



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO SEMIÁRIDO

Renata de Moraes Peixoto Araújo

QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E FATORES DE VIRULÊNCIA
EM *Staphylococcus aureus* NO LEITE CRU BOVINO OBTIDO DE
LATÕES EM AFRÂNIO-PE

Petrolina - PE

2015

Renata de Moraes Peixoto Araújo

**QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E FATORES DE VIRULÊNCIA
EM *Staphylococcus aureus* NO LEITE CRU BOVINO OBTIDO DE
LATÕES EM AFRÂNIO-PE**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, *Campus* Ciências Agrárias, como requisito da obtenção de título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Moraes Peixoto

Petrolina - PE

2015

Araújo, Renata de Moraes Peixoto
A658q Qualidade higiênico-sanitária e fatores de virulência em
Staphylococcus aureus no leite cru bovino obtido de latões em
Afrânio-PE / Renata Araújo. – Petrolina, 2015

XVI; 85 f. : il. ; 29 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias no Semiárido) –
Universidade Federal do Vale do São Francisco, *Campus* Ciências
Agrárias, Petrolina-PE, 2015.
Orientador: Mateus Matiuzzi da Costa
Banca examinadora: Gisele Veneroni Gouveia, Josir Laine
Aparecida Veschi

Referências

1. Leite. 2. Mastite. 3. *S.aureus* I. Título. II. Univasf

CDD 637.127

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO SEMIÁRIDO

FOLHA DE APROVAÇÃO

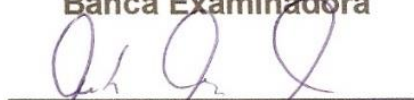
Renata de Moraes Peixoto Araújo

QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA E FATORES DE VIRULÊNCIA EM
Staphylococcus aureus NO LEITE CRU BOVINO OBTIDO DE LATÕES EM
AFRÂNIO-PE

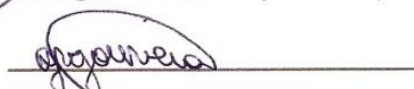
Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 28 de julho de 2015.

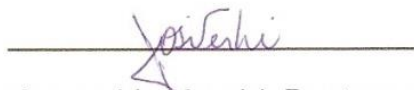
Banca Examinadora



(Mateus MatiuZZi da Costa, Doutor, UNIVASF).



(Gisele Veneroni Gouveia, Doutora, UNIVASF).



(Josir Laine Aparecida Veschi, Doutora, EMBRAPA).

Dedico,

À minha mãe, Maria de Lourdes.

AGRADECIMENTOS

“Esforça-te, e tem bom ânimo; não temas, nem te espantes; porque o SENHOR teu Deus é contigo, por onde quer que andares (Josué 1:9)”.

Agradecer as pessoas mais importantes da minha vida: a minha FAMÍLIA – MÃE (Maria de Lourdes de Moraