outras espécies de estafilococos, inclusive os coagulase-negativos, também podem produzir enterotoxinas e causar mastite (KONEMAN et al., 2008).

Staphylococcus aureus é anaeróbio facultativo, produtor de catalase, negativo à oxidase, imóvel e coagulase-positivo. Dentro do grupo dos estafilococos coagulase-positivos podemos destacar *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus*, que são diferenciados de *S. aureus* pelas provas de fermentação da trealose, do manitol, da maltose, resistência à polimixina B (300 UI) e produção de acetoína (QUINN et al., 2005; KONEMAN et al., 2008).

A multiplicação da bactéria ocorre em meio convencional, como agar nutriente e agar sangue. As colônias se desenvolvem entre 18 a 24 horas a 37°C, com 2 a 3 mm de diâmetro, de coloração entre branca ao amarelo dourado, e halo de hemólise (QUINN et al., 2005).

Para a enumeração de *Staphylococcus aureus* em alimentos o método de referência é a contagem em placa de agar Baird Parker, pois permite o isolamento mesmo de bactérias injuriadas, sem necessitar da etapa de enriquecimento não seletivo (MARSHALL, 1992; CUNNIFF, 1995). A desvantagem deste meio é não ser totalmente seletivo, o que já foi observado

por outros autores (ISIGIDI et al., 1989; OLLIS et al., 1995; DE BUYSER et al., 1998; ZANGERL, 1999). Dessa forma, a pesquisa de *S. aureus* em leite cru e derivados muito contaminados por microrganismos competidores fica dificultada (SANTOS, 2008).

2.7 Enterotoxinas estafilocócicas (SE)

Além do significado das mastites para a produção leiteira, há uma preocupação da transmissão de *S. aureus* para os humanos quando eliminado pelo leite. Muitas linhagens de *S. aureus* são enterotoxigênicas, fornecendo risco para a saúde pública por estarem associadas ao choque tóxico, alergias, doenças autoimunes e a intoxicações alimentares pela ingestão de lácteos contaminados. Alguns autores consideram que as enterotoxinas tem potencial para serem usadas como arma biológica (DINGES et al., 2000; SILVA; GRANDA, 2004).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares com baixo peso molecular (25.000 a 30.000 daltons), hidrossolúveis, cuja composição de aminoácidos, estrutura molecular e atividades farmacológicas são semelhantes entre si, possuindo, entretanto, propriedades imunológicas distintas. Não são inativadas por enzimas proteolíticas, motivo pelo qual permanecem ativas mesmo após a ingestão, não sendo afetadas por enzimas de outros microrganismos ou do próprio alimento. São termoresistentes, resistindo à pasteurização e ultrapasteurização, o que favorece a permanência no leite e derivados (SILVA; GRANDA, 2004; FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

São consideradas toxinas por exibirem pelo menos três propriedades biológicas: pirogenicidade, superantigenicidade e a capacidade de aumentar a letalidade de endotoxina em coelhos em até 100.000 vezes. Além disso são potentes agentes eméticos (DINGES et al., 2000).

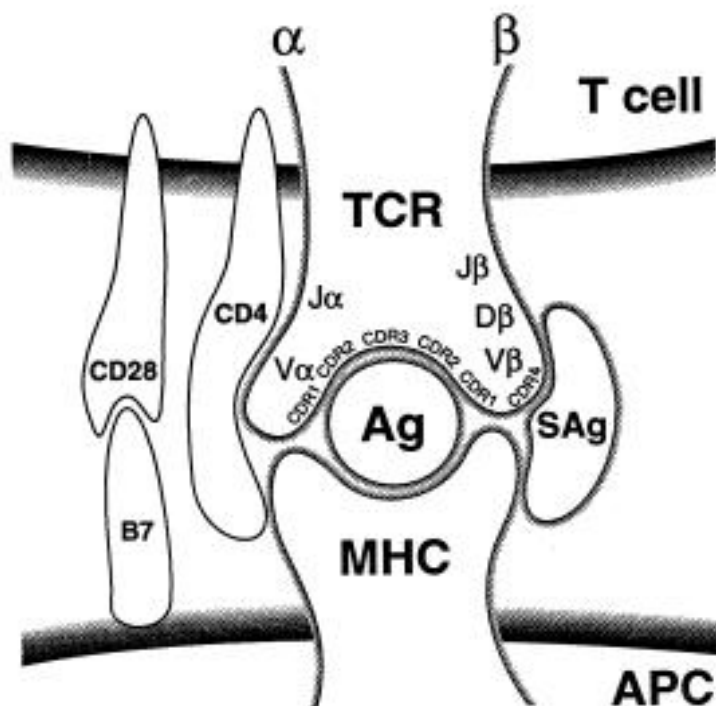
Até o momento foram identificadas 23 enterotoxinas estafilocócicas (SE), denominadas SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SER, SES, SET, SEIU e SEIV. O Comitê Internacional de Nomenclatura para Superantígenos Estafilocócicos propuseram que somente superantígenos estafilocócicos que induzem emese após administração oral em um modelo experimental de primata deve ser designado como enterotoxina estafilocócica. Além disso, recomendam que

outras toxinas similares que não exibem propriedades eméticas em modelos animais primatas ou não foram ainda testadas devem ser designadas como enterotoxinas estafilocócicas-semelhantes, staphylococcal enterotoxin-like toxins (SEI) tipo “X”. Dessa forma, somente as enterotoxinas de A a I, R, S e T provaram ter propriedades eméticas. As demais possuem somente atividade de superantígeno (VASCONCELOS; CUNHA, 2010). As enterotoxinas mais comuns em intoxicações alimentares são A, B, C e D (SÁ et al., 2004; SILVA; GRANDA, 2004; FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

O quadro clínico das pessoas intoxicadas se desenvolve pela própria resposta do sistema imune, visto que as enterotoxinas agem como superantígenos. A resposta imune celular frente a estes antígenos ocorre como evento primário de reconhecimento da toxina pelos receptores de antígenos ligados à membrana da célula T (TCR).

O TCR é composto por várias cadeias (α e β ou γ e δ). O antígeno é apresentado ao TCR na forma de peptídeos processados ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), classe I e II, as quais são proteínas ligadas à membrana e expostas na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC). Esse tipo de reconhecimento é a chave para a alta especificidade da resposta imune, onde somente algumas células T podem reconhecer um antígeno específico (BALABAN; RASOOLY, 2000).

Em contraste, os superantígenos podem interagir com muitas células T de maneira inespecífica, e são os mais potentes ativadores de linfócitos T. Eles requerem somente reconhecimento específico da cadeia $v\beta$ do TCR para interação e ligação entre o receptor da célula T e a célula apresentadora de antígeno do MHC classe II (figura 1), causando ativação de um grande número de células T e liberação exacerbada de citocinas (BALABAN; RASOOLY, 2000).



Fonte: KOTB, 1995

FIGURA 1. Ligação entre as células T e APC: um modelo esquemático de interação do superantígeno (SAg) com o TCR e as moléculas de classe II

Com os antígenos há uma resposta de 0,0001 a 0,000001% das células T. Nos superantígenos, por essa ligação inespecífica, há uma resposta de 5 a 20% das células.

2.8 Surtos relatados na literatura

Existem dois momentos críticos para a contaminação de leite e derivados com *S. aureus* que podem produzir enterotoxinas e levar a quadros de intoxicação alimentar em pessoas pela ingestão do produto: antes da pasteurização, na secreção do leite por infecção da glândula mamária do animal, na obtenção do produto pela ordenha, ou após a pasteurização, durante a elaboração de derivados.

O primeiro surto de gastroenterite em que foi possível estimar a dose humana de enterotoxina estafilocócica A ocorreu com leite achocolatado em uma escola dos EUA em 1988. Cada caixinha tinha uma quantidade de enterotoxina A que variou de 94 a 184 ng. Como houve uma variação entre o número de caixinhas consumidas pelos estudantes que apresentaram intoxicação, calculou-se a mediana de 1,33 caixas, o que correspondeu a 192

ng de SEA, ou seja, uma dose de 192 ng foi suficiente para causar intoxicação alimentar (EVENSON et al., 1988).

Um incidente massivo de intoxicação alimentar por estafilococos ocorreu no estado de Minas Gerais em 1998. Aproximadamente 8000 pessoas reuniram-se para celebrar a ordenação de um padre católico. Menos de quatro horas depois, quase 4000 pessoas estavam incapacitadas com intensa náusea, emese, diarreia, dor abdominal, prostração e tontura. Destes, 2000 lotaram os setores de emergência de 26 hospitais regionais. Após a triagem, 396 (20%) foram internados, e destes, 81 (20%) foram admitidos em UTIs. Um total de 16 (20%) dos pacientes de UTI progrediu para um quadro irreversível de choque multi-sistêmico e vieram a óbito. As mortes ocorreram nos idosos e nas crianças menores de 5 anos. Uma investigação detalhada implicou os preparadores dos alimentos que apresentaram cultura positiva para *Staphylococcus aureus* como a fonte de infecção. Além disso, esses alimentos (frango, carne assada, arroz e feijão) ficaram praticamente dois dias e meio sem refrigeração por não haver espaço suficiente para armazená-los até o consumo. A contagem de *Staphylococcus* coagulase e termonuclease positivos nos restos de alimentos foi maior que 2×10^8 UFC/g. Da amostra composta dos alimentos houve a detecção da enterotoxina A por ELISA na concentração de 6 µg/g. Este estudo demonstrou a assoladora toxicidade das enterotoxinas estafilocócicas e a facilidade de transmissão. A letalidade das enterotoxinas estafilocócicas quando ingeridas parece estar relacionada ao estado de saúde e idade, mas como visto neste estudo pode causar casos massivos e incapacitação em um curto período de tempo, inclusive com casos fatais (CARMO et al., 2004).

Almeida Filho e Nader Filho (2000) estudaram o risco de intoxicação alimentar por *S. aureus* pelo consumo de queijo tipo Minas “frescal” produzido artesanalmente, sem a pasteurização prévia do leite utilizado como matéria-prima, e comercializado na cidade de Poços de Caldas - MG. Os resultados evidenciaram a presença de *S. aureus* em 40 (50%) amostras de queijo com contagens médias de 10^5 UFC/g. Esses valores são extremamente preocupantes, pois além de se situarem acima do limite máximo de 10^3 UFC/g estabelecido pelo Ministério da Saúde, mostraram-se muito próximos dos

requeridos ($>10^5$ UFC/g) para a produção de enterotoxinas em quantidades suficientes para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar.

Nesse mesmo estado ocorreram dois surtos, nas cidades de Manhuaçu e Passa-Quatro. O primeiro envolveu 50 indivíduos que adoeceram após ingerirem queijo minas. Os sinais de intoxicação (diarréia, vômito, tontura, calafrios, e dor de cabeça) ocorreram em até duas horas após a ingestão do queijo. O segundo surto envolveu 328 indivíduos, que apresentaram diarréia e vômito após ingerirem leite cru. As análises do primeiro surto mostraram que *S. aureus* estava presente no leite não pasteurizado com contagem de $2,4 \times 10^3$ UFC/g e produziu as enterotoxinas A e B, e presente no queijo com contagem de $1,0 \times 10^5$ a $2,0 \times 10^8$ UFC/g e produziu as enterotoxinas A, B e C. As análises do leite cru do segundo surto indicaram a presença de estafilococos coagulase-negativos, excedendo a contagem de $2,0 \times 10^8$ UFC/g, e a produção das enterotoxinas C e D. As enterotoxinas específicas encontradas nestes dois surtos implicam que a fonte de infecção do primeiro surto foram os manipuladores de alimento e do segundo as vacas com mastite (CARMO et al., 2002).

Um surto ocorrido no Japão demonstrou o impacto da contaminação do leite. Aproximadamente 13.420 pessoas ingeriram produtos derivados do leite manufacturados pela fábrica Osaka City, que utilizou como principal ingrediente leite em pó desnatado elaborado pela fábrica Hokkaido. A enterotoxina A foi detectada no leite desnatado ($\leq 0,38$ ng/mL) e aproximadamente 3,7 ng/g no leite em pó desnatado. O total de enterotoxina A (SEA) ingerida por pessoa foi estimada em aproximadamente 20-100 ng. O surto foi considerado baixo em relação a outros surtos previamente relatados. A SEA exposta a pelo menos duas pasteurizações a 130°C por quatro ou dois segundos reteve tanto as atividades imunológicas quanto biológicas, embora tenha sido parcialmente inativada. O presente surto foi incomum pelo processo térmico ter destruído o estafilococo no leite, mas a SEA ter mantido atividade suficiente para causar intoxicação (ASAO et al., 2003).

E demonstrando que ainda há o hábito de consumo de leite cru, e por crianças, houve o relato de caso de intoxicação alimentar em três crianças suíças 4 horas após ingerirem leite cru de uma cabra com mastite clínica por *S.*

aureus que se apresentava com contagem de 5×10^7 UFC/mL (GIEZENDANNER et al., 2009).

2.9 Métodos diretos de detecção de enterotoxinas nos alimentos

Conforme relatado no item anterior, as intoxicações alimentares pelas enterotoxinas estafilocócicas são frequentes e a sua detecção é importante no estudo epidemiológico. Vários métodos de detecção tem sido desenvolvidos e usados desde a década de 60, incluindo imunodifusão em gel, método de hemaglutinação passiva reversa, aglutinação passiva reversa em látex (RPLA), radioimunoensaio e ensaio imunoenzimático (ELISA). Destes, o RPLA era o mais simples e sensível, mas pouco específico pelas partículas de látex serem sensibilizadas com antisoro não purificado. Em sequência o método foi melhorado quanto à especificidade pela sensibilização das partículas de látex com imunoglobulina anti-SE purificada. Desde então, houve a disponibilidade de kits comerciais, como o SET-RPLA[®] (Oxoid), por exemplo (FUJIKAWA; IGARASHI, 1988).

O método de RPLA tem como vantagens alta especificidade e sensibilidade, simplicidade (não necessita de procedimentos complicados ou equipamentos caros) e economia. A desvantagem do teste é o consumo de tempo (cerca de 16 horas de incubação). Alguns cuidados devem ser tomados quanto à ocorrência de reações inespecíficas de alguns materiais com as partículas de látex sensibilizadas. Isso pode ser visualizado com a aglutinação concomitante do látex controle (sem nenhum antisoro incorporado, somente látex). Para a minimização desta reação inespecífica é necessário o preparo do sobrenadante obtido da amostra de forma que fique o mais claro possível, removendo qualquer material que possa interferir, tal como partículas de amido e lipídeos. Deve-se realizar centrifugação refrigerada para auxiliar nesse processo, e em amostras como queijo, por exemplo, pode-se fazer um tratamento com éter (FUJIKAWA; IGARASHI, 1988).

Este método fornece leituras semi-quantitativas, graduando as reações em \pm , 1+, 2+ e 3+. Porém, com a utilização de um controle positivo diluído em série, como referência, é possível estimar a concentração das enterotoxinas (FUJIKAWA; IGARASHI, 1988).

2.10 Métodos indiretos de detecção de enterotoxinas

A produção dos fatores de virulência pelos microrganismos depende da presença de genes para esses fatores no seu material genético. O mesmo ocorre para as enterotoxinas, reguladas por diversos genes, que são frequentemente transportados por elementos genéticos, tais como fagos e ilhas de patogenicidade. São segmentos de DNA com diferentes tamanhos e potencialmente móveis que codificam genes relacionados à virulência e são transferidos horizontalmente entre as estirpes (VASCONCELOS; CUNHA, 2010). O número de genes associados à virulência carregados por uma estirpe bacteriana é o produto da interação entre as taxas de aquisição de genes, o custo para a manutenção biológica e a taxa de falha da estirpe em causar a doença (PEACOCK et al., 2002).

O gene da enterotoxina estafilocócica A está localizado nos profagos, das enterotoxinas B e C estão localizados nas ilhas de patogenicidade e o gene da enterotoxina D é encontrado em plasmídeo pIB485 (VASCONCELOS; CUNHA, 2010).

Com a PCR é possível detectar a presença desses genes nas bactérias pelo uso de primers, como os descritos por Johnson et al. (1991) que são capazes de detectar de 1 pg de DNA para *seb* e 10 pg para *sea*, *sec* e *sed*. Essa presença não indica que há a produção ativa de enterotoxinas, mas sim o potencial genético da estirpe.

Para se detectar a produção por métodos genéticos é possível pesquisar a presença de sequências de RNAm, comprovando a atividade do gene, pela técnica de RT-PCR (VASCONCELOS; CUNHA, 2010).

*O*bjetivos

3. OBJETIVOS

Geral

1. Avaliar o perfil dos produtores da região considerando-se a atual legislação e a qualidade do leite produzido com ênfase na presença de *Staphylococcus enterotoxigênicos*.

Específicos

1. Determinar o perfil dos produtores por meio da coleta de informações sobre o rebanho e manejo;
2. Padronizar e avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) na detecção de *S. aureus* e dos genes codificadores das enterotoxinas A, B, C e D (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*, respectivamente) diretamente do leite bovino de tanques;
3. Comparar a detecção de *S. aureus* pela técnica de PCR com a detecção pelos métodos tradicionais de isolamento e classificação bioquímica, no momento inicial e após 5 horas (refrigerado e a 25°C);
4. Padronizar a detecção e quantificação das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D pela técnica de RPLA direto do leite bovino de tanques;
5. Comparar a detecção genotípica (PCR) dos genes codificadores de enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, com a detecção fenotípica pela técnica RPLA, no momento inicial e após 5 horas (refrigerado e a 25°C).

***M*aterial e Métodos**

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção das propriedades

Foram colhidas amostras de leite de tanque de 71 propriedades leiteiras pertencentes a quatro linhas de leite de um laticínio da região de Botucatu-SP, acompanhando-se todo o trajeto dos caminhões de coleta a granel, para triagem inicial das propriedades que apresentassem *S. aureus* no leite do tanque. Foram selecionadas 35 propriedades, que abrangeram os municípios de Botucatu, Pardinho, Pratânia, Itatinga, Torre de Pedra, Bofete, Porangaba, Cesário Lange e Quadra, e uma propriedade na região de Campinas, município de Nova Odessa, e que armazenavam o leite em tanque de imersão ou de expansão individual. As identificações das propriedades escolhidas foram nº 4, 12, 16, 19, 20, 24, 25, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 44, 45, 49, 50, 51, 53, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 66, 67, 69, 70, 71 e 72. Uma das propriedades possuía tanque de expansão comunitário (identificação nº 16) e foi mantida no estudo para comparação de resultados com os demais tanques. Foram realizadas três coletas em cada uma das propriedades, exceto na nº 71 por ter saído da linha do laticínio após a segunda coleta, totalizando a avaliação de 90 amostras de leite de tanque de expansão e 14 de tanque de imersão.

4.2 Determinação do perfil dos produtores

Na primeira visita foi aplicado questionário aos produtores para verificar o tamanho do rebanho e o tipo de manejo realizado (Anexo 1). Além disso, foram anotados os dados de contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS) fornecidos pelo laticínio, do exame mensal, realizado na Clínica do Leite – Esalq/USP, referentes aos meses das coletas do projeto.

4.3 Colheita das amostras

Foram colhidas 104 amostras de 250 mL de leite de tanques (leite total) que foram acondicionadas em frascos estéreis, e encaminhadas ao laboratório do Núcleo de Pesquisa em Mastites - NUPEMAS, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu,

SP em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável. Essas coletas ocorreram no período de 19/06/2008 a 28/02/2009.

No laboratório as amostras foram processadas a fresco (momento 0), e em seguida, foram divididas em duas alíquotas para incubação por cinco horas, uma alíquota refrigerada a 7°C (M7) e a outra mantida a 25°C (M25). O tempo inicial de cinco horas foi definido considerando-se que esse é o tempo médio de exposição do leite nas propriedades sem tanque de refrigeração do momento da ordenha até o transporte ao laticínio. Amostras desses três momentos foram congeladas a -20°C em microtubo livre de DNase e RNase para realização da PCR e em tubo falcon estéril de 15 mL para detecção das enterotoxinas. As amostras foram armazenadas e processadas no Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP.

4.4 Consentimento (Ética)

As amostras foram colhidas após esclarecimento para o responsável da propriedade sobre o projeto e assinatura de termo autorizando a colheita de leite.

Foi solicitada autorização ao Fiscal Agropecuário responsável pelo laticínio para realização da pesquisa nos tanques.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal, protocolo número 13/2007-CEEA.

4.5 Exame microbiológico: isolamento de *Staphylococcus* spp.

As 104 amostras de leite colhidas foram processadas imediatamente após chegarem ao laboratório. Para a contagem de UFC foram cultivados 0,1 mL de cada amostra de leite (momento 0 – M0), após incubação por cinco horas sob refrigeração a 7°C (M7) e a 25°C (M25), e suas respectivas diluições, em placas contendo 20 mL de agar Baird-Parker, espalhando-se o inóculo com o auxílio de alça de Drigalski estéril. Todas as amostras foram diluídas a 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} e nas amostras incubadas a 25°C foi realizada diluição adicional 10^{-4} em virtude do aumento na contagem e maior dificuldade de visualização.

As amostras foram incubadas em condições de aerobiose à temperatura de 37°C por até 72 horas, com observação do desenvolvimento microbiano a cada 24 horas, bem como contagem das colônias.

4.5.1 Caracterização e contagem dos isolados de *S. aureus*

Utilizou-se a placa cuja diluição permitiu visualizar e isolar as colônias de interesse. Fez-se a contagem de colônias típicas e atípicas segundo os critérios estabelecidos por Silva et al. (1997).

Selecionaram-se de 5 a 10 colônias de cada padrão (típico e atípico) para submeter aos testes bioquímicos para classificação dos *S. aureus*. Se houvesse menos que cinco colônias, selecionavam-se todas disponíveis. Cada colônia submetida à caracterização foi reisolada em agar sangue ovino, identificada pelos aspectos morfológicos, coloração pelo método de Gram, provas de catalase, coagulase em tubo, fermentação da trealose, da maltose e do manitol, resistência à polimixina B (300 UI) e produção de acetoina, conforme observado no quadro abaixo:

QUADRO 3. Características observadas para classificação das espécies de estafilococos coagulase positivos. Botucatu, 2010.

Espécie	Características					
	Coagulase	Trealose	Maltose	Manitol	Polimixina B	Acetoína
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	R	+
<i>S. delphini</i>	+	-	+	+ ^{sl}	NA	-
<i>S. intermedius</i>	+	+	v ⁺	v ^{sl}	S	-
<i>S. hyicus</i>	v	+	-	-	R	-
<i>S. schleiferi</i> spp <i>coagulans</i>	+	-	-	v	NA	+

v = variável; sl = reação lenta, v⁺ = variável, mas quando positiva a reação é fraca, NA = não avaliado
Fonte: Modificado de KONEMAN, 2008

A prova de coagulase em tubo foi realizada com 250 µL de plasma de coelho adicionado de 500 µL de caldo BHI turvo com a colônia em 24 horas. A incubação foi realizada a 37°C e as leituras foram procedidas após 1, 4 e 24 horas.

A fermentação de açúcares foi observada pela adição de uma alçada de caldo BHI turvo em 24 horas em cada um dos tubos com os açúcares. A incubação foi realizada a 37°C, com leituras após 24, 48, 72 e 96 horas.

Considerou-se como reação positiva aquelas com viragem da cor do indicador de pH vermelho fenol, passando de vermelho para amarelo.

A resistência à polimixina B foi verificada em placa contendo o meio de Mueller Hinton, utilizando-se solução salina turvada com caldo BHI de 24 horas até atingir a escala 0,5 de MacFarland. Utilizou-se disco impregnado com polimixina B (300 UI) e a leitura foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C.

A produção de acetoína foi verificada com a adição de 100 µL de caldo BHI de 24 horas em 2,5 mL de meio M.R.V.P (Methyl-red e Voges-Proskauer). Os tubos foram incubados por cinco dias a 37°C. Um mililitro do M.R.V.P. turvo foi transferido para tubo limpo e foi acrescentado 0,6 mL de α-naftol a 5%. Em seguida, foi adicionado 0,2 mL de hidróxido de potássio a 40% e a solução homogeneizada, permanecendo por até 15 minutos, sob agitação intermitente, para leitura final. Isolados produtores de acetoína apresentaram formação de um anel róseo (MAC FADDIN, 2000).

Após a confirmação de cada colônia como *S. aureus* pelas provas bioquímicas, calculou-se a sua contagem (UFC/mL) em cada amostra de leite, de acordo com Silva et al. (1997):

- Quando há somente colônias típicas

$$\text{UFC/mL} = \text{N}^\circ \text{ de colônias típicas} \times \text{diluição} \times 10 \times \text{porcentagem de colônias confirmadas}$$

Ex.: Diluição 10^{-2} , 30 colônias típicas, 5 submetidas a confirmação, 3 confirmadas (60%)

$$\text{UFC/mL} = 30 \times 10^2 \times 10 \times 0,6 = 1,8 \times 10^4$$

- Quando há somente colônias atípicas

$$\text{UFC/mL} = \text{N}^\circ \text{ de colônias atípicas} \times \text{diluição} \times 10 \times \text{porcentagem de colônias confirmadas}$$

- Quando há colônias típicas e atípicas

$$\text{UFC/mL} =$$

$$(\text{N}^\circ \text{ de colônias típicas} \times \text{diluição} \times 10 \times \text{porcentagem de colônias confirmadas}) + (\text{N}^\circ \text{ de colônias atípicas} \times \text{diluição} \times 10 \times \text{porcentagem de colônias confirmadas})$$

Ex.: Diluição 10^{-2} , 20 colônias típicas e 10 atípicas, 5 típicas e 5 atípicas submetidas a confirmação, 5 típicas confirmadas (100%) e 2 atípicas confirmadas (40%)

$$\text{UFC/mL} = (20 \times 10^2 \times 10 \times 1,0) + (10 \times 10^2 \times 10 \times 0,4) = 2,4 \times 10^4$$

4.5.2 Meios de cultura e testes bioquímicos utilizados no isolamento e identificação de *S. aureus*

O agar Baird-Parker foi preparado a partir do Baird-Parker agar Base (Código: CM0275) conforme instrução do fabricante (Oxoid[®]), adicionando-se 50 mL de gema de ovo com telurito (Newprov[®]).

Os açúcares foram preparados em caldo de vermelho fenol a partir do Phenol Red Broth Base (BD[®], Código: 211506) adicionado de 1% do açúcar correspondente e distribuídos nos tubos no volume de 3 mL.

A produção de acetoina foi verificada com o meio M.R.V.P preparado com o M.R.V.P. medium (Código: CM0043) conforme instrução do fabricante (Oxoid[®]) e distribuído em tubos no volume de 2,5 mL. Os reagentes preparados foram os reagentes VP de Barritt (MAC FADDIN, 2000):

Reagente A: 5% de α -naftol (Vetec[®]) em álcool etílico absoluto (etanol)

Reagente B: 40% de hidróxido de potássio (KOH)

4.6 Estudo biomolecular

4.6.1 Detecção genotípica de *S. aureus* e dos genes codificadores de enterotoxinas diretamente do leite

4.6.1.1 Extração de DNA

A extração de DNA do leite foi realizada com o kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin[®] (GE Healthcare), de acordo com o seguinte protocolo, com uma modificação inicial do proposto pelo fabricante:

1. Em um microtubo de 1,5 mL, adicionou-se 900 μ L da amostra de leite.
2. Centrifugou-se a 14.000 g por 2 minutos.
3. Eliminou-se o sobredanante por inversão, deixando o pellet. Retirou-se a gordura da parede do tubo com auxílio de suabe estéril (individual).
4. Adicionou-se ao pellet 40 μ L de tampão lisozima, homogeneizando-se imediatamente em vortex.

5. Adicionou-se 10 µL da lisozima (10 mg/mL) e homogeneizou-se em vortex.
6. Incubou-se à temperatura ambiente por 15 minutos, agitando-se ocasionalmente.
7. Adicionou-se 10 µL da proteinase K (20 mg/mL), homogeneizando-se em vortex.
8. Incubou-se a 56°C por 15 minutos a 30 minutos, agitando-se ocasionalmente, até a dissolução do pellet.

A partir dessa fase seguiu-se as instruções do kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin no item “Hemólise das células”.

9. Adicionou-se 400 µl de *Lysis Solution* no microtubo, homogeneizando-se por 15 segundos em vortex.
10. Incubou-se o microtubo sob temperatura ambiente por 10 minutos com homogeneização intermitente para lise adicional.
11. Centrifugou-se rapidamente (5000 g/1 minuto) para decantação das amostras.
12. Montou-se uma minicoluna sobre o tudo de coleta fornecido. Usaram-se colunas individuais descartáveis para amostras individuais.
13. Transferiu-se o lisado completo para a coluna com o auxílio de uma pipeta e centrifugou-se a 11.000 g por 1 minuto.
14. Removeu-se cuidadosamente o tubo de coleta contendo o líquido, sem tocar a base da coluna, descartando-se o líquido, e retornou-se a coluna sobre o tubo de coleta.

Para uma primeira lavagem adicionou-se 500 µl de *Lysis Solution* na coluna e centrifugou-se a 11.000 g por 1 minuto, descartando-se o líquido, para garantir a completa lise das células e a desnaturação de proteínas residuais.

Procedeu-se uma segunda lavagem adicionando-se 500 µl de *Wash Buffer* à coluna e centrifugou-se a 11.000 g por 3 minutos, descartando-se o tubo de coleta com o líquido.

Nesta fase, tomou-se o cuidado de não deixar resíduos da solução de lavagem (etanólica) na coluna. No caso de resíduo, descartou-se o líquido remanescente e centrifugou-se por mais 1 minuto. Desta forma, o DNA preso à matriz de sílica está altamente puro e pronto para eluição.

A eluição foi procedida transferindo-se a coluna de purificação para um microtubo novo. A seguir adicionou-se 100 µl de *Elution Buffer* pré-aquecido a 70°C diretamente na coluna e incubou-se a mesma por 1 minuto em temperatura ambiente. Em seguida centrifugou-se a 11.000 g por 1 minuto para recuperar o DNA.

4.6.1.2 Amplificação do DNA

Os primers para detecção de *S. aureus* foram escolhidos de acordo com os resultados de Straub et al. (1999) com as características descritas na Tabela 1 e amplificam fragmento conservado de 1250 pb do DNA ribossomal.

TABELA 1. Sequência das bases e tamanho do produto amplificado pelos primers *S. aureus*-específicos

Primer	Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
Staur4	ACGGAGTTACAAAGGACGAC	1250
Staur6	AGCTCAGCCTTAACGAGTAC	

Fonte: STRAUB et al., 1999

Os parâmetros do termociclador foram: 94°C por 4 minutos, desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 64°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos. Repetição do ciclo por 35 vezes e extensão final a 72°C por 10 minutos (KUMAR, 2009).

Foram utilizados os primers específicos para os genes codificadores de cada enterotoxina, *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, de acordo com Johnson et al. (1991). As enterotoxinas estudadas foram A, B, C e D, respectivamente, de acordo com a Tabela 2.

TABELA 2. Sequência das bases, localização dentro dos genes, e tamanhos detectados dos produtos amplificados pelos primers enterotoxina-específicos

Gene	Primer	Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3')	Localização dentro do gene	Tamanho do produto amplificado (pb)
<i>sea</i>	SEA-1	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	490-509	120
	SEA-2	GAACCTTCCCATCAAAAACA	591-610	
<i>seb</i>	SEB-1	TCGCATCAAACGACAAACG	634-653	478
	SEB-2	GCAGGTACTCTATAAGTGCC	1091-1110	
<i>sec</i>	SEC-1	GACATAAAAGCTAGGAATTT	676-695	257
	SEC-2	AAATCGGATTAACATTATCC	913-932	
<i>sed</i>	SED-1	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	354-373	317
	SED-2	TAATGCTATATCTTATAGGG	652-671	

Fonte: JOHNSON et al., 1991

Os parâmetros da amplificação dos genes codificadores das enterotoxinas preconizados por Cunha et al. (2007) foram modificados para as condições do laboratório e do estudo:

SEA-1/SEA-2 - 94°C por 4 minutos, desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 51°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 53°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Repetição do último ciclo por 35 vezes e extensão final a 72°C por 7 minutos.

SEB-1/SEB-2 - 94°C por 4 minutos, desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 55,5°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Repetição do ciclo por 37 vezes e extensão final a 72°C por 7 minutos.

SEC-1/SEC-2 - 94°C por 4 minutos, desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 52,4°C por 2 minutos, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Repetição do ciclo por 37 vezes e extensão final a 72°C por 7 minutos.

SED-1/SED-2 - 94°C por 4 minutos, desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 55°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 53°C por 2

minutos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 51°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Repetição do último ciclo por 37 vezes e extensão final a 72°C por 7 minutos.

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volume total de 25µl, contendo 5 pmol de cada primer (Tabelas 1 e 2), 1,25U de Platinum[®] Taq DNA polimerase, 200 µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, PCR buffer 1x, 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µl da amostra. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo pela substituição do ácido nucléico por água Milli Q.

4.6.1.3 Eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos amplificados da PCR

Foi preparado gel de agarose a 2% em tampão TBE 1,0x e adicionado o corante SYBER[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen[®]) na concentração de 1ul/10 mL de gel. Foram utilizados 15 µl do DNA amplificado e 2 µl do marcador de peso molecular de 100pb (GE[®]). Para todas as amostras foi acrescentado 2 µl de tampão de corrida. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 0,5x a 110V. O gel foi fotografado sob transiluminação UV.

4.6.1.4 Determinação do limiar de detecção da técnica de PCR

4.6.1.4.1 Obtenção do inóculo

O inóculo foi obtido pelo cultivo das cepas padrão de *S. aureus* em agar sangue a 8% e incubação a 37°C por 48 horas. Como cepa padrão dos genes *sea* e *sed* foi utilizada a ATCC 13565, do gene *seb* a ATCC 14458 e do gene *sec* a ATCC 19095. As colônias foram transferidas com auxílio de alça para um microtubo contendo 1 mL de água Milli Q, até se conseguir uma turvação correspondente ao valor 1,0 da escala de MacFarland.

4.6.1.4.2 Extração de DNA a partir de água Milli Q contaminada

Para a extração do DNA a partir da água Milli Q contaminada, procedeu-se como descrito no item 4.6.1.1. com algumas pequenas modificações, pois o volume é menor e não há gordura como interferente:

1. Em um microtubo de 1,5 mL, adicionou-se 200 μL de água Milli Q contaminada.
2. Centrifugou-se a 10.000 g por 1 minuto.
3. Eliminou-se o sobrenadante por inversão, deixando o pellet.

A partir dessa fase procedeu-se como descrito no item 4.6.1.1., subitem 4. Na fase de eluição utilizou-se 200 μL de *Elution Buffer* ao invés de 100 μL .

4.6.1.4.3 Quantificação de DNA

A quantificação foi realizada em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare[®]) após duas calibrações com 2 μL de água Milli Q (branco).

Foram colocados 5 μL do DNA extraído. De acordo com a leitura em $\text{ng}/\mu\text{L}$, foi feita uma diluição em um microtubo de 1,5 mL com água Milli Q para acertar a concentração em $1\text{ng}/\mu\text{L}$.

Foram preparados 5 microtubos contendo cada um 90 μL de água Milli Q.

Da amostra contendo $1\text{ng}/\mu\text{L}$ retirou-se 10 μL que foram diluídos em 90 μL de água Milli Q contido no primeiro microtubo. A partir dele foram feitas diluições sucessivas, em base 10, nos demais.

Desta forma, obteve-se as concentrações de DNA de $1\text{ng}/\mu\text{L}$, $100\text{pg}/\mu\text{L}$, $10\text{pg}/\mu\text{L}$, $1\text{pg}/\mu\text{L}$, $100\text{fg}/\mu\text{L}$, $10\text{fg}/\mu\text{L}$.

Foram realizadas as PCR com os primers de cada gene, de acordo com a cepa padrão correspondente, utilizando-se 3 μL de DNA de cada uma das 6 diluições.

4.7 Detecção e quantificação de enterotoxinas estafilocócicas pelo Método de Aglutinação em Látex (RPLA) diretamente do leite

4.7.1 Extração de enterotoxinas

O protocolo de separação da gordura e filtração do leite para a extração de enterotoxinas foi padronizado da seguinte forma:

1. Acrescentou-se 5 mL de leite em tubo de centrífuga tipo falcon de 15 mL
2. Centrifugou-se a 12.800 g por 15 minutos a 4°C
3. Com uma ponteira de 1000 μL transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo

4. Acrescentou-se sobre o sobrenadante clorofórmio P.A. na proporção 1:1
5. Homogeneizou-se e centrifugou a 12.800 g por 15 minutos a 4°C
6. Nessa etapa são formadas três fases, a superior com o sobrenadante, a fase intermediária com a gordura e a fase inferior com o clorofórmio. Retirou-se o sobrenadante, sem encostar na gordura, com agulha e seringa de 5 mL descartáveis
7. Filtrou-se o sobrenadante com filtro para seringa com membrana de 0,22 µm de poro para um microtubo
8. Diluiu-se com o diluente do kit SET-RPLA na proporção 1:10
9. Esse sobrenadante diluído foi utilizado na detecção e quantificação das enterotoxinas e armazenado a -20°C.

A utilização do clorofórmio foi sugerida por Carmo¹ (comunicação pessoal, 04 de março de 2010) e o uso desse tipo de solvente é relatado na literatura (PHILLIPS et al., 2008) para a extração de gordura total em alimentos.

4.7.2 Triagem das amostras

Em todas as amostras foi realizada uma triagem inicial para detecção das enterotoxinas A, B, C e D. Na detecção das enterotoxinas utilizou-se o kit SET-RPLA (Oxoid[®]), conforme orientação do fabricante.

Utilizou-se uma microplaca de fundo em “V”, na qual era possível testar 12 amostras ao mesmo tempo (da coluna 1 a 12 da placa) para os quatro anticorpos (anti-A na linha A, anti-B na linha B, anti-C na linha C e anti-D na linha D) e para o látex controle (somente látex, para controle de reações inespecíficas, na linha E). Na linha G colocaram-se os quatro controles positivos das enterotoxinas.

4.7.3 Quantificação das amostras

A quantificação foi realizada comparando-se a intensidade de reação do sobrenadante com a da toxina padrão de TSST-1.

¹ Dr. Luiz Simeão do Carmo

4.8 Análise Estatística

As associações foram realizadas por meio dos testes não-paramétricos de Mann-Whitney (Tabela 6 e Tabela 25), Kruskal-Wallis (Tabela 9 e Tabela 11) e Friedman (Tabela 12). O teste de Kruskal-Wallis utilizou análise de variância não paramétrica para o modelo com um fator complementada com o método de Dunn para as comparações entre todos pares de grupos, considerando o nível de 5% de significância (ZAR, 1999).

Nas Tabelas 18 e 20 foi utilizado o teste de Goodman para contrastes entre e dentro de populações binomiais (GOODMAN, 1964; GOODMAN, 1965).

Para todas as associações foram considerados significativos os valores $p < 0,05$.

A análise estatística foi realizada pelo Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências – UNESP/Botucatu.

*R*esultados

5. RESULTADOS

5.1 Perfil dos produtores

Com base nas informações obtidas nas três coletas de cada propriedade (exceto da propriedade nº 71, devido ao produtor ter saído da linha do laticínio após a segunda coleta) foi realizada uma análise descritiva do número de animais, produção diária da propriedade, valores de produção média (L/vaca/dia), CCS (células/mL) e CBT (UFC/mL) como pode ser observado nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Medidas descritivas das variáveis quantitativas. Botucatu, 2010.

Medida descritiva	Total de vacas	Vacas em lactação	Vacas secas	Produção diária (L)/Propriedade
Mínimo	5	3	0	10
Mediana	35	19	12	136
Máximo	170	111	59	3632,8
Média	43,9	27,4	16,4	303,8
Desvio Padrão	32,0	23,2	13,0	592,9

Encontrou-se uma grande variação entre as propriedades quanto à média da produção diária de leite por vaca (CV = 68,89%), a CCS do tanque (CV = 78,30%) e principalmente a CBT do tanque (174,4%). A produção de leite da maioria dos animais foi baixa, média de 8,42 litros, variando de 1,88 a 35,99 litros por dia (Tabela 4).

TABELA 4. Medidas descritivas das variáveis quantitativas. Botucatu, 2010.

Medida descritiva	Produção Média (L/vaca/dia)	CCS (células/mL)	CBT (UFC/mL)
Valor mínimo	1,88	4000,0	4000,0
P1*	2,00	86000,0	5000,0
P5	2,61	141000,0	19000,0
P10	2,86	161000,0	10000,0
P25	4,50	235000,0	55000,0
P50	7,22	365000,0	179000,0
P75	10,22	591000,0	958000,0
P90	14,22	811000,0	3990000,0
P95	18,00	1033000,0	5327000,0
P99	30,19	1700000,0	7519000,0
Valor Máximo	35,99	2586000,0	9999000,0
Média	8,42	468227,7	1099773,0
Desvio padrão	5,80	366627,1	1918230,0
Coeficiente de Variação (%)	68,89	78,30	174,4

P* = percentil

Das 35 propriedades estudadas, 11 (31,4%) apresentaram CCS acima do limite determinado pelo MAPA em alguma das coletas, atingindo o valor máximo de 2.586.000 células/mL (Tabela 4 e Figura 2). Quanto à CBT, um número ainda maior de propriedades (57,1%) apresentou um valor de CBT acima do permitido, atingindo o valor máximo de 9.999.000 UFC/mL (Tabela 4 e Figura 3).

O tanque comunitário que faz parte do presente estudo apresentou CCS de 269.000 células/mL, 293.000 células/mL e 247.000 células/mL e os valores de CBT foram 586.000 UFC/mL, 793.000 UFC/mL e 3.399.000 UFC/mL na primeira, segunda e terceira coletas, respectivamente (Figuras 2 e 3).

Nas Figuras 2 e 3 pode-se avaliar os resultados das análises de contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT), das amostras de tanque de cada propriedade, obtidos nos meses das coletas.

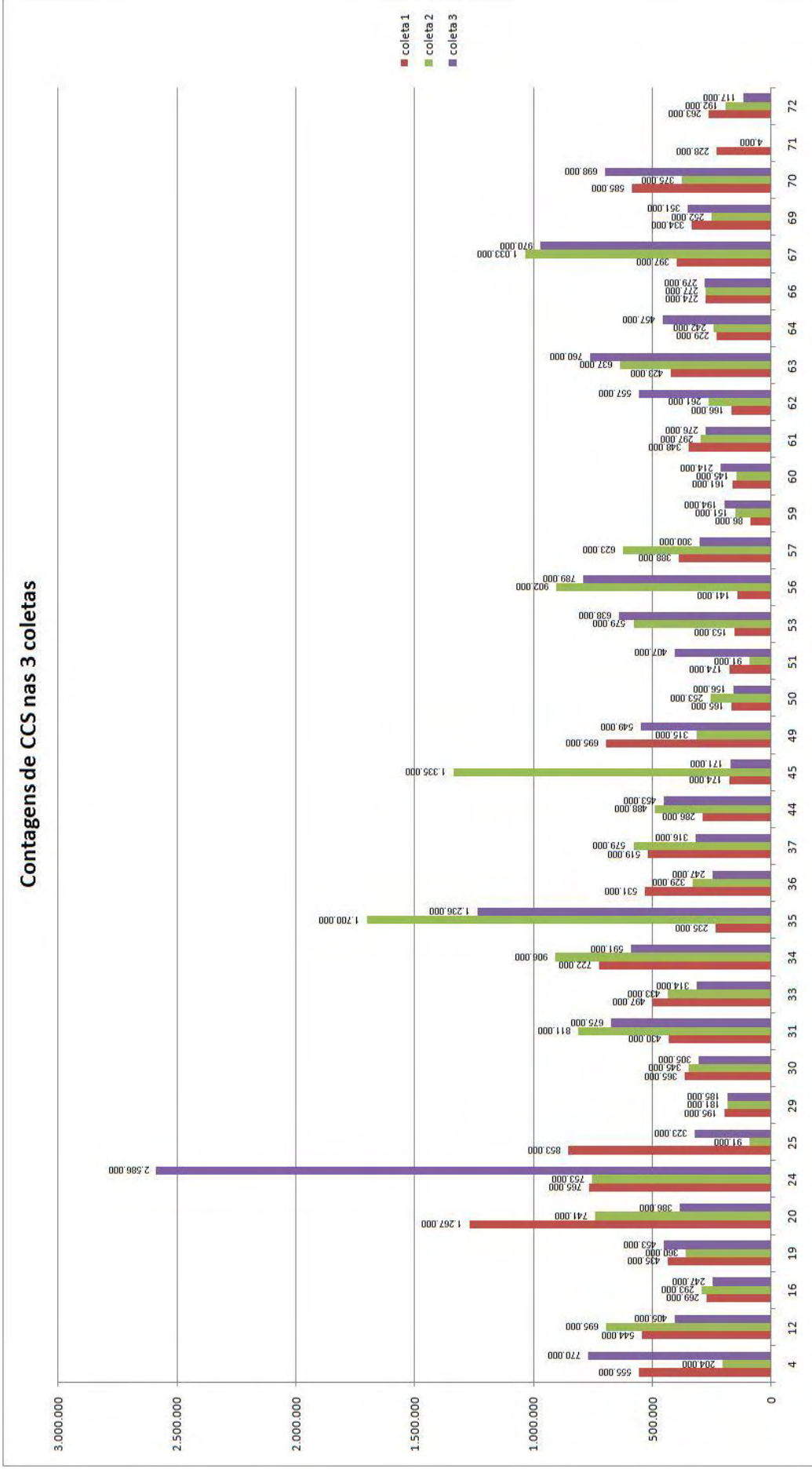


FIGURA 2. Valores de CCS (células/mL) de amostras dos tanques de cada propriedade nos meses das coletas. Botucatu, 2010

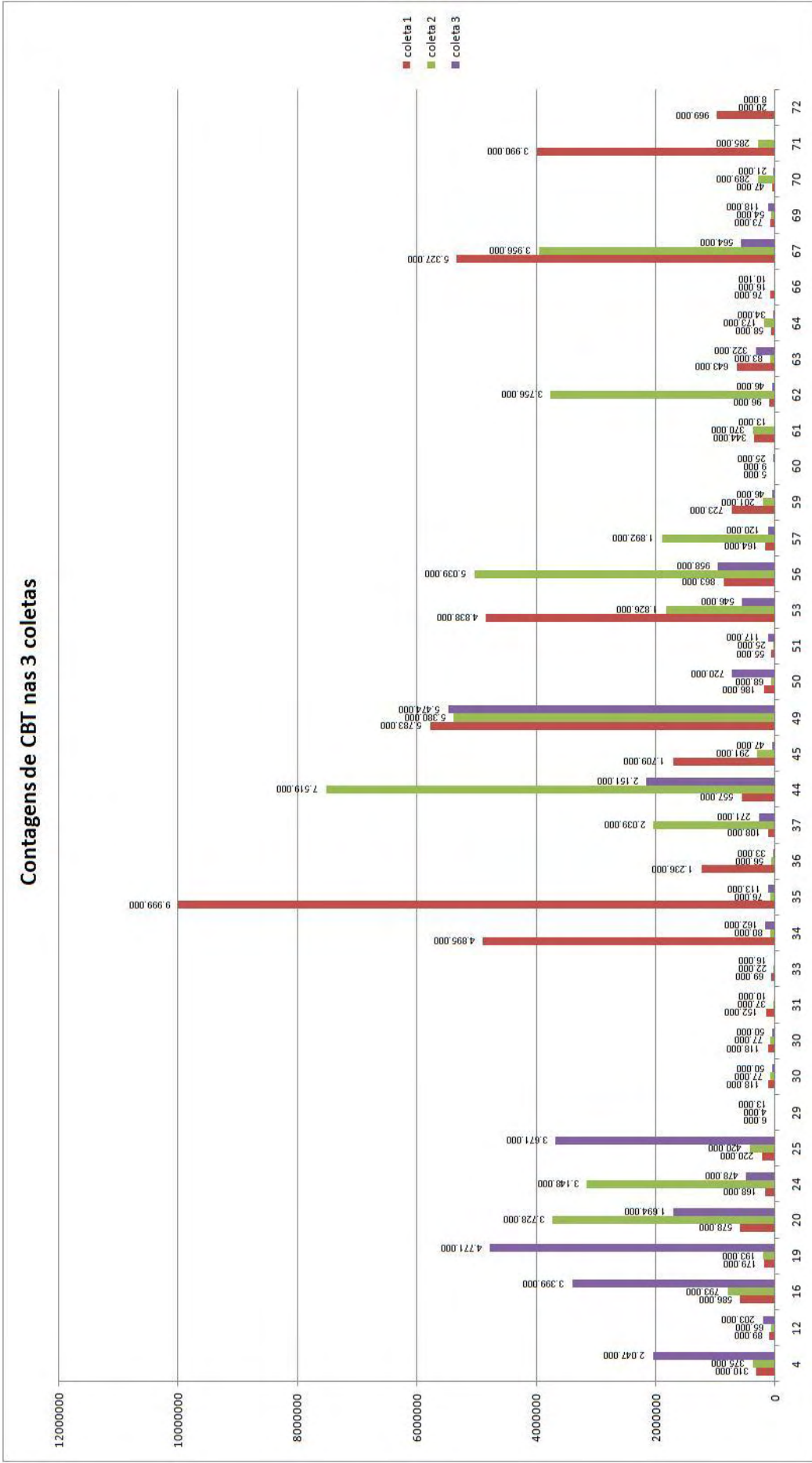


FIGURA 3. Valores de CBT (UFC/mL) de amostras dos tanques de cada propriedade nos meses das coletas. Botucatu, 2010

A maioria das amostras de leite examinadas foram provenientes de tanque de expansão individual (85,29%), seguidas por tanque de imersão (14,71%).

TABELA 5. Distribuição do tipo de tanque utilizado nas propriedades estudadas. Botucatu, 2010.

Tipo de tanque	Frequência	
	Absoluta	Relativa (%)
Expansão individual	29	85,29
Imersão	5	14,71
Total	34	100,00

Na Tabela 6 avaliaram-se as variáveis produção média das vacas, CCS e CBT do tanque, correlacionando-as com o tipo de tanque, expansão individual ou de imersão. Houve diferença significativa ($p < 0,01$) somente entre a mediana da produção de leite nas propriedades com tanque de expansão individual em comparação com as propriedades com tanque de imersão. As propriedades com tanque de expansão individual apresentaram uma produção média diária de leite de 7,50 litros, contra 4,88 litros nas propriedades com tanque de imersão.

TABELA 6. Medidas descritivas das variáveis segundo tipo de tanque utilizado nas propriedades estudadas. Botucatu, 2010.

Variável	Medida descritiva	Tipo de tanque		Valor p
		Expansão individual	Imersão	
Produção média (L/vaca/dia)	Valor mínimo	2,00	1,88	p<0,01
	1° Quartil	5,00	4,00	
	Mediana	7,50	4,88	
	3° Quartil	11,47	6,42	
	Valor máximo	35,97	7,50	
	Média	8,94	5,14	
	Desvio padrão	6,06	1,65	
CCS (céls/mL)	Valor mínimo	86000,0	4000,0	p>0,05
	1° Quartil	252250,0	171000,0	
	Mediana	388000,0	245500,0	
	3° Quartil	589750,0	741000,0	
	Valor máximo	2586000,0	1335000,0	
	Média	472942,5	438928,6	
	Desvio padrão	434991,9	434991,0	
CBT (UFC/mL)	Valor mínimo	4000,0	8000,0	p>0,05
	1° Quartil	54250,0	220000,0	
	Mediana	162000,0	499000,0	
	3° Quartil	722250,0	1709000,0	
	Valor máximo	9999000,0	3990000,0	
	Média	1074105,0	1259286,0	
	Desvio padrão	1985404,0	1481939,0	

Foi possível observar que uma considerável porcentagem (55,88%) de propriedades já possui mecanização da ordenha (Tabela 7).

TABELA 7. Distribuição do tipo de ordenha utilizado nas propriedades estudadas. Botucatu, 2010.

Tipo de ordenha	Frequência	
	Absoluta	Relativa (%)
Manual	15	44,12
Mecânica	18	52,94
Manual e mecânica	1	2,94
Total	34	100,00

Apenas 17,65% das propriedades realizam todos os procedimentos necessários para uma ordenha higiênica e controle de mastites e 23,53% não realiza preparo algum (Tabela 8).

TABELA 8: Distribuição do tipo de procedimento adotado nas propriedades estudadas. Botucatu, 2010.

Procedimento	Frequência	
	Absoluta	Relativa (%)
Nenhum procedimento	8	23,53
Lavagem dos tetos	3	8,83
Secagem dos tetos	2	5,88
Lavagem e Secagem	5	14,71
Pré-dipping e Secagem	2	5,88
Pré e Pós-dipping	1	2,94
Secagem e Pós-dipping	1	2,94
Lavagem, Pré-dipping e Secagem	1	2,94
Lavagem, Secagem e Terapia VS*	2	5,88
Lavagem, Pré-dipping, Secagem, Pós-dipping	1	2,94
Lavagem, Secagem, Pós-dipping e Terapia da VS	2	5,88
Lavagem, Pré-dipping, Secagem, Pós-dipping e Terapia VS	6	17,65
Total	34	100,00

* Terapia VS = terapia da vaca seca

Da mesma forma avaliaram-se as variáveis produção média das vacas, CCS e CBT do tanque, correlacionando-as com o tipo de ordenha, manual, mecânica ou associação de ordenha manual e mecânica. Houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre a mediana da produção de leite nas propriedades com ordenha mecânica em comparação com as propriedades com ordenha manual e associação de mecânica e manual. As propriedades com ordenha mecânica apresentaram mediana da produção média diária de leite de 10,00 litros, contra 5,00 litros nas propriedades com ordenha manual e 4,17 litros com ordenha manual e mecânica (Tabela 9).

TABELA 9. Medidas descritivas das variáveis segundo o tipo de ordenha utilizado nas propriedades estudadas. Botucatu, 2010.

Variável	Medida descritiva	Tipo de ordenha			Valor p
		Manual	Mecânica	Manual e Mecânica	
Produção média (L/vaca/dia)	Valor mínimo	2,00	3,13	1,88	p<0,01
	1° Quartil	3,30	7,23	2,45	
	Mediana	5,00 ^a	10,00 ^b	4,17 ^a	
	3° Quartil	7,15	13,48	4,48	
	Valor máximo	10,00	35,97	4,58	
	Média	5,29	11,34	3,54	
	Desvio padrão	4,78	6,50	1,46	
CCS (céls/mL)	Valor mínimo	4000,0	86000,0	91000,0	p>0,05
	1° Quartil	201000,0	245750,0	149000,0	
	Mediana	388000,0	351000,0	323000,0	
	3° Quartil	590000,0	602500,0	720500,0	
	Valor máximo	1335000,0	2586000,0	853000,0	
	Média	442111,1	493000,0	422333,3	
	Desvio padrão	291503,9	423538,4	390591,0	
CBT (UFC/mL)	Valor mínimo	8000,0	4000,0	220000,0	p>0,05
	1° Quartil	85000,0	33750,0	270000,0	
	Mediana	271000,0	113000,0	420000,0	
	3° Quartil	1754750,0	578750,0	2858250,0	
	Valor máximo	5783000,0	9999000,0	3671000,0	
	Média	1221845,0	977039,6	1437000,0	
	Desvio padrão	1778501,0	2054403,0	1937284,0	

Quanto à assistência técnica, 17,65% das propriedades não recebem qualquer tipo de suporte, 17,65% recebem assistência comunitária (Casa da Lavoura), 55,88% recebem assistência privada e 8,82% recebem assistência comunitária e privada, concomitantemente (Tabela 10).

TABELA 10. Distribuição do tipo de assistência técnica recebido nas propriedades estudadas. Botucatu, 2010.

Assistência técnica	Frequência	
	Absoluta	Relativa (%)
Nenhuma	6	17,65
Comunitária	6	17,65
Privada	19	55,88
Comunitária e Privada	3	8,82
Total	34	100,00

Por fim, avaliaram-se as variáveis produção média das vacas, CCS e CBT do tanque, correlacionando-as com o tipo de assistência técnica, cuja análise pode ser apreciada na Tabela 11.

Houve diferença significativa entre a mediana da produção de leite nas propriedades com assistência privada em comparação com as propriedades sem assistência técnica ou com assistência técnica comunitária. As propriedades com assistência privada apresentaram mediana da produção média diária de leite de 8,21 litros, contra 5,68 litros nas propriedades sem assistência técnica e 5,88 litros com assistência comunitária. A associação da assistência técnica privada e comunitária demonstrou uma produção de leite maior, mas sem diferença significativa entre as demais.

Na CCS, as propriedades com assistência técnica privada apresentaram uma menor contagem em relação àquelas com assistência comunitária. Já na CBT houve uma menor contagem nas propriedades com assistência técnica privada.

TABELA 11. Medidas descritivas das variáveis segundo o tipo de assistência técnica recebido nas propriedades estudadas. Botucatu, 2010.

Variável	Medida descritiva	Tipo de assistência técnica			Valor p
		Nenhuma	Comunitária*	Privada e Privada	
Produção média (L/vaca/dia)	Valor mínimo	1,88	2,08	2,59	2,61
	1° Quartil	3,54	4,63	5,06	3,71
	Mediana	5,68 ^a	5,88 ^a	8,21 ^b	7,50 ^{ab}
	3° Quartil	7,41	7,84	12,94	8,65
	Valor máximo	12,50	14,22	35,97	8,89
Desvio padrão	Média	5,91	6,60	10,20	6,48
		3,13	3,25	6,89	2,71
CCS (cél/s/mL)	Valor mínimo	91000,0	86000,0	4000,0	204000,0
	1° Quartil	260500,0	315250,0	199750,0	378750,0
	Mediana	533500,0 ^{ab}	549000,0 ^b	297000,0 ^a	453000,0 ^{ab}
	3° Quartil	832000,0	615000,0	487000,0	479250,0
	Valor máximo	1700000,0	906000,0	2586000,0	770000,0
Desvio padrão	Média	634350,0	481421,1	405345,5	451857,2
		457452,8	217375,4	376822,5	169646,1
CBT (UFC/mL)	Valor mínimo	10000,0	21000,0	4000,0	179000,0
	1° Quartil	98000,0	111000,0	27000,0	238500,0
	Mediana	371000,0 ^{ab}	271000,0 ^{ab}	77000,0 ^a	2047000,0 ^b
	3° Quartil	1701000,0	2002250,0	529000,0	4116000,0
	Valor máximo	9999000,0	5783000,0	5327000,0	7159000,0
Desvio padrão	Média	1459400,0	1473947,0	666347,3	2462143,0
		2465307,0	2156116,0	1321782,0	2765553,0

* Entende-se por assistência técnica comunitária a Casa da Lavoura

5.2 Exame microbiológico

5.2.1 Caracterização dos isolados de *S. aureus*

Do cultivo das amostras de leite dos três momentos de estudo 5.303 colônias típicas e atípicas foram contadas, 2.086 foram submetidas aos testes bioquímicos para confirmação e 719 foram confirmadas como *S. aureus* isolados. O melhor tempo de incubação do agar Baird Parker para seleção das colônias típicas e atípicas foi 48 horas.

Durante a análise desses isolados observou-se que algumas características descritas como intrínsecas de *S. aureus* não foram visualizadas

em todas as estirpes. Considerou-se *S. aureus* característico aquele que fosse hemolítico, fermentasse os açúcares trealose, maltose e manitol, fosse resistente à polimixina B e produzisse acetoina, conforme descrito por Koneman (2008).

Dos 719 isolados classificados como *S. aureus*, apenas 420 (58,41%) apresentaram-se característicos. Os demais isolados não foram característicos, conforme observado no quadro abaixo:

QUADRO 4. Distribuição dos isolados não característicos. Botucatu, 2010.

Nº de isolados não característicos	Hemólise	Trealose	Maltose	Manitol	Polimixina B	Acetoina
135 (18,78%)	+	+	+	+	S	+
40 (5,56%)	-	+	+	+	R	+
35 (4,87%)	+	-	+	+	R	+
22(3,06%)	-	+	+	+	S	+
12 (1,67%)	+	+	+	-	R	+
12 (1,67%)	+	+	+	-	S	+
8 (1,11%)	+	-	+	+	S	+
5 (0,70%)	+	+4°d	+	+	S	+
5 (0,70%)	+	-	+	+	R	^{fr} +
4 (0,56%)	+	+	+	+	R	^{fr} +
4 (0,56%)	+	+	+	+	S	^{fr} +
4 (0,56%)	-	+4°d	+	+	R	+
4 (0,56%)	-	-	+	+	R	+
2 (0,28%)	+	+4°d	+	+	R	+
2 (0,28%)	-	+	+	-	R	+
2 (0,28%)	-	+	-	-	R	+
1 (0,14%)	-	+	+4°d	+	R	+
1 (0,14%)	-	+	+	+	S	^{fr} +
1 (0,14%)	-	-	+	+	S	+

R = resistente, S = sensível, fr = reação fraca, 4°d = fermentação somente no 4°d de leitura
Resultado não característico destacado em negrito.

Pelo menos um representante de cada isolado não característico de *S. aureus* foi submetido à PCR para confirmação da espécie pelos primers espécie-específicos Staur-4 e Staur-6. Todos confirmaram como sendo *S. aureus*, apresentando a banda de 1250pb.

5.2.2 Dinâmica da contagem de *S. aureus*

A seguir são apresentados os resultados da dinâmica do desenvolvimento de *S. aureus* nas amostras de leite influenciada pela pré-incubação (Tabela 12).

Após incubação a 25°C (M25) houve um aumento significativo nesta contagem, quando comparada com o momento inicial (M0) e após pré-incubação a 7°C (M7).

TABELA 12. Medidas descritivas da contagem (UFC/mL) de *S. aureus* segundo o momento. Botucatu, 2010.

Medida descritiva	Momento			valor p
	M0	M7	M25	
Valor mínimo	0,0	0,0	0,0	
Mediana	10,0 ^a	25,0 ^a	99,5 ^b	p<0,05
Valor máximo	8000,0	4500,0	496000,0	
Média	318,8	339,3	109117,7	
Desvio padrão	942,4	761,7	51999,8	

M0 = a fresco; M7 = incubação a 7°C por cinco horas; M25 = incubação a 25°C por cinco horas

Pode-se observar também que com as pré-incubações, além de ocorrer uma tendência de aumento nas contagens (Tabela 12), em 6 amostras negativas (sem crescimento) no M0 houve a possibilidade de contagem no M7 e em 8 amostras no M25 (Tabela 13).

TABELA 13. Distribuição dos resultados microbiológicos para *S. aureus* segundo o momento de avaliação. Botucatu, 2010.

Momento	Microbiológico		Total (%)
	Sem crescimento (%)	Com crescimento (%)	
M0	50 (48,1)	54 (51,9)	104 (100,0)
M7	44 (42,3)	60 (57,7)	104 (100,0)
M25	42 (40,4)	62 (59,6)	104 (100,0)

M0 = a fresco; M7 = incubação a 7°C por cinco horas; M25 = incubação a 25°C por cinco horas

Nas Figuras 4 (propriedades de 4 a 33), 5 (propriedades de 34 a 56) e 6 (propriedades de 57 a 72) pode-se observar as contagens de *S. aureus* nos três momentos de avaliação (M0, M7 e M25), nas três coletas. As contagens iguais ou superiores a 10.000 UFC/mL foram atingidas com as incubações a 25°C.

Contagem de *Staphylococcus aureus* em leite de tanque em cada momento - parte 1

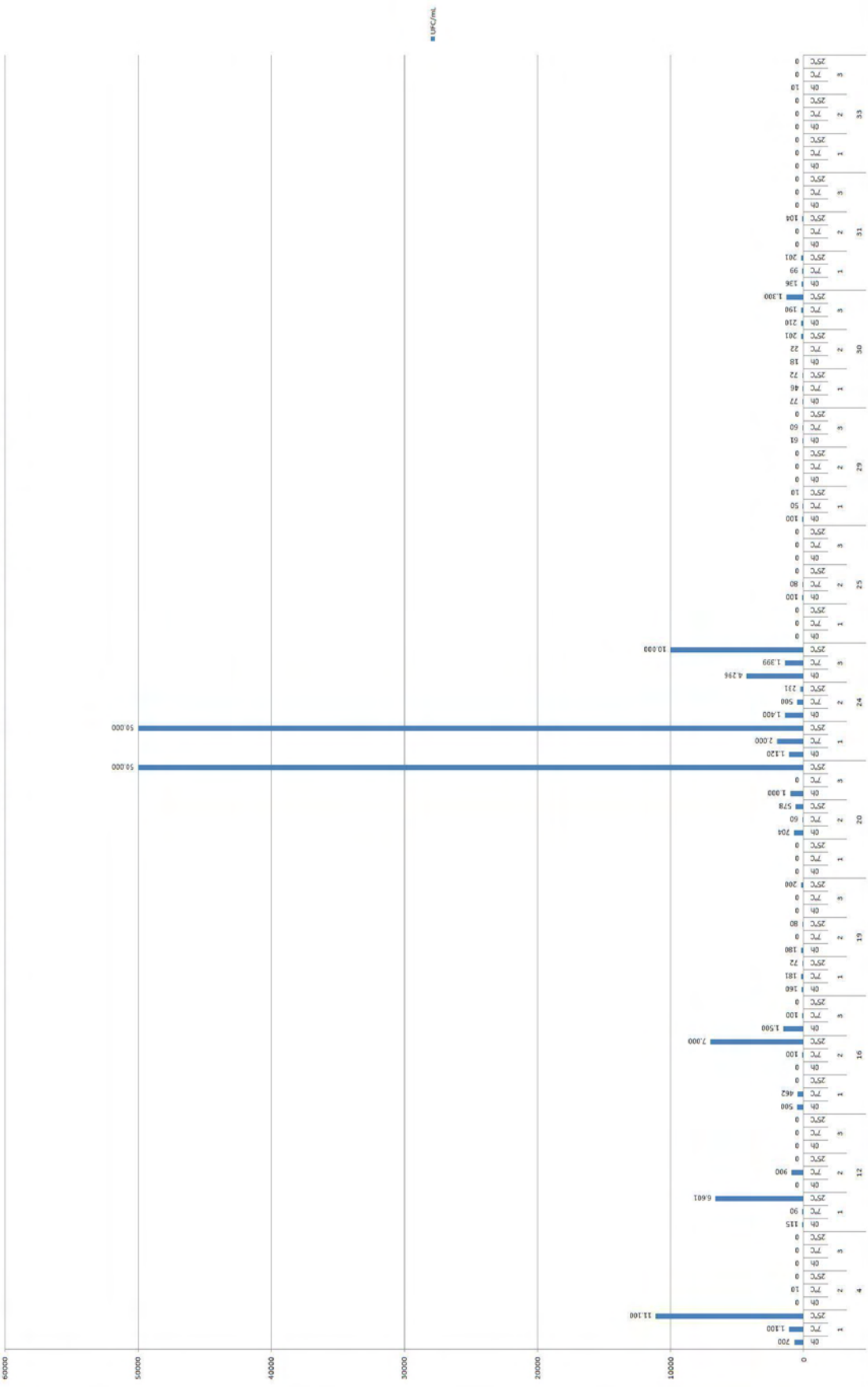


FIGURA 4. Contagens de *Staphylococcus aureus* (UFC/mL) nas propriedades em cada coleta, de acordo com o momento. Propriedades de 4 a 33. Botucatu, 2010.

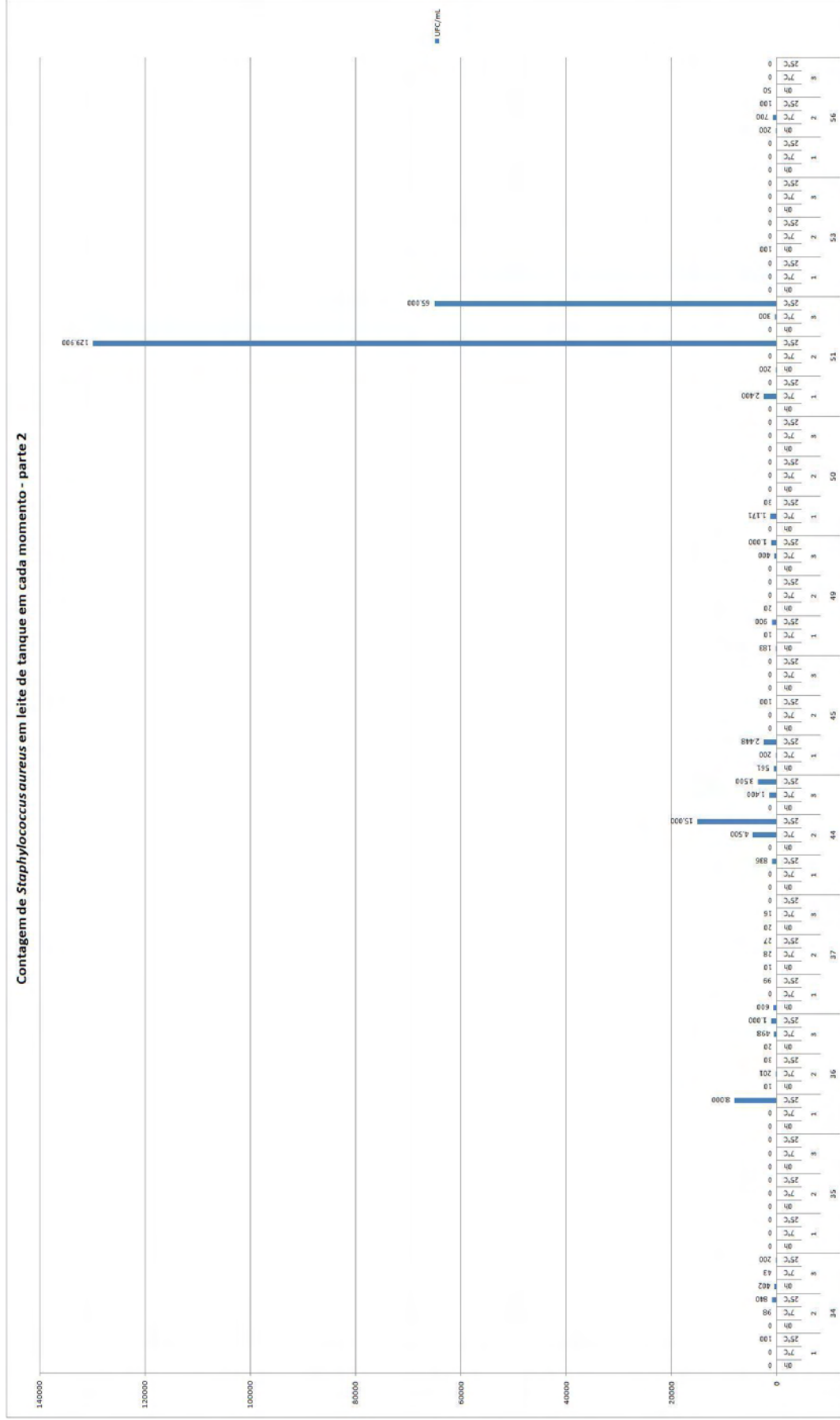


FIGURA 5. Contagens de *Staphylococcus aureus* (UFC/mL) nas propriedades em cada coleta, de acordo com o momento. Propriedades de 34 a 56. Botucatu, 2010.

Contagem de *Staphylococcus aureus* em leite de tanque em cada momento - parte 3

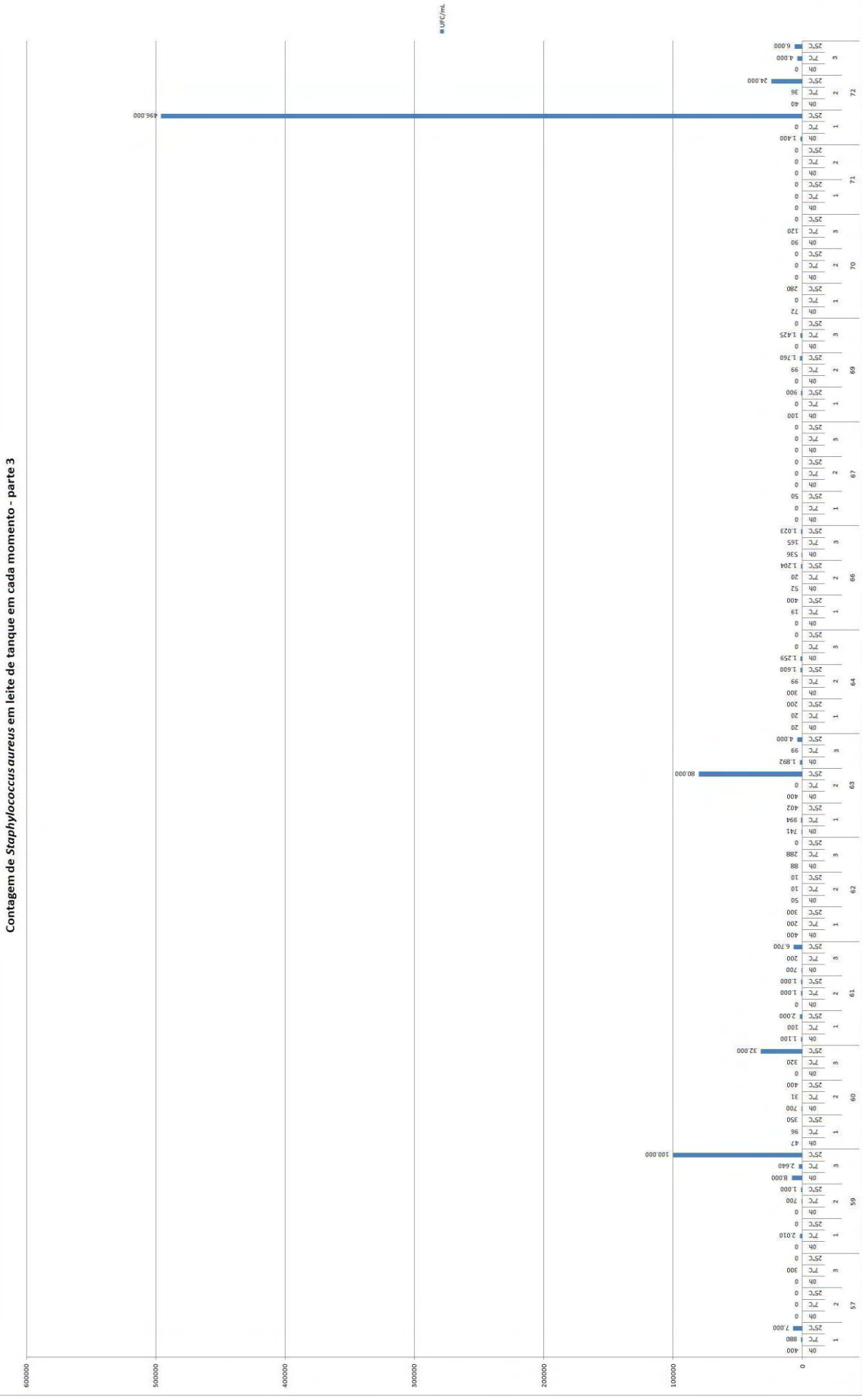


FIGURA 6. Contagens de *Staphylococcus aureus* (UFC/mL) nas propriedades em cada coleta, de acordo com o momento. Propriedades de 57 a 72. Botucatu, 2010.

5.3 Estudo biomolecular

5.3.1 Determinação do limiar de detecção (sensibilidade analítica)

Na detecção de *S. aureus* com primers Staur-4 e Staur-6 o limiar de detecção foi de 1 pg/ μ L.

Para os primers dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* o limiar de detecção foi de 100 fg/ μ L.

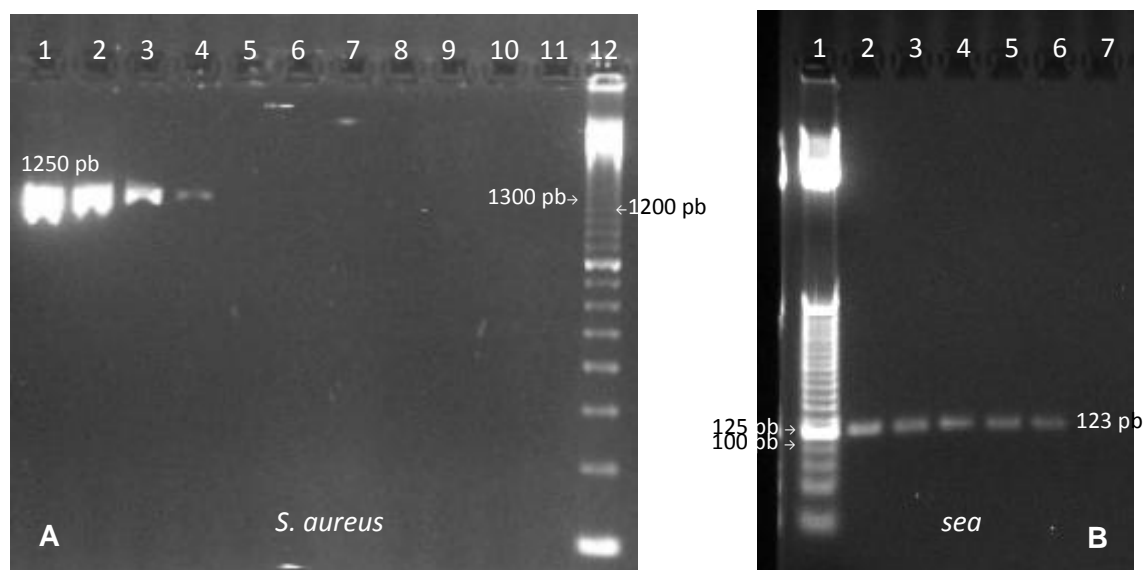


FIGURA 7. Eletroforese em gel de agarose 2%. (A) Limiar de detecção de *S. aureus*. 1-10: DNA de *S. aureus* ATCC 13565 em diluições seriadas (1 ng/ μ L, 100 pg/ μ L, 10 pg/ μ L, 1 pg/ μ L, 100 fg/ μ L, 10 fg/ μ L, 1 fg/ μ L, 100 ag/ μ L, 10 ag/ μ L e 1 ag/ μ L), 11: controle negativo (água), 12: marcador de peso molecular 100pb. (B) Limiar de detecção do gene codificador da enterotoxina A – *sea*. 1: marcador de peso molecular 25pb, 2-6: DNA de *S. aureus* ATCC 13565 em diluições seriadas (1 ng/ μ L, 100 pg/ μ L, 10 pg/ μ L, 1 pg/ μ L, 100 fg/ μ L), 7: controle negativo (água).

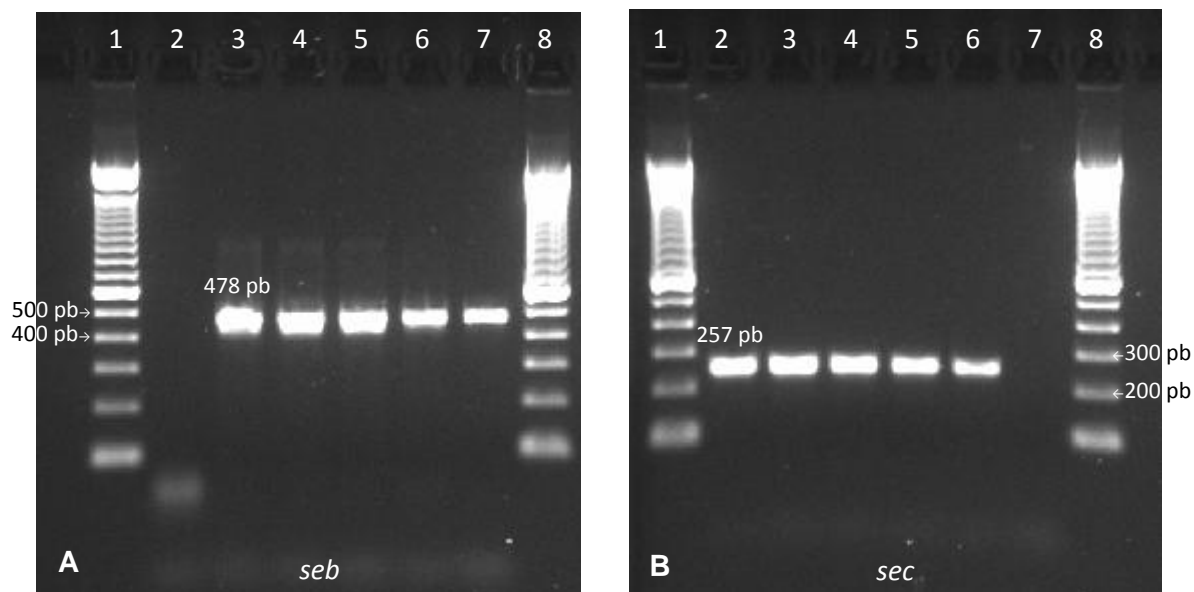


FIGURA 8. Eletroforese em gel de agarose 2%. (A) Limiar de detecção do gene codificador da enterotoxina B – *seb*. 1 e 8: marcador de peso molecular 100 pb, 2: controle negativo (água), 3-7: DNA de *S. aureus* ATCC 14458 em diluições seriadas (1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL). (B) Limiar de detecção do gene codificador da enterotoxina C – *sec*. 1 e 8: marcador de peso molecular, 2-6: DNA de *S. aureus* ATCC 19095 em diluições seriadas (1 ng/μL, 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL), 7: controle negativo (água).

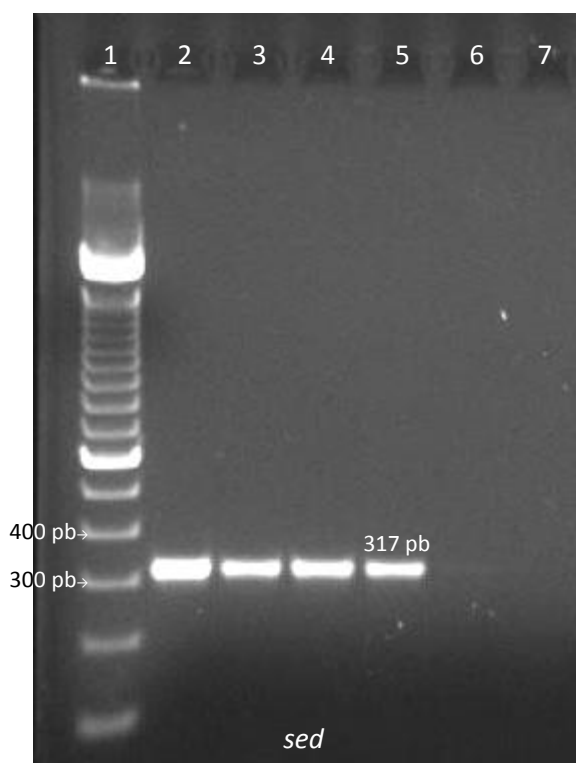


FIGURA 9. Eletroforese em gel de agarose 2%. Limiar de detecção do gene codificador da enterotoxina D – *sed*. 1: marcador de peso molecular 100 pb, 2-6: DNA de *S. aureus* ATCC 13565 em diluições seriadas (100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 pg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL). 7: controle negativo (água).

5.3.2 Determinação da sensibilidade e especificidade diagnóstica

Para a determinação da sensibilidade e especificidade de um teste é necessária a existência de um padrão-ouro. Para a detecção de *S. aureus* em alimentos o padrão-ouro considerado pela comunidade científica é o método tradicional de isolamento. Considerando-se as características intrínsecas da amostra utilizada (alta contaminação) e a grande sensibilidade analítica da PCR, quando se calcula os valores de sensibilidade e especificidade diagnóstica, há um prejuízo para a técnica de PCR, indicando erroneamente muitos resultados falso-positivos, com uma moderada probabilidade do resultado positivo da PCR ser realmente positivo: sensibilidade de 100%, especificidade de 2%, valor preditivo positivo (VPP) de 57%, valor preditivo negativo (VPN) de 100%. Quando se considera a PCR como padrão-ouro observa-se moderada quantidade de resultados falso-negativos, com uma baixíssima probabilidade do resultado negativo do microbiológico ser realmente negativo: sensibilidade de 57%, especificidade de 100%, VPP de 100%, VPN de 2%.

Lembrando que:

$$\text{Sensibilidade diagnóstica} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100 \quad \text{Especificidade diagnóstica} = \frac{VN}{VN+FP} \times 100$$

VP: Verdadeiro Positivo

VN: Verdadeiro Negativo

FN: Falso Negativo

FP: Falso Positivo

5.3.3 Detecção genotípica de *S. aureus* e dos genes codificadores de enterotoxinas diretamente do leite

Das 104 amostras pesquisadas pela PCR para a detecção genotípica de *S. aureus*, 103 (99,0%) foram positivas, independente do momento estudado (Tabela 14).

TABELA 14. Resultados da PCR para *Staphylococcus aureus* em amostras de leite de tanques segundo o momento de avaliação. Botucatu, 2010.

Momento	PCR		Total (%)
	Negativa (%)	Positiva (%)	
M0	1 (0,96)	103 (99,04)	104 (100,00)
M7	1 (0,96)	103 (99,04)	104 (100,00)
M25	1 (0,96)	103 (99,04)	104 (100,00)

M0 = a fresco; M7 = incubação a 7°C por cinco horas; M25 = incubação a 25°C por cinco horas

Com as pré-incubações (M7 e M25) do leite houve diminuição no número de amostras negativas para *S. aureus* pelo exame microbiológico, mas sem ocorrer alteração nos resultados da PCR, que continuou a detectar as 103 amostras positivas. A concordância entre os testes em M0 foi de 52,88%, em M7 de 58,65% e em M25 de 60,58% (Tabela 15).

TABELA 15. Distribuição dos resultados da PCR e do microbiológico para *S. aureus* segundo o momento de avaliação. Botucatu, 2010.

Momento	PCR	Microbiológico		Total (%)
		Sem crescimento (%)	Com crescimento (%)	
M0	Negativa	1 (0,96)	0 (0,00)	1 (0,96)
	Positiva	49 (47,12)	54 (51,92)	103 (99,04)
M7	Negativa	1 (0,96)	0 (0,00)	1 (0,96)
	Positiva	43 (41,35)	60 (57,69)	103 (99,04)
M25	Negativa	1 (0,96)	0 (0,00)	1 (0,96)
	Positiva	41 (39,42)	62 (59,62)	103 (99,04)
Total		136 (43,59)	176 (56,41)	312 (100,00)

M0 = a fresco; M7 = incubação a 7°C por cinco horas; M25 = incubação a 25°C por cinco horas

As três amostras negativas à PCR para *S. aureus* foram negativas também ao exame microbiológico. A PCR detectou *S. aureus* em amostras de leite com contagens deste microrganismo variando de zero a 496.000 UFC/mL (Tabela 16).

TABELA 16. Medidas descritivas da contagem (UFC/mL) de *S. aureus* segundo a PCR. Botucatu, 2010.

Medida descritiva	PCR	
	Negativa (3)	Positiva (309)
Valor mínimo	0,0	0,0
Mediana	0,0	30,0
Valor máximo	0,0	496000,0
Média	0,0	3896,0
Desvio padrão	0,0	30493,2

A PCR foi positiva para *S. aureus* em 309 (99,04%) das amostras, sendo que o microbiológico foi capaz de detectá-lo em apenas 176 (56,41%) das amostras de leite. As três amostras negativas à PCR também foram negativas ao microbiológico. Houve concordância entre a PCR e a contagem em 57,37% das amostras (Tabela 17).

TABELA 17. Distribuição dos resultados microbiológicos e da PCR para *S. aureus*. Botucatu, 2010.

PCR	Microbiológico		Total (%)
	Sem crescimento (%)	Com crescimento (%)	
Negativa	3 (0,96)	0 (0,00)	3 (0,96)
Positiva	133 (42,63)	176 (56,41)	309 (99,04)
Total	136 (43,59)	176 (56,41)	312 (100)

Quanto aos genes codificadores das enterotoxinas, 135 (43,27%) amostras foram positivas para o gene *sea*, 73 (23,40%) para o gene *seb*, 183 (58,65%) para o gene *sec* e 4 (1,28%) amostras positivas para o gene *sed*, de acordo com a tabela 18.

TABELA 18. Resultados da pesquisa de genes codificadores das enterotoxinas nas amostras de leite, segundo o momento de avaliação. Botucatu, 2010.

PCR	Momento	Ocorrência		Total (%)
		Negativa (%)	Positiva (%)	
<i>sea</i>	M0	61 (58,7) ^{aA}	43 (41,3) ^{aA}	104
	M7	53 (51,0) ^{aA}	51 (49,0) ^{aA}	104
	M25	63 (60,6) ^{aA}	41 (39,4) ^{aA}	104
<i>seb</i>	M0	74 (71,2) ^{aB}	30 (28,8) ^{aA}	104
	M7	79 (76,0) ^{aB}	25 (24,0) ^{aA}	104
	M25	86 (82,7) ^{aB}	18 (17,3) ^{aA}	104
<i>sec</i>	M0	48 (46,2) ^{aA}	56 (53,8) ^{aA}	104
	M7	37 (35,6) ^{aA}	67 (64,4) ^{aB}	104
	M25	44 (42,3) ^{aA}	60 (57,7) ^{aA}	104
<i>sed</i>	M0	103 (99,0) ^{aB}	1 (1,0) ^{aA}	104
	M7	102 (98,1) ^{aB}	2 (1,9) ^{aA}	104
	M25	103 (99,0%) ^{aB}	1 (1,0%) ^{aA}	104

M0 = a fresco; M7 = incubação a 7°C por cinco horas; M25 = incubação a 25°C por cinco horas

Quando se associa o momento avaliado com a ocorrência do gene observa-se que para o gene codificador da enterotoxina A (*sea*) não houve diferença significativa entre os momentos avaliados e não houve diferença significativa entre os resultados positivo e negativo. Para o gene codificador da enterotoxina B (*seb*) nos três momentos houve maior número de resultados negativos do que positivos, mas sem diferença de resultado entre os momentos. Já na detecção do gene codificador da enterotoxina C (*sec*) houve uma positividade maior na amostra pré-incubada a 7°C, mas sem diferença significativa em relação aos demais momentos. Na detecção do gene codificador da enterotoxina D (*sed*) não houve diferença entre a positividade das amostras sob as diferentes condições (Tabela 18).

5.4 Detecção de enterotoxinas estafilocócicas pelo método de aglutinação em látex (RPLA) diretamente do leite

5.4.1 Padronização da quantificação das enterotoxinas

A quantificação foi realizada comparando-se a intensidade de reação do sobrenadante com a da toxina padrão de TSST-1.

Foi utilizada a toxina padrão TSST-1 com concentração conhecida de 4 µg/mL. Essa toxina foi diluída em solução estéril contendo salina 0,85% adicionada de 0,3% de proteose peptona nº3 para obtenção das concentrações finais de 10 ng/mL, 5 ng/mL, 2,5 ng/mL, 1 ng/mL, 0,5 ng/mL e 0,25 ng/mL (Figura 10). Observou-se que não houve uma graduação fina com essas concentrações, então se realizaram diluições adicionais intermediárias de 0,4 ng/mL, 0,3 ng/mL, 0,2 ng/mL e 0,1 ng/mL (Figura 11).

Em cada microplaca de fundo em "V" foram colocadas as cinco diluições da toxina padrão TSST-1 na coluna 1 e 2, da linha A a E. Na coluna 1 foi adicionada a respectiva anti-enterotoxina do kit TST-RPLA (Oxoid®) e na coluna 2 foi colocado látex controle (Figura 10).

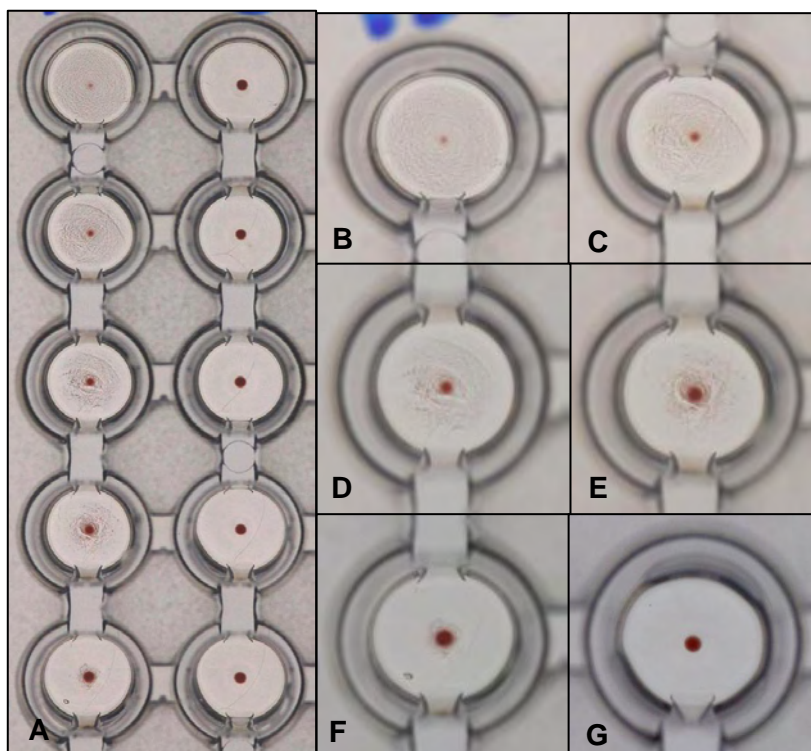


FIGURA 10. Microplaca com diluições seriadas da toxina padrão TSST-1. (A) Visão geral das diluições. Maior detalhe na intensidade das reações em 5 ng/mL (B), 2,5 ng/mL (C), 1,0 ng/mL (D), 0,5 ng/mL (E) e 0,25 ng/mL (F). (G) controle negativo.

De acordo com a primeira leitura, anotou-se a intensidade de reação, comparando com a toxina padrão. Aquelas amostras que apresentaram reação intermediária às diluições testadas, foram comparadas novamente com as diluições menores.

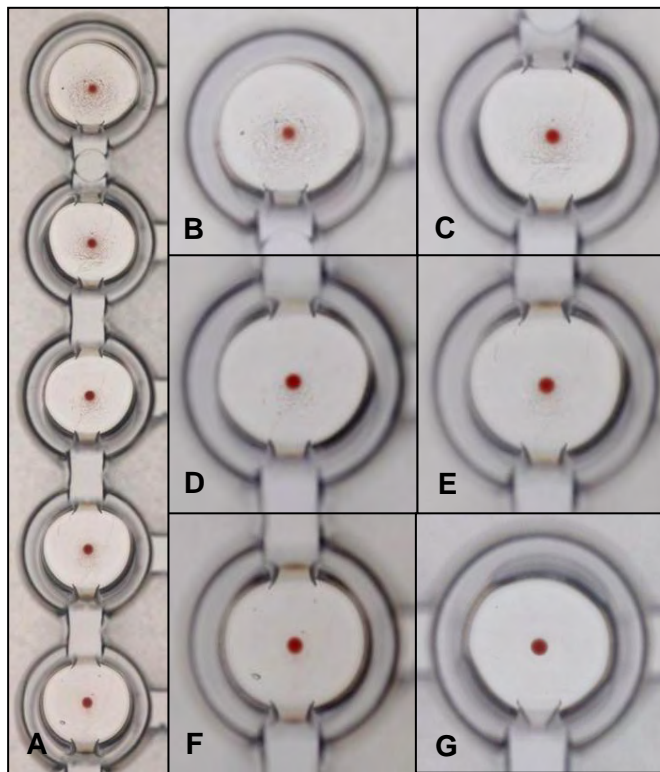


FIGURA 11. Microplaca com diluições seriadas da toxina padrão TSST-1. (A) Visão geral das diluições. Maior detalhe na intensidade das reações em 0,5 ng/mL (B), 0,4 ng/mL (C), 0,3 ng/mL (D), 0,2 ng/mL (E) e 0,1 ng/mL (F). (G) controle negativo.

Como a amostra foi diluída na proporção 1:10, a concentração de enterotoxina foi considerada pelo valor da leitura corrigida pela multiplicação do fator 10. Portanto, se a leitura comparativa foi 0,5 ng/mL, a amostra foi considerada 5 ng/mL.

5.4.2 Resultados da detecção e quantificação das enterotoxinas

A enterotoxina B foi detectada em 25 (8,0%) das amostras e a enterotoxina D em 19 (6,1%) das amostras de leite (Tabela 19).

TABELA 19. Resultados da pesquisa de enterotoxinas diretamente das amostras de leite. Botucatu, 2010.

Enterotoxina	Ocorrências		Total (%)
	Negativa (%)	Positiva (%)	
A	312 (100,0)	0 (0,0)	312 (100,0)
B	287 (92,0)	25 (8,0)	312 (100,0)
C	312 (100,0)	0 (0,0)	312 (100,0)
D	293 (93,9)	19 (6,1)	312 (100,0)

A seguir são apresentados os resultados referentes à pesquisa de enterotoxinas diretamente das amostras de leite nos diferentes momentos pesquisados (Tabela 20). As enterotoxinas A e C não foram detectadas em nenhuma das amostras, nos três momentos pesquisados. A enterotoxina B foi detectada em 9 (8,7%) amostras no momento 0 (M0), em 6 (5,8%) no M7 e em 10 (9,6%) no M25, não havendo diferença significativa de resultados entre os momentos, porém houve maior número de resultados negativos nos três momentos. A enterotoxina D foi detectada em 7 (6,7%) amostras no M0, em 5 (4,8%) no M7 e em 7 (6,7%) amostras no M25, também não havendo diferença significativa de resultados entre os momentos, mas com maior número de resultados negativos em relação aos positivos.

TABELA 20. Distribuição dos resultados da pesquisa de enterotoxinas diretamente das amostras de leite nos diferentes momentos. Botucatu, 2010.

Enterotoxina	Momento	Ocorrência		Total (%)
		Negativa (%)	Positiva (%) (valor ≠ 0)	
A	M0	104 (100,0)	0 (0,0)	104 (100,0)
	M7	104 (100,0)	0 (0,0)	104 (100,0)
	M25	104 (100,0)	0 (0,0)	104 (100,0)
B	M0	95 (91,3) ^{aB}	9 (8,7) ^{aA}	104 (100,0)
	M7	98 (94,2) ^{aB}	6 (5,8) ^{aA}	104 (100,0)
	M25	94 (90,4) ^{aB}	10 (9,6) ^{aA}	104 (100,0)
C	M0	104 (100,0)	0 (0,0)	104 (100,0)
	M7	104 (100,0)	0 (0,0)	104 (100,0)
	M25	104 (100,0)	0 (0,0)	104 (100,0)
D	M0	97 (93,3) ^{aB}	7 (6,7) ^{aA}	104 (100,0)
	M7	99 (95,2) ^{aB}	5 (4,8) ^{aA}	104 (100,0)
	M25	97 (93,3) ^{aB}	7 (6,7) ^{aA}	104 (100,0)

M0 = a fresco; M7 = incubação a 7°C por cinco horas; M25 = incubação a 25°C por cinco horas

5.4.3 Associação entre a detecção genotípica e fenotípica das enterotoxinas nas amostras de leite de tanques

Em 135 (43,3%) amostras de leite detectou-se o gene *sea*. Comparando-se os resultados de detecção do gene *sea* e de detecção da enterotoxina A verifica-se que em todas as amostras positivas para o gene não houve detecção fenotípica da enterotoxina A. A concordância foi de 56,7% entre a detecção do gene *sea* e da enterotoxina A (Tabela 21).

TABELA 21. Distribuição dos resultados de detecção do gene *sea* e da enterotoxina A, nas amostras de leite de tanque nas propriedades pesquisadas. Botucatu, 2010.

<i>sea</i>	Enterotoxina A		Total (%)
	Negativa (%)	Positiva (%)	
Negativa	177 (56,7)	0 (0,0)	177 (56,7)
Positiva	135 (43,3)	0 (0,0)	135 (43,3)
Total	312 (100,0)	0 (0,0)	312 (100,0)

Para o gene *seb* houve a detecção de 73 (23,4%) amostras de leite positivas, sendo 68 (21,8%) sem a detecção de enterotoxina B e 5 (1,6%) com a detecção de enterotoxina B. Em 20 amostras positivas para a enterotoxina B não se detectou o gene *seb*. A concordância foi de 71,8% para a detecção do gene *seb* e da enterotoxina B. (Tabela 22).

TABELA 22. Distribuição dos resultados de detecção do gene *seb* e da enterotoxina B, nas amostras de leite de tanque nas propriedades pesquisadas. Botucatu, 2010.

<i>seb</i>	Enterotoxina B		Total (%)
	Negativa (%)	Positiva (%)	
Negativa	219 (70,2)	20 (6,4)	239 (76,6)
Positiva	68 (21,8)	5 (1,6)	73 (23,4)
Total	287 (92,0)	0 (8,0)	312 (100,0)

Detectaram-se 183 (58,7%) amostras de leite positivas para o gene *sec*, sem detecção fenotípica da enterotoxina C. Houve concordância entre os resultados de detecção do gene *seb* e da enterotoxina C em 41,3% (Tabela 23).

TABELA 23. Distribuição dos resultados de detecção do gene *sec* e da enterotoxina C, nas amostras de leite de tanque nas propriedades pesquisadas. Botucatu, 2010.

<i>sec</i>	Enterotoxina C		Total (%)
	Negativa (%)	Positiva (%)	
Negativa	129 (41,3)	0 (0,00)	129 (41,3)
Positiva	183 (58,7)	0 (0,00)	183 (58,7)
Total	312 (100,00)	0 (0,00)	312 (100,00)

Quanto ao gene *sed* detectaram-se 4 (1,28%) amostras de leite positivas, sendo 3 (0,96%) sem a detecção de enterotoxina D e 1 (0,32%) com a detecção de enterotoxina D. Em 18 amostras positivas para a enterotoxina D não houve a detecção do gene *sed*. A concordância entre os resultados de detecção do gene *sed* e da enterotoxina D foi de 93,27% (Tabela 24).

TABELA 24. Distribuição dos resultados de detecção do gene *sed* e da enterotoxina D, nas amostras de leite de tanque nas propriedades pesquisadas. Botucatu, 2010.

<i>sed</i>	Enterotoxina D		Total (%)
	Negativa (%)	Positiva (%)	
Negativa	290 (92,95)	18 (5,77)	308 (98,72)
Positiva	3 (0,96)	1 (0,32)	4 (1,28)
Total	293 (93,91)	0 (0,00)	312 (100,00)

5.4.4 Associação entre a contagem de *S. aureus* e a detecção das enterotoxinas

Na tabela 25 apresenta-se a comparação entre a contagem de *S. aureus* nas amostras positivas e negativas para as enterotoxinas B e D. Não houve associação entre a positividade para a enterotoxina e uma alta contagem de *S.aureus*. As maiores contagens foram encontradas nas amostras negativas para as enterotoxinas.

TABELA 25. Medidas descritivas da contagem (UFC/mL) de *S. aureus* nas amostras de leite de tanque das propriedades estudadas segundo a enterotoxina. Botucatu, 2010.

Enterotoxina	Medida descritiva	Ocorrência		valor p
		Negativa	Positiva	
A	Valor mínimo	0,0		
	Mediana	28,0		
	Valor máximo	496000,0	-	-
	Média	3858,6		
	Desvio padrão	30348,2		
B	Valor mínimo	0,0	0,0	
	Mediana	31,0	10,0	p>0,05
	Valor máximo	496000,0	32000,0	
	Média	4021,8	1984,2	
	Desvio padrão	31583,6	6608,5	
C	Valor mínimo	0,0		
	Mediana	28,0		
	Valor máximo	496000,0	-	-
	Média	3858,6		
	Desvio padrão	30348,2		
D	Valor mínimo	0,0	0,0	
	Mediana	31,0	10,0	p>0,05
	Valor máximo	496000,0	10000,0	
	Média	4035,7	1127,3	
	Desvio padrão	31103,9	2822,8	

Na Tabela 26 pode-se verificar que as amostras de leite com altas contagens de *S. aureus* ($> 10^4$ UFC/mL) não apresentaram enterotoxinas possuíam pelo menos um dos genes codificadores.

TABELA 26. Medidas descritivas da contagem (UFC/mL) de *S. aureus* nas amostras de leite de tanque que possuíam potencial enterotoxigênico sem expressão fenotípica. Botucatu, 2010.

Presença do gene	Medida descritiva	Sem detecção fenotípica
sea	Valor mínimo	0
	Mediana	36
	Valor máximo	100000
	Média	1789,0
	Desvio padrão	9812,6
seb	Valor mínimo	0
	Mediana	38
	Valor máximo	129900
	Média	3645,2
	Desvio padrão	17701,0
sec	Valor mínimo	0
	Mediana	30
	Valor máximo	100000
	Média	2797,0
	Desvio padrão	12057,9
sed	Valor mínimo	0
	Mediana	80
	Valor máximo	1500
	Média	526,7
	Desvio padrão	843,9

No Quadro 5 são apresentados os resultados da detecção genotípica e fenotípica das enterotoxinas, nos diferentes momentos, bem como a contagem de *S. aureus* e CBT (no mês da coleta) das amostras de leite dos tanques das propriedades com detecção das enterotoxinas.

Todas as amostras em que ocorreu a detecção fenotípica de enterotoxinas houve a detecção genotípica de *S. aureus*. Por outro lado a sua contagem variou de zero a 32.000 UFC/mL. Em 5 amostras a detecção genotípica e fenotípica da enterotoxina B ocorreu concomitantemente e para a enterotoxina D apenas uma amostra. A concentração das enterotoxinas B e D

variaram de 1 a 5 ng/mL. A CBT no mês de realização da coleta variou de 6.000 UFC/mL a 1.892.000 UFC/mL.

QUADRO 5. Associação entre os resultados da detecção de *S. aureus* com a detecção genotípica e fenotípica das enterotoxinas. Botucatu, 2010.

Propr.*	Col.	Mo	<i>S.aureus</i>		Enterotoxina B		Enterotoxina D		CBT no mês da coleta** (UFC/mL)
			Contagem (UFC/mL)	PCR	PCR	RPLA (ng/mL)	PCR	RPLA (ng/mL)	
19	1	25	72	+	-	1	-	1	179.000
24	3	0	4296	+	-	2,5	-	0	478.000
		7	1399	+	-	0	-	3	
		25	10000	+	-	5	-	3	
29	1	0	100	+	-	5	-	0	6.000
		25	10	+	-	2,5	-	2,5	
31	1	25	201	+	-	1	-	1	152.000
35	2	0	0	+	-	1	-	0	76.000
		7	0	+	-	2,5	-	1	
		25	0	+	-	2,5	-	1	
	3	0	0	+	-	4	-	2,5	113.000
		7	0	+	-	5	+	5	
		25	0	+	+	3	-	1	
37	1	0	600	+	+	2,5	-	2,5	108.000
		7	0	+	-	2,5	-	1	
		25	99	+	-	3	-	0	
	3	0	20	+	+	2,5	-	1	271.000
		7	16	+	-	4	-	2,5	
		25	0	+	+	4	-	2,5	
53	2	7	0	+	-	2,5	-	0	1.826.000
57	2	0	0	+	+	3	-	3	1.892.000
	3	7	300	+	-	3	-	0	120.000
		25	0	+	-	2	-	0	
59	2	0	0	+	-	1	-	1	201.000
	3	0	8000	+	-	0	-	2,5	46.000
60	3	25	32000	+	-	5	-	0	25.000
61	1	0	1100	+	-	0	-	1	344.000
63	3	0	1892	+	-	2,5	-	0	322.000

* Prop. = propriedade, Col. = coleta, Mo = momento

** Valor referente ao resultado da análise do mês da coleta

*D*iscussão

6. DISCUSSÃO

Este trabalho permitiu uma avaliação ampla da cadeia produtiva leiteira da região, considerando desde as características dos produtores até a qualidade do leite recebido no laticínio, aspecto fundamental para que se alcancem os objetivos da IN 51.

O estudo do perfil dos produtores permitiu verificar que há grande diversidade entre as propriedades, tanto no tamanho do rebanho e volume de produção quanto no tipo de manejo. Há propriedades pouco produtivas, algumas com apenas três animais em lactação e produção diária de 10 litros, um pouco mais de 3 litros/vaca. Outras apresentavam até 111 vacas em lactação, com produção diária de 3.632,8 litros, quase 33 litros/vaca. Para se ter uma idéia, em 1995 a média da produção de leite por vaca em lactação em Minas Gerais, o maior estado produtor do país, era de 4,9 litros e subiu para 8,10 litros em 2005 (CARVALHO et al., 2007) e em algumas propriedades com gado holandês a pasto no Rio Grande do Sul a produção chega a 22,4 L/vaca/dia (FONTANELI, 2005).

Grande parte dos produtores da região parece não encarar a produção leiteira como negócio, e se mantem no setor por tradição familiar, com pouca infra-estrutura, animais em número reduzido e com genética inadequada, pouco conhecimento de boas práticas de produção e falta de recursos, várias dessas características observadas na Zona da Mata de Minas Gerais (ZOCCAL et al., 2004) e na região de Jaboticabal-SP (LOPES, 2007). Este aspecto é comum em outras regiões do país, e reforça a importância da adoção de programa de estímulo à produção leiteira aos pequenos produtores, com políticas públicas conforme ressaltado por Lopes (2007), visando melhorar a cadeia produtiva de leite, aumentando a produção e a rentabilidade, bem como a qualidade do produto final oferecido para o consumo, atendendo as exigências do mercado interno e externo.

Os valores da CCS e CBT oscilaram bastante, mesmo dentro da mesma propriedade. Essas variações, muitas vezes, ultrapassaram os limites determinados pelo MAPA, resultando em prejuízos para os produtores com o descarte do leite e para a indústria, demonstrando que estão ocorrendo falhas importantes na cadeia leiteira que devem ser detectadas e corrigidas. Isso já foi

observado por Nero et al. (2005) avaliando a qualidade do leite cru quanto à CBT, em que 21,3% das amostras estavam acima do limite na região de Viçosa – MG, 56% na região de Pelotas – RS, 47,6% na região de Londrina – PR e 68% na região de Botucatu – SP. Neste sentido são relevantes os aspectos de educação sanitária para os produtores de leite, independente do tipo e tamanho do rebanho, pois o setor lácteo contribui de forma significativa para o agronegócio no nosso país. Em 2006 a Indústria de Laticínio ocupou a 12^a posição na geração total de emprego, à frente de setores como construção civil, têxtil, siderurgia, entre outros (MARTINS, 2006).

A CCS ainda não representa grande problema para a maioria dos produtores porque o gado nestas situações é normalmente mestiço, com uma produção baixa, sendo mais resistente às mastites. Os animais de maior produção são mais susceptíveis às infecções mamárias e desta forma apresentam tendência de contagens mais elevadas de células somáticas, bem como CBT, pois ambos parâmetros se correlacionam com a ocorrência de mastites nos rebanhos, o que reflete na qualidade do leite produzido nas propriedades.

O maior problema está na alta CBT, que também se relaciona à higiene inadequada das instalações, dos animais, dos equipamentos e principalmente durante o processo de ordenha. A higiene pré-ordenha é extremamente importante para a obtenção higiênica do leite, pois esta prática já elimina grande quantidade de microrganismos que podem ser veiculados pelo leite devido à contaminação do produto.

Nero et al. (2005) estudaram a qualidade do leite cru de 210 propriedades rurais localizadas em quatro importantes estados produtores de leite: Minas Gerais (MG), Rio Grande do Sul (RS), Paraná (PR) e São Paulo (SP). No estado de SP foram pesquisadas 50 propriedades do município de Botucatu – SP, e naquele momento 68% das propriedades apresentaram contagem de aeróbios mesófilos acima de 10^6 UFC/mL, valor muito próximo do observado no presente estudo (57,1%), realizado quatro anos após.

Vários fatores são importantes para a melhoria da qualidade do leite. As indústrias em geral focaram seus esforços quando da implementação da IN 51 nos aspectos relativos ao resfriamento do produto e no seu transporte sob baixas temperaturas, que interferem principalmente na taxa de multiplicação

bacteriana, que é um dos pilares determinantes da qualidade microbiológica do produto. Resta ainda direcionar as ações para o segundo conjunto de fatores, que estão ligados à contaminação inicial do leite, oriunda da glândula mamária, exterior do úbere, equipamentos e utensílios da ordenha e, finalmente, da qualidade da água utilizada em todo o processo (PINTO; IZIDORO, 2007).

O tanque comunitário estudado apresentou baixa CCS (< 300.000 células/mL), o que é esperado, visto que os produtores que levam o leite a esse tanque tem também provavelmente um rebanho pouco produtivo, sem produção suficiente para instalação de tanque na própria propriedade. Por outro lado, os valores da CBT se encontram acima do limite da IN 51 em duas coletas o que indica possível problema de higiene nas propriedades de origem e no transporte. Essas contagens foram bem maiores que as encontradas por Souza et al. (2009), que avaliaram um tanque comunitário que recebia o leite de 9 propriedades, e obtiveram valores entre $2,1 \times 10^5$ e $3,3 \times 10^5$ UFC/mL. Eles sugerem que essa boa qualidade do leite neste tanque comunitário está relacionada ao seu uso ser praticamente familiar, visto que apenas um dos produtores não fazia parte da família, por haver uma relação de confiança entre eles pelos interesses comuns, e que as contagens de microrganismos mesófilos estavam baixas ($< 10^6$ UFC/mL) pela proximidade existente entre o tanque comunitário e as nove propriedades estudadas, fato que contribui para a rápida entrega do leite de modo a controlar a multiplicação microbiana, principalmente nos meses mais quentes do ano.

Algumas propriedades (14,71%) possuem tanque de imersão. A mediana da produção de leite (L/vaca/dia) nas propriedades com tanque de imersão foi significativamente menor em relação àquelas com tanque de expansão, o que confirma a baixa produção dos produtores que mantêm o sistema de imersão. Para os produtores que não tem condições de adquirir tanque de expansão é uma opção razoável, mas é importante que gradativamente seja substituído, pois a higienização é mais difícil de ser realizada, há pouco controle da temperatura e a distribuição da refrigeração é irregular. Além disso, pode ocorrer o tombamento do latão dentro do tanque, com a entrada de água suja no leite, e conseqüente contaminação do produto.

Há indícios do interesse dos produtores em tecnificar as propriedades. Encontrou-se 55,88% que já utilizam a ordenhadeira mecânica. A produção nas

propriedades com ordenha mecânica foi maior em relação àquelas com ordenha manual e ordenha manual associada à mecânica, o que indica possivelmente uma propriedade com mais recursos, com animais melhores e manejo mais adequado. A mecanização da ordenha pode ser positiva para o manejo na propriedade, mas a manutenção do equipamento e a higiene da ordenha devem ser bem conduzidas, seguindo as boas práticas de produção (SANTOS, 2007), caso contrário traz muito mais problemas do que benefícios para a propriedade, pois as teteiras e a tubulação serão novos locais para o acúmulo de sujidades, resíduos de leite e bactérias, o que favorece a ocorrência de mastites, pois a ordenha é o principal momento de transmissão dos microrganismos (SMITH et al., 1998), bem como o aumento da CBT e queda na qualidade do leite (AMARAL et al., 2004).

Com a aplicação do questionário verificou-se que 23,53% dos produtores não realizam nenhum tipo de procedimento nos animais antes da ordenha. Em contrapartida 17,65% desenvolvem a rotina de pré-ordenha com lavagem dos tetos, pré-dipping, secagem dos tetos e pós-dipping, e ainda realizam a terapia da vaca seca ao final da lactação, e 2,94% praticam essa rotina, exceto a terapia da vaca seca. Os demais (55,88%) realizam somente algumas destas práticas de forma irregular, não garantindo uma higiene adequada, e conseqüentemente a obtenção de um leite de menor qualidade microbiológica. A lavagem com água corrente e a secagem dos tetos já reduz o número de bactérias nos tetos, mas a redução somente é maior com a associação da antissepsia (BRITO et al., 2000).

Essas informações reforçam a existência de falhas importantes de manejo nas propriedades que não seguem as boas práticas de produção quanto à higiene de ordenha, à profilaxia e controle das mastites (SANTOS, 2007), que quando bem realizadas geram reflexos diretos na diminuição da contaminação do leite, aspecto importante para a indústria, garantindo melhor rendimento na produção dos derivados lácteos (SANTOS, 2003).

Quando se avaliou o item assistência técnica, 17,65% dos produtores afirmaram não receber nenhum tipo de assistência. Isso demonstra que uma quantidade significativa dos produtores não busca auxílio de profissional capacitado para o manejo sanitário do rebanho e melhoria na produção. Ao associar-se o tipo de assistência técnica com as variáveis produção média de

leite, CCS e CBT, observou-se diferença significativa. As propriedades com assistência privada e a associação desta com a comunitária apresentaram maior produção e CCS mais baixa, o que sugere um rebanho melhor e mais saudável em função da orientação técnica recebida.

Na avaliação da CBT, os valores oscilaram bastante o que dificultou a análise. Foi possível verificar que o valor máximo (9.999.999 UFC/mL) foi atingido por uma propriedade sem nenhuma assistência técnica e o valor mínimo (4.000 UFC/mL) obtido em propriedade com assistência técnica privada. Considerando-se as medianas, a menor CBT foi obtida em propriedades com assistência técnica privada, seguida pelas propriedades com assistência comunitária, e sem assistência, mas sem diferença significativa entre elas. Obteve-se diferença significativa entre a CBT em propriedade com assistência privada e com assistência comunitária e privada. Esses dados demonstram a importância da assistência técnica no controle da qualidade do leite, mas que também depende da orientação adequada do produtor e da continuidade da higiene adequada ao longo do tempo. A importância da assistência técnica e da extensão rural para os pequenos produtores tem sido comprovada em um assentamento coletivo localizado no estado do Paraná com avanço rápido nas questões de alimentação e manejo de ordenha (SANTOS et al., 2009).

A cultura de amostras de leite de tanque é uma técnica útil e importante para se avaliar o rebanho com relação aos principais patógenos causadores de mastite. *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae*, se identificados em uma cultura de amostra de leite de tanque, indicam problemas na higiene de ordenha e infecção mamária. As amostras de tanque são prontamente obtidas e podem rapidamente e a baixo custo pesquisar grande número de rebanhos para bactérias causadoras de mastites, e já foi comprovado que o teste tem a capacidade de classificar corretamente os rebanhos de acordo com o status de infecção (GODKIN; LESLIE, 1993).

Para a avaliação da qualidade do leite quanto a *S. aureus* indica-se o isolamento e a contagem deste microrganismo com o uso do meio agar Baird Parker, por permitir a recuperação de células injuriadas (SANTOS, 2008) e como meio de cultura indicado pelo MAPA (BRASIL, 2003^a). Entretanto, esse meio no presente estudo não foi completamente seletivo, o que também foi

observado por vários autores (ISIGIDI et al., 1989; OLLIS et al., 1995; DE BUYSER et al., 1998; ZANGERL, 1999; SANTOS, 2008), permitindo o isolamento de microrganismos ambientais presentes no leite como *Bacillus* spp. e *Enterococcus faecalis* que dificultam a seleção e contagem das colônias típicas e atípicas, principalmente nas amostras previamente expostas a temperaturas mais elevadas (OLLIS et al., 1995). O melhor tempo de incubação para essa seleção foi 48 horas, no qual as colônias de interesse se tornavam mais evidentes em relação aos contaminantes.

Pelas considerações levantadas, o exame microbiológico para detecção de *S. aureus* não apresentou bom resultado, se mostrando negativo em várias amostras (42,63%) consideradas positivas pela PCR. Godkin e Leslie (1993) e Ollis et al. (2005) já assinalavam a questão da baixa sensibilidade e alta especificidade quando para o isolamento desse agente em cultura simples de leite de tanque, comparado com culturas individuais dos animais. Quanto à PCR, vários autores tem indicado seu uso na detecção de *S. aureus* em cultura pura, buscando encontrar marcadores cada vez mais específicos e de fácil execução para a identificação correta desta espécie (LIU et al., 2007; UL-RIYAZ-UL-HASSAN et al., 2008), em leite e seus derivados (RIFFON et al., 2001; CHOTÁR et al., 2006). Essa atualização de marcadores deve ser feita constantemente, visto a variabilidade genética dentro da mesma espécie ao longo do tempo. Para exemplificar, os primers Sa442-1 e Sa442-2 desenvolvidos por Martineau et al. (1998) *S. aureus*-específicos falharam em confirmar um isolado clínico pela ausência do fragmento Sa442 alvo dos primers (KLAASSEN et al., 2003).

Com todas as características da técnica levantadas e com os resultados do presente estudo reforçam-se as vantagens da PCR na identificação de *S. aureus* no tanque pela maior sensibilidade, poder de identificação e especificidade, já que o exame microbiológico necessita de métodos fenotípicos, incluindo testes bioquímicos que exigem a expressão das características. Straub et al. (1999) desenvolveram os primers *S. aureus*-específicos Staur-4 e Staur-6 e confirmaram 100% de especificidade ao testá-los com 9 cepas de *S. aureus* e 23 cepas de outras espécies do gênero *Staphylococcus*. Kumar et al. (2009) com os mesmos primers obtiveram um limite de detecção de $5,5 \times 10^1$ UFC/mL de leite inoculado experimentalmente.

Outra alternativa que se tem buscado é a substituição dos métodos clássicos de identificação que são muito laboriosos e demorados, por vários sistemas comerciais para a rápida identificação de estafilococos. Eles são baseados em reações bioquímicas miniturizadas ou imunológicas. Porém ainda existem problemas como custo, tempo de resposta e mais importante, tanto esses sistemas comerciais como os métodos clássicos deixam grande número de isolados ainda incorretamente identificados ou não identificados, e testes suplementares são frequentemente requeridos para a completa identificação, e as técnicas moleculares são importantes opções (MENDOZA et al., 1998; COUTO et al., 2001).

No presente estudo houve uma grande variabilidade de resultados bioquímicos obtidos com os isolados de *S. aureus*. A hemólise não foi visualizada em alguns dos isolados, o que indica a importância de caracterizarem-se também as estirpes não hemolíticas.

Somente a utilização da fermentação de açúcares não foi suficiente, pois alguns isolados não fermentaram um ou dois açúcares. Por outro lado a polimixina B que é indicada na diferenciação entre *S. aureus* e *S. intermedius*, pelos resultados deste estudo, não pode ser considerada isoladamente, visto o grande número de *S. aureus* sensível a este antimicrobiano.

A produção de acetoína foi utilizada em substituição à polimixina B. Previamente à utilização da prova de produção de acetoína, testou-se a produção de β -galactosidase. Esse teste funcionou somente para enterobactérias, apresentando resultado falso-positivo para as cepas padrão de *S. aureus*, fato que foi relatado ao fabricante, e ainda está em avaliação por especialista na Inglaterra, onde é fabricado.

Desta forma, destacamos como importantes a utilização da fermentação de açúcares (trealose, maltose, manitol), a resistência à polimixina B e a produção de acetoína concomitantemente para classificação mais segura desse grupo. Essa dificuldade em definir os melhores testes para a classificação dos estafilococos coagulase positivos tem sido relatada. Diversos autores sugerem o uso de agar P e agar Baird Parker suplementados com acriflavina, a detecção da atividade da β -galactosidase (ROBERSON et al., 1992; BRITO et al., 2002), a produção de acetoína, a produção de ácido a partir da maltose e a atividade da hialuronidase (RAUS; LOVE, 1983;

BASCOMB; MANAFI, 1998). Em todos esses trabalhos quando se analisavam os resultados em conjunto era possível discriminar as espécies, porém na análise individual de cada teste, sempre era verificada uma pequena variabilidade em relação ao percentual de cepas de cada espécie com reação positiva ou negativa. Essa variação nos resultados de testes bioquímicos é causada pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica (FARBER et al., 2001)

Por essa razão, nos casos não confirmados pelos métodos tradicionais, pode se lançar mão de primers espécie-específicos, de acordo com o resultado do presente estudo, como os primers Staur-4 e Staur-6 que facilitam e agilizam a classificação, sem sofrer esse tipo de interferência.

Na análise do leite dos tanques as contagens de *S. aureus* no M0 variaram de zero a 8×10^3 UFC/mL, valores inferiores aos encontrados por Araújo et al. (1989). A incubação do leite a 7°C por cinco horas não aumentou a contagem de *S. aureus*, ao contrário da incubação a 25°C por cinco horas, apresentando aumento da contagem, com diferença significativa ($p < 0,05$), sendo nesta temperatura que se atingiu contagens iguais ou superiores a 10^4 UFC/mL. Além disso, houve aumento na detecção de *S. aureus* após as incubações. Isso já era esperado já que a temperatura com crescimento mínimo de *S. aureus* é 7°C (FRAZIER; WESTHOFF, 2000).

Esses dados indicam que a campo, a inadequada ou não refrigeração do leite (que pode atingir temperaturas superiores a 25°C) favorece a multiplicação de *S. aureus*, aumentando o risco para os humanos pelo consumo deste produto cru ou dos subprodutos lácteos.

Para o estudo de *S. aureus* direto do leite foi realizada a padronização da PCR para *S. aureus*, apresentando baixo limiar de detecção, podendo ser utilizada em amostras com pequena quantidade do microrganismo. Na extração o maior cuidado deve ser com a adequada retirada da gordura do leite, principal interferente desse tipo de matriz, e a completa lise das células bacterianas.

Não houve diferença no total de amostras de leite positivas para *S. aureus* pela PCR nos três momentos, sendo apenas uma amostra negativa. A amostra negativa no M0 também foi negativa ao exame microbiológico. Após as incubações, em M7 e M25, houve a detecção pela PCR e pelo microbiológico

pela quantidade de *S. aureus* atingir o limite de detecção destes dois testes. A amostra positiva em M0 e negativa em M7 e M25 pela PCR, foi negativa ao microbiológico nos três momentos. Provavelmente, *S. aureus* em M0 estava em baixa concentração, suficiente apenas para a detecção pela PCR, e em M7 e M25 apresentou concentração inferior à necessária para a detecção tanto pela PCR quanto pelo microbiológico.

Observa-se, portanto, a concordância da PCR com o exame microbiológico nas amostras negativas. Nas amostras positivas à PCR não houve boa concordância com o exame microbiológico, pois o segundo deixou de detectar *S. aureus* em 176 (56,41%) amostras que a PCR detectou. Porém, essa concordância aumentou gradativamente após as pré-incubações, variando de 52,88 a 60,58%. A justificativa pode estar no fato do meio Baird Parker não ser muito seletivo, como verificado neste estudo, e também pelos valores de CBT, com grande contaminação nas amostras de leite, o que dificultou e até impediu a visualização de *S. aureus* em algumas situações.

Considerando-se os resultados de sensibilidade e especificidade diagnóstica dos testes, o fato do exame microbiológico ainda ser o padrão-ouro na detecção de *S. aureus* e ainda conseguir detectar as células viáveis (a PCR detecta células mortas também), sugere-se a utilização da PCR para a detecção de *S. aureus* em amostras de leite de tanque, para a triagem de propriedades com vacas infectadas pelo agente, visto que a técnica tem um baixo limiar de detecção, é mais fácil de ser executada em larga escala e mais rápida, considerando-se todas as etapas para classificação bioquímica da espécie. As propriedades com resultado positivo na PCR podem ter a avaliação mais completa com o consequente isolamento do microrganismo pelo exame microbiológico tradicional, permitindo uma avaliação epidemiológica esclarecedora.

Quanto ao risco de transmissão de *Staphylococcus* enterotoxigênicos, realizou-se a padronização da detecção dos genes das enterotoxinas diretamente do leite, que apresentou um baixo limiar de detecção. Esse valor foi inferior ao obtido por Johnson et al. (1991) que elaboraram os primers, e encontraram um limite de 10 pg para *sea*, *sec* e *sed* e de 1 pg para *seb*. Isso porque os parâmetros da amplificação foram modificados no presente estudo para melhor adequação às condições do laboratório. Essa detecção é

interessante para se analisar a distribuição desses genes no leite e nas mastites (SILVA et al., 2005; BOEREMA et al., 2006). A PCR revelou uma grande porcentagem de amostras de leite positivas, principalmente para o gene *sec* (58,65%), seguido pelo gene *sea* (43,27%), *seb* (23,40%) e *sed* (1,28%).

Esses resultados concordam quanto aos genes encontrados, mas em porcentagens superiores às encontradas por Silva et al. (2005) que detectaram 3,1% isolados de *S. aureus* provenientes de mastite bovina com gene *sec* e 6,3% com gene *sea* e *seb*.

Além da detecção genotípica das enterotoxinas, realizou-se a padronização da sua detecção fenotípica diretamente do leite. O leite de tanque demonstrou ser uma matriz difícil de trabalhar na extração das enterotoxinas por apresentar muitos interferentes, como por exemplo, alta porcentagem de gordura e alta contaminação bacteriana, que redundam em resíduos ou metabólitos que permanecem no sobrenadante e interferem com o kit RPLA.

Houve a necessidade de utilizar o clorofórmio para a retirada dessa gordura interferente. Ainda ocorreram reações inespecíficas em algumas amostras, o que exigiu a diluição do sobrenadante.

Na literatura relata-se que o limite de detecção do RPLA é de 0,25 ng/mL (ADESIYUN, 1994), mas foi possível a detecção de 0,1 ng/mL de enterotoxina em amostras não diluídas e neste estudo, com a diluição, o limite de detecção elevou-se para 1 ng/mL, um valor adequado considerando outros testes como o OSP (Optimun-Sensitivity-Plate) que é capaz de detectar somente 0,5 µg/mL (ROBBINS et al., 1994) e ELISA que detecta de 0,25 a 1 ng/g (BENNETT, 2005).

Os resultados mostraram que as amostras com maior contagem ($> 10^4$ UFC/mL) de *S. aureus* apresentaram resultado negativo na detecção de enterotoxinas. Segundo os relatos, a contagem de *S. aureus* necessária para a produção de enterotoxinas é de 10^4 a 10^5 UFC/g (ANUNCIAÇÃO et al., 1994; PARK et al., 1994; AKHTAR et al., 1996). Esses resultados podem ser explicados pela alta contagem de outros microrganismos que interferem no crescimento de *S. aureus*, uma vez que esse microrganismo não é bom competidor, sendo provavelmente o motivo de não causar intoxicação alimentar em produto cru (BERGDOLL, 1990). Por outro lado, a baixa contagem de *S.*

aureus nas amostras com produção de enterotoxinas pode ser explicada pela produção de enterotoxinas por outras espécies de *Staphylococcus* não pesquisados. A comprovação desta hipótese são os resultados do estudo de Lamaita et al. (2005) que encontraram *Staphylococcus* em contagens entre $1,0 \times 10^5$ e $2,5 \times 10^7$ UFC/mL em leite cru e estes isolados foram enterotoxigênicos para as enterotoxinas A, B, C e D, sendo 24,6% de estafilococos coagulase positivos e 41,3% de estafilococos coagulase negativos, ressaltando a importância dos coagulase negativos nesse tipo de alimento.

Além disso, houve a produção de enterotoxinas em poucas amostras, mesmo com uma alta prevalência dos genes codificadores das enterotoxinas *sea*, *seb* e *sec*. Esse achado corrobora com Araujo et al. (1989) que encontraram apenas um isolado de *S. aureus* enterotoxigênico produtor da enterotoxina B em 100 amostras de leite cru estudadas.

O baixo índice de detecção de enterotoxinas nas amostras de leite pode ser justificado por baixa produção não sendo possível a detecção pelos métodos imunológicos (CUNHA et al., 2007) ou a não expressão dos genes que codificam as enterotoxinas, existindo alguns fatores do meio externo que podem ser determinantes para a expressão desses genes.

Em primeiro lugar a presença de contaminantes competidores por nutrientes e produtores de metabólitos, como *Bacillus* sp., impede a multiplicação de *S. aureus* ocorrendo pouca ou nenhuma produção de enterotoxinas, conforme observado por Cunha (1992) em que houve a influência de *Bacillus* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* sobre o *S. aureus* inoculados em leite bovino principalmente quando mantidos a 20°C.

Outro fato a ser considerado são os fatores intrínsecos do leite como o sistema lactoperoxidase, largamente conhecido como um sistema antimicrobiano natural presente no leite cru. Três componentes são necessários para ativá-lo: a enzima lactoperoxidase, tiocianato e peróxido de hidrogênio. A enzima é abundante no leite cru, entretanto o tiocianato e o peróxido de hidrogênio estão presentes em baixas concentrações. Quando ativada, a lactoperoxidase cataliza a oxidação do tiocianato pelo peróxido de hidrogênio gerando produtos de oxidação de vida curta, dos quais o anion hipotiocianito e ácido hipotiocianoso exibem atividade antibacteriana

(DAJANTA et al., 2008). Carmo et al. (2009) em experimento com leite contaminado com linhagens de *S. aureus* enterotoxigênicas evidenciaram a presença de mecanismos naturais capazes de inibir a produção de enterotoxinas pelos estafilococos.

O tempo de 5 horas e a temperatura de 25°C ao qual o leite foi exposto pode não ter sido suficiente para um grande estímulo à produção de enterotoxinas. Embora *S. aureus* possa produzir enterotoxinas a partir de 25°C, a temperatura ótima é de 35 a 37°C (FRAZIER; WESTHOFF, 2000; CARMO, 2001). Cunha (1992) detectou a produção de enterotoxinas em leite inoculado com *S. aureus* somente após 5 dias de incubação sob 20°C. A produção de enterotoxinas depende das condições de crescimento (CUNHA et al. 2007). Entretanto, Anunciação et al. (1994) conseguiram a produção de enterotoxina A em queijo branco fabricado com leite pasteurizado inoculado experimentalmente com *Staphylococcus aureus* na concentração de 10^4 UFC/mL que tinha sido mantido a 27°C por 5 horas. Fujikawa e Morozumi (2006) inocularam *S. aureus* em leite esterilizado para avaliar a dinâmica do crescimento e a produção de enterotoxina A e elaborar um modelo de multiplicação bacteriana que pudesse prever surtos de intoxicação como o relatado por Asao et al. (2003). A produção de enterotoxina foi linear a partir da contagem de $10^{6.5}$ UFC/mL e sob temperatura de 14 a 32°C.

O pH do meio também atua diretamente na produção das enterotoxinas, que é ótima em pH neutro e decresce em pH ácido. A presença da glicose e a queda do pH podem interferir com a expressão dos genes *agr* envolvidos na regulação da produção de toxinas (CAL SOLARI, 2006).

Outro fator que merece reflexão, além da influência do meio, são os sistemas regulatórios presentes nos microrganismos que podem afetar diretamente a produção de toxinas. A presença do gene não significa a expressão do mesmo, mas também não exclui a possibilidade de produção de toxinas em determinado momento, seja *in vivo* ou em meios de cultura com condições ótimas (CAL SOLARI, 2006).

Cunha et al. (2007) avaliaram o potencial toxigênico de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes pela PCR e pelo método de RPLA e detectaram 56 amostras com genes para as enterotoxinas A, B, C e D, mas apenas 46 (82,1%) foram detectadas como produtoras pelo RPLA.

Por outro lado, no presente estudo, existiram amostras que foram positivas para a detecção de enterotoxina e não apresentaram o gene codificador correspondente a ela. Isso ocorre pelos métodos imunológicos poderem fornecer resultados falso-positivos por reações cruzadas entre antígenos, como a que ocorre entre SEB e SEC¹ (SPERO et al., 1978) e entre os anticorpos monoclonais da enterotoxina A com as enterotoxinas B, C¹, D e E (EDWIN et al., 1986), e pela ocorrência de reações inespecíficas (TSEN; CHEN, 1992; CUNHA et al., 2007). As reações inespecíficas por estes métodos são relatadas por diversos autores, que sugerem diferentes protocolos para a diminuição de sua ocorrência (PARK et al., 1992; PEREIRA et al., 1997; MEYRAND et al., 1999). Cunha (1992), estudando os interferentes na detecção de enterotoxinas pela técnica de RPLA, observou reações inespecíficas em amostras de leite que apresentavam simultaneamente adição de açúcar (sacarose a partir de 30%) e atividade microbiana (leite deteriorado ou inoculado com *Bacillus cereus*), sugerindo a interferência de metabólitos microbianos. Além disso, a intensidade de reação inespecífica em leite naturalmente deteriorado diferiu da que ocorreu no leite inoculado, indicando que o tipo de atividade microbiana resultaria em diferentes interferências.

Ainda é necessário o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e específicos que o RPLA para a utilização em alimentos como o leite, e que não sofram a interferência de grande número de substâncias existentes em alimentos.

Comprova-se, portanto, a importância do leite como fonte de linhagens com potencial enterotoxigênico, que sob condições ideais (tempo/temperatura, alta contagem de bactérias, baixa quantidade de microbiota competidora) poderão produzir enterotoxinas estafilocócicas em quantidade suficiente para causar quadros de intoxicação alimentar. Assim, outros trabalhos devem ser conduzidos em amostras de leite de tanque para avaliar o papel de outros estafilococos coagulase positivos e até mesmo estafilococos coagulase negativos como risco para a saúde pública pela produção de enterotoxinas.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

1. Os produtores da região estudada são pequenos a médios produtores, com potencial para aumentar a produção e melhorar a qualidade do leite, pois já refrigeram o produto e apresentam algum grau de tecnificação. A qualidade do produto ainda é precária, há o risco de transmissão de *Staphylococcus* enterotoxigênicos e das enterotoxinas para os humanos, com a possibilidade de ocorrência de intoxicações alimentares;
2. Foi possível padronizar e comprovar a sensibilidade e especificidade da PCR na detecção de *S. aureus* em amostras de leite de tanque, capaz de detectar 1 pg/ μ L de DNA, podendo ser utilizada como método de triagem em propriedades para o diagnóstico do agente;
3. Foi possível padronizar e comprovar a sensibilidade da PCR na detecção dos genes codificadores das enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec* e *sed* em amostras de leite de tanque, capaz de detectar 100 fg/ μ L de DNA, constituindo-se em procedimento efetivo para a avaliação do risco de transmissão de *Staphylococcus* enterotoxigênicos pelo leite, mesmo quando não há a detecção das enterotoxinas;
4. A PCR para *S. aureus* é uma metodologia adicional na classificação de isolados que não apresentam perfil bioquímico clássico, além de ser mais rápida e de fácil execução em relação aos métodos tradicionais;
5. Foi possível padronizar a detecção e quantificação das enterotoxinas estafilocócicas diretamente do leite, demonstrando que o RPLA apresentou excelente sensibilidade (1 ng/ μ L), mas como todo teste imunológico, deve-se atentar para a ocorrência de reações inespecíficas;
6. No estudo dos riscos do leite como via de transmissão de *Staphylococcus* enterotoxigênicos é importante associar métodos

moleculares e fenotípicos para melhor avaliação quanto às reações inespecíficas e a produção de enterotoxinas em quantidades inferiores ao limite de detecção dos testes clássicos microbiológicos.

*B*ibliografia

8. BIBLIOGRAFIA

ADESIYUN, A.A. Bacteriology quality and associated public health risk of preprocessed bovine milk in Trinidad. *International Journal Food Microbiology*, Amsterdam, v.21, n.3, p.253-261, 1994.

AKHTAR, M.; PARK, C.E.; RAYMAN, K. Effect of urea treatment on recovery of staphylococcal enterotoxin A from heat-processed foods. *Applied Environmental Microbiology*, v.62, n.9, p.3274-3276, 1996.

ALMEIDA FILHO, E.S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "frescal". *Revista de Saúde Pública*, v.34 n.6, p.578-580, 2000.

AMARAL, L.A.; ISA, H.; DIAS, L.T.; ROSSI JR., O.D.; NADER FILHO, A. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.24, n.4, p.173-177, 2004.

ANUNCIAÇÃO, L.L.C.; LINARD, W.R.; CARMO, L.S.; BERGDOLL, M.S. Production of staphylococcal enterotoxin "A" in white cheese. *Revista de Microbiologia*, v.25, n.1, p.68-71, 1994.

ARAÚJO, W.P.; IARIA, S.T.; PAIM, G.V.; SOLE-VERNIN, C. *Staphylococcus aureus* em leite cru. I. Contagem, verificação da enterotoxigenicidade e fagotipagem das cepas isoladas. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v.26, n.2, p.187-198, 1989.

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*, v.130, p.33-40, 2003.

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

BASCOMB, S.; MANAFI, M. Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultative anaerobic gram-positive cocci. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, n.2, p.318-340, 1998.

BENNETT, R.W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. *Journal of Food Protection*, v.68, n.6, p.1264-1270, 2005.

BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: *Foodborne Diseases*. London: Academic Press.1990, p.85-106.

BOEREMA, J.A.; CLEMENS, R.; BRIGHTWELL, G. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, n.107, n.2, p.192-201, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 166, de 05 de maio de 1998. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 06 mai. 1998. Seção 1, p.42.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 56, de 107 de dezembro de 1999. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 08 dez. 1999. Seção 2, p.34.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 51, de 20 de setembro de 2002. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 21 set. 2002. Seção 1, p.13.

BRASIL^a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para

controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 18 de setembro de 2003. Seção 1, p.14.

BRASIL^b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Resolução no 3.088, de 25 de junho de 2003. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 26 jun 2003. Seção 1, p.23.

BRASIL^a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Ofício circular/DIPOA n°24, de 29 de junho de 2005. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 29 jun 2005.

BRASIL^b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Ofício circular/DIPOA n°46, de 30 de dezembro de 2005. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 30 dez 2005.

BRASIL. Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. *Perfil do Agronegócio 2003-2009*. Belo Horizonte, 2009. 142p.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P.; VERNEQUE, R.S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descido do leite. *Ciência Rural*, v.30, n.5, p.847-850, 2000.

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

CALSOLARI, R.A.O. *Determinação do perfil toxigênico em Staphylococcus aureus e estafilococos coagulase-negativa isolados de recém-nascidos pela técnica de RT-PCR*. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual de Paulista, Botucatu.

CARMO, L.S. *Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC₂, SED e toxina TSST-1 para uso em ensaios imuno-enzimáticos*. 2001. 250f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

CARMO, L.S.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V.R.; DIAS, R.S.; SOUZA, J.M.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; SHUPP, J.W.; PEREIRA, R.K.P.; JETT, M. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.1, n.4, p.241-246, 2004.

CARMO, L.S.; GUEDES, L.G.; BAMBIRRA, L.H.S.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; NICOLI, J.R. Produção de enterotoxina SEA e SEB em leite contaminado com as linhagens (FRI 722 e FRI S-6) produtoras respectivamente de enterotoxina SEA e SEB e uma linhagem de *Lactobacillus*. *Revista da Fundação Ezequiel Dias – Gestão, Ciência e Saúde*, v.4, n.1, 2009.

CARVALHO, M.P.; MARTINS, P.C.; WRIGHT, J.T.C.; SPERS, R.G. *Cenários do leite no Brasil em 2020*. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 2007. 190p.

CHOTÁR, M.; VIDOVÁ, B.; GODÁNY, A. Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. *Folia Microbiology*, v.51, n.6. p.639-646, 2006.

COSTA, E.O. Importância econômica da mastite infecciosa bovina. *Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v.15, n.1, p.21-26, 1991.

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

COUTO, I.; PEREIRA, S.; MIRAGAIA, M.; SANCHES, I.S.; LENCASTRE, H. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.9, p.3099-3103, 2001.

CUNHA, M.L.R.S. *Estafilococos enterotoxigênicos: efeito de cultura mista em leite, extrato de soja e parâmetros causadores de injúria celular*. 1992. 200f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CUNHA, M.L.R.S.; CALSOLARI, R.A.O.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Detection of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative staphylococci. *Microbiology and Immunology*, v.51, n.4, p.381-390, 2007.

CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.1, p.19-24, 2008.

CUNNIFF, P. (Ed.) *Official methods of analysis of the AOAC International*. 16 ed. Virginia: Association of Official Analytical Chemistry International, 1995, cap.17, p.32–34.

DAJANTA, K.; CHUKEATIROTE, E.; APICHARTSRANGKOON, A. Effect of lactoperoxidase system on keeping quality of raw cow's milk in Thailand. *International Journal of Dairy Science*, v.3, n.2, p.112-116, 2008.

DE BUYSER, M.L.; AUDINET, N.; DELBART, M.O.; MAIRE, M.; FRANÇOISE, F. Comparison of selective media to enumerate coagulase-positive

staphylococci in cheeses made from raw milk. *Food Microbiology*, v.15, n.3, p.339-346, 1998.

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

EDWIN, C.; TATINI, S.R.; MAHESWARAN, S.K. Specificity and cross-reactivity of staphylococcal enterotoxin A monoclonal antibodies with enterotoxins B, C¹, D, and E. *Applied and Environmental Microbiology*, v.52, n.6, p.1253-1257, 1986.

EUZÉBY, J. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. Validation list n° 132. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.60, p.469-472, 2010. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em 14 jun. 2010.

EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S.; BERGDOLL, M.S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology*, v.7, n.4, p.311-316, 1988.

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

FARBER, J.M.; GENDEL, S.M.; TYLER, K.D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W.; FRITSCHER, S.; BARRETT, T.J. Molecular typing and differentiation. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, APHA, 2001. Chap.11, p.127-158.

FONTANELI, R.S. *Produção de leite de vacas holandesas em pastagens tropicais perenes no planalto médio do Rio Grande do Sul*. 2005. 172f. Tese

(Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. *Microbiología de los Alimentos*. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 681p.

FUJIKAWA, H.; IGARASHI, H. Rapid latex agglutination test for detection of staphylococcal enterotoxins A to E that uses high-density latex particles. *Applied and Environmental Microbiology*, v.54, n.10, p.2345-2348, 1988.

FUJIKAWA, H.; MOROZUMI, S. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *Food Microbiology*, v.23, n.3, p.260-267, 2006.

GIEZENDANNER, N.; MEYER, B.; GORT, M.; MÜLLER, P.; ZWEIFEL, C. Raw milk-associated *Staphylococcus aureus* intoxication in children. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, v.151, n.7, p.329-331, 2009.

GODKIN, M.A.; LESLIE, K.E. Culture of bulk tank milk as a mastitis screening test: a brief review. *The Canadian Veterinary Journal*, v.34, n.10, p.601-605, 1993.

GOODMAN, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Annals of Mathematical Statistics*, v.35, n.2, p.716-725, 1964.

GOODMAN, L.A. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics*, v.7, n.2, p.247-254, 1965.

ISIGIDI, B.K.; DEVRIESE, L.A.; CROEGAERT, T.H.; VAN HOOFF, J. A highly selective two-stage isolation method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods. *Journal of Applied Bacteriology*, v.66, n.5, p.379–384, 1989.

JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, E.P.; ASHTON, F.E.; POLLARD, D.R.; ROZEE, K.R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic

shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, n.3, p.426-430, 1991.

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

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas colorido*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 2008. 1760p.

KOTB, M. Bacterial pyrogenic exotoxins as superantigens. *Clinical Microbiology Reviews*, v.8, n.3, p.411-426, 1995.

KUMAR, P.A. Evaluation of PCR test for detecting major pathogens of bubaline mastitis directly from mastitic milk samples of buffaloes. *Tropical Animal Health and Production*, v.41, n.8, p.1643-1651, 2009.

LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S.; SANTOS, D.A.; PENNA, C.F.A.M.; 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 Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

LANGONI, H.; SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.20, n.5, p.204-209, 1998.

LIU, Z.M.; SHI, X.M.; PAN, F. Species-specific diagnostic marker for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v.59, n.4, p.379-382, 2007.

LOPES, A.D. *Caracterização de unidades produtoras de leite na área de abrangência do Escritório de Desenvolvimento Rural de Jaboticabal – SP.*

2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MAC FADDIN, J.F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins , 2000. 912p.

MARSHALL, R.T. (Ed.) *Standard methods for the examination of dairy products*. 16. ed. Washington: American Public Health Association, 1992, 546p.

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

MARTINS, P.C. O leite como instrumento de desenvolvimento regional. In: IX CONGRESSO PANAMERICANO DO LEITE, 9., 2006, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: Fepale, 2006. Cd 1.

MENDOZA, M.; MEUGNIER, H.; BES, M.; ETIENNE, J.; FRENEY, J. Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.48, n.3, p.1049-1055, 1998.

MEYRAND, A.; ATRACHE, V.; BAVAI, C.; MONTET, M.P.; VERNOZY-ROZAND, C. Evaluation of an alternative extraction procedure for enterotoxin determination in dairy products. *Letters in Applied Microbiology*, v.28, n.6, p.411-415, 1999.

MOTA, R.A.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; SILVA, D.R.; SILVEIRA, N.S.S.; GOMES, S.M.; SILVA, L.B.G.; CUNHA, A.P.; RABELO, S.S.A.; SILVA, K.P.C.; BARBOSA, M.A.G. Etiologia da mastite subclínica em bovinos da bacia leiteira do estado de Pernambuco. *Revista Napgama*, v.7, n.1, p.10-13, 2004.

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

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; PINTO, J.P.A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.25, n.1, p.191-195, 2005.

OLLIS, G.W.; RAWLUK, S.A.; SCHOONDERWOERD, M.; SHIPPER, C. Detection of *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk using modified Baird-Parker culture media. *The Canadian Veterinary Journal*, v.36, n.10, p.619–623, 1995.

PARK, C.E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, n.8, p.2509-2512, 1992.

PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K. Evolution of Comercial Enzyme Imunoassay Kit (RIDASCREEN) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A, B, C, D and E in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.60, n.2, p.677-681, 1994.

PEACOCK, S.J.; MOORE, C.E.; JUSTICE, A.; KANTZANOU, M.; STORY, L.; MACKIE, K.; O'NEIL, G.; DAY, N.P.J. Virulent combinations of adhesion and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, v.70, n.9, p.4987-4996, 2002.

PEREIRA, M.L.; HENEINE, L.G.D.; SANTOS, E.J.; CARMO, L.S.; PEREIRA, J.L.; BERGDOL, M.S. Prevention of nonspecific reactions on reversed passive latex agglutination assay (RPLA) for detecting low amounts of

staphylococcal enterotoxins. *Revista Latino-Americana de Microbiologia*, v.39, n.1-2, p.57-63, 1997.

PHILLIPS, K.M.; RUGGIO, D.M.; AMANNA, K.R. Extended validation of a simplified extraction and gravimetric determination of total fat to selected foods. *Journal of Food Lipids*, v.15, n.3, p.309-325, 2008.

PINTO, J.P.A.N.; IZIDORO, T.B. Qualidade do leite: a Instrução Normativa nº 51/MAPA e os novos paradigmas. *Higiene Alimentar*, v.21, n.156, p.14-16, 2007.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas*. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 512p.

RADOSTITIS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats*. 10. ed. Edinburgh: W.B. Saunders, 2007. 2156p.

RAUS, J.; LOVE, D.N. Characterization of coagulase-positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus aureus* isolated from veterinary clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v.18, n.4, p.789-792, 1983.

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

RIYAZ-UL-HASSAN, S.; VERMA, V.; QAZI, G.N. Evaluation of three different molecular markers for the detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Food Microbiology*, v.25, n.3, p.452-459, 2008.

ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Applied Microbiology*, v.28, n.6, p.946-950, 1974.

ROBERSON, J.R.; FOX, L.K.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive *Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, n.12, p.3217-3219, 1992.

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 toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.41, n.5, p.320-326, 2004.

SABOUR, P.M.; GILL, J.J.; LEPP, D.; PACAN, J.C.; AHMED, R.; DINGWELL, R.; LESLIE, K. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in eastern Canadian dairy herds. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p.3449-3455, 2004.

SANTOS, A.K.R. *Comparação entre os meios de cultura Baird-Parker, Baird-Parker – RPF e Petrifilmtm Staph Express na detecção de Staphylococcus coagulase positivo em leite cru naturalmente contaminado e em leite esterilizado inoculado com culturas específicas*. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SANTOS, M.V. Influência da qualidade do leite na manufatura e vida de prateleira dos produtos lácteos: papel das células somáticas. In: Brito, J.R.F.; Portugal, J.A.B. (Org.). *Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003, v.1, p.139-149.

SANTOS, M.V. Boas práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite. In: *O Brasil e a nova era do mercado do leite: Compreender para competir*. 1 ed. Piracicaba: Agripoint Ltda, 2007. v.1, p.135-154.

SANTOS, N.W.; WEIRICH NETO, P.H.; LODDI, M.M.; ROCHA, C.H. Tecnologia desmistificada como base de extensão rural. *Revista Conexão UEPG*, Ed.5, n.1, p.70-74, 2009.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 1997. 295p.

SOUZA, V.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; CERESER, N.D. Características microbiológicas de amostras de leite de tanque comunitário. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.3, p.758-761, 2009.

SPERO, L.; MORLOCK, B.A.; METZGER, J.F. On the cross-reactivity of staphylococcal enterotoxins A, B e C¹. *The Journal of Immunology*, v.120, n.1, p.86-89, 1978.

STRAUB, J.A.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *Journal of Food Protection*, v.62, n.10, p.1150-1156, 1999.

TSEN, H.Y.; CHEN, T.R. Use of polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.37, n.5, p.685-690, 1992.

VASCONCELOS, N.G.; CUNHA, M.L.R.S. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. *Journal of Public Health and Epidemiology*, v.2, n.3, p.29-42, 2010.

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, p.577-585, 2007.

ZANGERL, P. Comparison of Baird-Parker agar and rabbit plasma fibrinogen medium for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in raw milk and raw milk products. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, v.50, n.1, p.4– 9, 1999.

ZAR, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4 ed. New Jersey: Prentice-Hall,. 929p.

ZOCCAL, R.; SOUZA, A.D.; GOMES, A.T.; LEITE, J.L.B. Produção de leite na agricultura familiar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 42, 2004, Cuiabá, *Anais...* Cuiabá: SOBER, 2004. p. 413.

*T*rabalho Científico

24 can be difficult in microorganism low counts, with contaminant growth that
25 makes colonies visualization hard on Baird Parker agar and the presence of *S.*
26 *aureus* with atypical biochemical profile. The study aim was to standardize and
27 to compare *S. aureus* detection directly from bulk tank milk by PCR and
28 traditional microbiological methods. We studied 104 fresh milk samples
29 originating from 35 dairy farms and after 5-hour storage at 7 °C and 25 °C,
30 concurrently, totalizing 312 samples. Cultivation on Baird Parker agar and the
31 molecular diagnosis using specie-specific *S. aureus* primers were carried out.
32 PCR demonstrated sensitivity of 0.5 CFU/mL, detecting 99.04% of positive
33 samples that presented microbiological exam counts ranging from zero to
34 496000 CFU/mL. Microbiological exam presented *S. aureus* growth only in
35 56.41% of samples. Between the results of PCR and microbiological exam the
36 concordance was 52.88% in fresh samples, 58.65% after storage at 7 °C and
37 60.58% after storage at 25 °C. PCR proved to be more sensitive than traditional
38 microbiological exam and it can be used to the diagnosis and screening of *S.*
39 *aureus* in dairy farms.

40

41 Keywords: bulk tank milk, dairy herd, microbiology, milk, PCR, *Staphylococcus*
42 *aureus*

43

44 **1. Introduction**

45 *Staphylococcus aureus* is one of the main agents of mastitis and has
46 importance in public health for producing enterotoxins which causes food
47 poisoning (Asao et al., 2003; Sabour et al., 2004).

48 For the diagnosis of this microorganism in dairy herds it is interesting to
49 use tests that are able to detect it in bulk tank milk. The culture of bulk tank milk
50 samples is a useful technique for screening the main mastitis pathogens on
51 herds. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*, if identified on a
52 culture of bulk tank milk sample, certainly indicate udder infection. These
53 samples are readily obtained, can quickly and inexpensively screen a large
54 number of herds, yet the performance of the test to classify the herds correctly
55 according their infection status (Godkin and Leslie, 1993). However, it is a
56 technique with low sensitivity and high specificity.

57 On the other hand, PCR is a viable alternative to traditional
58 microbiological methods for the microbiological diagnosis due to higher speed,
59 excellent sensitivity and specificity and its automation potential (Silva and
60 Granda, 2004).

61

62 **2. Material and methods**

63 A total of 104 samples of 250 mL of bulk tank milk from 35 dairy farms,
64 selected previously for having infected cows with *S. aureus*, were collected.
65 These farms were visited three times, exception for one of them. The *S. aureus*
66 detection by PCR and microbiological exam were carried out, concurrently.
67 These samples were analyzed in three moments (M), fresh (M0) and after 5-
68 hour storage at 7 °C (M7) and 25 °C (M25), totalizing 312 samples studied.

69

70 **2.1. Study of *S. aureus* by traditional microbiological exam**

71 The traditional exam was carried out on Baird Parker agar with
72 distribution of 100 µL of pure milk and its dilutions in saline solution (0.85%) at

73 10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3} . The colonies confirmation as *S. aureus* was carried out with
74 evaluation of morphological aspects, Gram stain, catalase test, tube coagulase
75 test, fermentation of trehalose, maltose and mannitol, polymyxin B (300 UI)
76 resistance and acetoin production (Winn et al., 2006). The count was calculated
77 by using the criterions described by Silva et al. (1997).

78

79 **2.2. DNA extraction**

80 The extraction was carried out with blood extraction kit (Illustra Blood
81 GenomicPrep Mini Spin[®], GE Healthcare) with some modifications on initial
82 steps: on one 1.5 mL microtube, 900 μ L of milk sample was added, spinning at
83 14.000 g for 2 minutes, sobrenadant was eliminated by inversion keeping the
84 pellet, fat was removed from the tube wall with sterile swab (individual), 40 μ L of
85 lysozyme buffer was added, mixing immediately in vortex, 10 μ L of lysozyme
86 (10 mg/mL) was added and mixed in vortex, incubating at room temperature for
87 15 minutes with intermittent vortexing, 10 μ L of proteinase K (20 mg/mL) was
88 added, mixing in vortex, incubating at 56 °C from 15 minutes to 30 minutes, with
89 intermittent vortexing, up to pellet dissolution. From this step on, the instructions
90 to use the kit were followed until item "blood cell lysis". Elution was proceeded
91 with 100 μ l of *Elution Buffer* at 70 °C.

92

93 **2.3. Polymerase chain reaction**

94 Amplifications were performed in 0.5 mL microtube containing 23 μ l of a
95 mix composed of PCR buffer 1x (20 mM Tris-HCl, pH 8.4; 50 mM KCl), 5 pmol
96 of each primer, 1.25U of Platinum[®] *Taq* DNA polymerase, 200 μ M of dNTP and
97 0.75 mM of MgCl₂, added of 3 μ l of DNA.

98 Primers Staur4 (5'-ACGGAGTTACAAAGGACGAC-3') and Staur6 (5'-
99 AGCTCAGCCTTAACGAGTAC-3') to *S. aureus* detection were chosen according
100 to Straub et al. (1999) results and they amplify a conserved fragment of 1250 pb
101 from ribosomal DNA.

102 Thermocycler parameters were initial denaturation at 94 °C for 4 minutes,
103 denaturation at 94 °C for 45 seconds, annealing at 64 °C for 1 minute and
104 extension at 72 °C for 2 minutes for 35 cycles. A final extension was realized at
105 72 °C for 10 minutes (Kumar, 2009).

106 Agarose gel 2% was prepared on TBE buffer 1,0x added of SYBER®
107 Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®) in concentration of 1µl in 10 mL of gel. We
108 used 15 µl of amplicon and 2 µl of ladder 100pb (GE®). For each sample 2 µl of
109 loading buffer were added. Electrophoretic run was carried out in a cube
110 containing TBE buffer 0.5 at 110V. Gel was captured on UV transillumination.

111

112 3. Results

113 PCR presented detection limit of 1 pg/µl of DNA and 0.5 CFU/mL of milk,
114 being positive in 309 (99.04%) samples while microbiological exam was able to
115 detect only 176 (56.41%) samples of milk. The three negative samples on PCR
116 were also negative on microbiological exam. There was concordance between
117 PCR and microbiological exam in 57.37% of samples (Table 1).

118 Evaluating the results of the tests in the three moments we verify that
119 there were not changes on PCR results, but there was an increase in the
120 number of samples with growth on microbiological exam. Concordance was
121 52.88% at M0, 58.65% at M7 and 60.58% at M25 (Table 2).

122 The three negative samples on *S. aureus* PCR were also negative on
123 microbiological exam. PCR detected *S. aureus* in milk samples with counts of
124 this microorganism ranging from zero to 496000 CFU/mL (Table 3).

125 The incubation, mainly at 25 °C, favored growth of contaminant bacteria and
126 complicated typical and atypical colonies visualization (Figure 1).

127

128 **4. Discussion**

129 Traditional microbiological exam is important to *S. aureus* study in bulk tank
130 milk samples because it is the gold-standard and is able to evaluate the cells
131 viability and to permit individual characterization of isolates. The culture medium
132 indicated to isolation and count is Baird Parker agar because it permits the
133 recovery of injured cells (Marshall, 1992) and is the recommended medium for
134 Brazilian governmental agencies (Brasil, 2003). However, in the present study
135 this medium was not completely selective, which was observed by several
136 authors (Isigidi et al., 1989; Ollis et al., 1995; De Buyser et al., 1998; Zangerl,
137 1999; Santos, 2008), permitting growth of environmental microorganisms
138 present in milk such as *Bacillus* spp. and *Enterococcus faecalis*, which
139 complicates the typical and atypical colonies selection and count, mainly in
140 samples previously exposed to elevated temperatures (Ollis et al., 1995).

141 On the basis of the above consideration, the microbiological exam to *S.*
142 *aureus* detection did not present a good result, being negative in several
143 samples (42.63%), which were considered positives on PCR. Godkin and Leslie
144 (1993) and Ollis et al. (2005) discussed this question of low sensitivity and high
145 specificity with the isolation of this agent in simple culture of bulk tank milk when
146 compared to individual cultures of the animals.

147 PCR proved to be a sensitive and specific technique, of easy
148 performance, which was observed by various authors who search to find even
149 more specific markers to correctly identify this species as in pure culture (Liu et
150 al., 2007; Ul-Hassan et al., 2008) as in milk and dairy products (Riffon et al.,
151 2001; Chotár et al., 2006). This markers actualization must be done constantly,
152 considering the genetic variability within the same species as time passes. To
153 exemplify, primers Sa442-1 and Sa442-2 *S. aureus*-specific developed by
154 Martineau et al. (1998) failed to confirm a clinical isolate for the absence of
155 Sa442 fragment, target of the primers (Klaassen et al., 2003).

156 Considering all the techniques' characteristics and results of the present
157 study the advantages of PCR on *S. aureus* identification is reinforced, since the
158 microbiological exam needs phenotypic methods, including biochemical tests
159 that demand expression of characteristics. Straub et al. (1999) developed
160 primers *S. aureus*-specifics Staur-4 and Staur-6 and confirmed 100% of
161 specificity by testing with 9 strains of *S. aureus* and 23 strains of other
162 *Staphylococcus* genus species. Kumar et al. (2009) with these same primers
163 obtained detection limit of $5,5 \times 10^1$ CFU/mL of milk inoculated experimentally.

164 On detection of *Staphylococcus aureus* directly from milk the PCR
165 standardization presented lower detection limit when compared to other authors
166 (Kumar et al., 2009), and it can be used in samples with low quantity of
167 microorganism.

168 In the three moments there was no difference in total of milk samples
169 positive to *S. aureus* by PCR, with only one negative sample at each moment.
170 The negative sample at M0 was also negative on microbiological exam. After
171 incubation, at M7 and M25, there was detection by PCR and microbiological

172 test because the quantity of *S. aureus* reached the detection limit of these tests.
173 The positive sample at M0 and negative at M7 and M25 by PCR was negative
174 on microbiological exam in the three moments. *S. aureus* at M0 was probably in
175 low quantity, enough to be detected only by PCR, and at M7 e M25 it was in
176 inferior quantity necessary to detection by PCR and microbiological exam.

177 We observe, therefore, the concordance between PCR and
178 microbiological exam in negative samples. In positive samples by PCR there
179 was not good concordance with microbiological exam, because the second one
180 did not detect *S. aureus* in 176 (56.41%) samples in which PCR did detect it.
181 However, with the milk incubation the concordance between tests increased
182 gradually, ranging from 52.88 to 60.58%. The justification can be that agar Baird
183 Parker is not completely selective, which was verified in this study, and for high
184 TBC values (data not shown) indicating elevated contamination in milk samples,
185 which made the visualization of *S. aureus* difficult or impossible in some
186 situations.

187 PCR use is recommended to detection of *S. aureus* in bulk tank milk for
188 the selection of dairy farms with infected cows. Farms with positive results by
189 PCR can have a more complete evaluation and subsequent microorganism
190 isolation by traditional microbiological exam, permitting an epidemiological
191 survey more detailed.

192 **5. Conclusion**

193 The standardization proved the sensitivity and specificity of PCR to *S.*
194 *aureus* detection in bulk tank milk. This technique is able to detect 1 pg/ μ L of
195 DNA or 0.5 UFC/mL of milk and can be used for screening the agent on farms.

196

197 **Acknowledgements**

198 This study was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo
199 (FAPESP, Grant number 2007/00680-0). P.Y. Faccioli (Grant number
200 2009/51603-1) received financial support from FAPESP.

201

202 **6. References**

203 Asao , T., Kumeda, Y.; Kawai, T., Shibata, T., Oda, H., Haruki, K., Nakazawa,
204 H., Kozaki, S., 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning
205 due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk
206 and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* 130, 33–40.

207 Brasil, 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de
208 Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 62 de 26 de agosto de 2003.
209 Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para
210 controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial da União*. Brasília,
211 DF, 18 de setembro de 2003. Seção 1, p.14.

212 Chotár, M., Vidová, B., Godány, A., 2006. Development of specific and rapid
213 detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. *Folia Microbiol.* 51,
214 639-646.

215 De Buyser, M.L., Audinet, N., Delbart, M.O., Maire, M., Françoise, F., 1998.
216 Comparison of selective media to enumerate coagulase-positive staphylococci
217 in cheeses made from raw milk. *Food Microbiol.* 15, 339–346.

218 Godkin, M.A., Leslie, K.E., 1993. Culture of bulk tank milk as a mastitis
219 screening test: a brief review. *Can. Vet. J.* 34, 601-605.

- 220 Isigidi, B.K., Devriese, L.A., Croegaert, T.H., Van Hoof, J., 1989. A highly
221 selective two-stage isolation method for the enumeration of *Staphylococcus*
222 *aureus* in foods. J. Appl. Bacteriol. 66, 379–384.
- 223 Klaassen, C.H.W., Valk, H.A., Horrevorts, A.M., 2003. Clinical *Staphylococcus*
224 *aureus* isolate negative for the Sa442 fragment. J. Clin. Microbiol. 41, 4493.
- 225 Winn WC, Jr., Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop, G,
226 Schreckenberger PC, Woods G., 2006. Koneman's Color Atlas and Textbook of
227 Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 6th Edition.
228 1760p.
- 229 Kumar, P.A., 2009. Evaluation of PCR test for detecting major pathogens of
230 bubaline mastitis directly from mastitic milk samples of buffaloes. Trop. Anim.
231 Health and Prod. 41, 1643-1651.
- 232 Liu, Z.M., Shi, X.M., PAN, F., 2007. Species-specific diagnostic marker for rapid
233 identification of *Staphylococcus aureus*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 59, 379-
234 382.
- 235 Marshall, R.T., 1992. Standard methods for the examination of dairy products.
236 16. ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 546p.
- 237 Ollis, G.W., Rawluk, S.A., Schoonderwoerd, M., Shipper, C., 1995. Detection of
238 *Staphylococcus aureus* in bulk tank milk using modified Baird-Parker culture
239 media. Can. Vet. J. 36, 619–623.
- 240 Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dubreuil, P., Drolet, M., Lagacé, J., 2001.
241 Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens
242 in bovine mastitis by PCR. J. Clin. Microbiol. 39, 2584-2589.

- 243 Riyaz-UI-Hassan, S., Verma, V., Qazi, G.N., 2008. Evaluation of three different
244 molecular markers for the detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase
245 chain reaction. Food Microbiol. 25, 452-459.
- 246 Sabour, P.M., Gill, J.J., Lepp, D., Pacan, J.C., Ahmed, R., Dingwell, R., Leslie,
247 K., 2004. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* isolates
248 in eastern Canadian dairy herds. J. Clin. Microbiol. 42, 3449-3455.
- 249 2004
- 250 Silva, W.P., Gandra, E.A., 2004. Estafilococos coagulase positiva: patógenos
251 de importância em alimentos. Rev. Hig. Alim. 18, 32-40.
- 252 Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., 1997. Manual de Métodos de
253 Análise Microbiológica de Alimentos. Livraria Varela, São Paulo. 295p.
- 254 Straub, J.A., Hertel, C., Hammes, W.P., 1999. A 23S rDNA-targeted
255 polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus*
256 *aureus* in meat starter cultures and dairy products. J. Food Prot. 62, 1150-1156.
- 257 Zangerl, P., 1999. Comparison of Baird-Parker agar and rabbit plasma
258 fibrinogen medium for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in raw milk
259 and raw milk products. Archiv. Lebensm., 50, 4– 9.
- 260
- 261
- 262
- 263
- 264
- 265

266 **Tables**

267

268 Table 1. Distribution of microbiological exam and PCR results to *S. aureus*.

269 Botucatu, 2010.

PCR	Microbiological exam		Total (%)
	No growth (%)	Growth (%)	
Negative	3 (0,96)	0 (0,00)	3 (0,96)
Positive	133 (42,63)	176 (56,41)	309 (99,04)
Total	136 (43,59)	176 (56,41)	312 (100)

270

271 Table 2. Distribution of microbiological exam and PCR results to *S. aureus*

272 according the evaluation moment. Botucatu, 2010.

Moment	PCR	Microbiological exam		Total (%)
		No growth (%)	Growth (%)	
M0	Negative	1 (0,96)	0 (0,00)	1 (0,96)
	Positive	49 (47,12)	54 (51,92)	103 (99,04)
M7	Negative	1 (0,96)	0 (0,00)	1 (0,96)
	Positive	43 (41,35)	60 (57,69)	103 (99,04)
M25	Negative	1 (0,96)	0 (0,00)	1 (0,96)
	Positive	41 (39,42)	62 (59,62)	103 (99,04)
Total		136 (43,59)	176 (56,41)	312 (100,00)

273 M0 = fresh; M7 = after 5-hour storage at 7°C; M25 = after 5-hour storage at 25°C

274

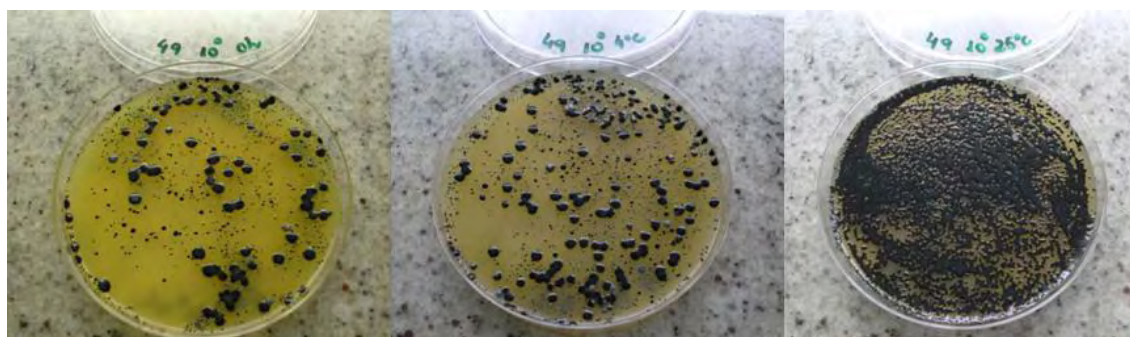
275 Table 3. Descriptive measures of *S. aureus* count (CFU/mL)
 276 according to PCR. Botucatu, 2010.

Descriptive measure	PCR	
	Negative (3)	Positive (309)
Minimum value	0,0	0,0
Median	0,0	30,0
Maximum value	0,0	496000,0
Mean	0,0	3896,0
Standard deviation	0,0	30493,2

277

278

279 **Illustration**



280

281 Figure 1. Growth dynamic of bacteria of pure milk sample (10^0) on agar Baird
 282 Parker fresh (0h) and after 5-hour storage at 4°C and 25°C.

Anexos

ANEXO I



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

Propriedade _____

____ Coleta do Experimento Data: de de 200__

Nome da propriedade: _____

Endereço: _____

Proprietário: _____

Responsável: _____

Telefone: _____

Número total de vacas: _____

Número de vacas em lactação: _____

Número de vacas secas: _____

Média produção por vaca: _____

Média produção por dia: _____

Tipo de tanque: Expansão individual
 Expansão comunitário
 Imersão individual
 Outro: _____

Tipo de ordenha: Manual
 Mecânica Qual? _____

Realiza: Lavagem dos tetos _____
 Pré-dipping _____
 Secagem dos tetos _____
 Pós-dipping _____
 Terapia da vaca seca _____
 Controle da CCS _____

Limpeza do estábulo: Boa Regular Não faz

Recebe assistência técnica: Não
 Comunitária
 Privada

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Zoonoses

Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 18618-000

☎ 14-3811-6270 – fax: 14-3811-7075 ✉ higtvet@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br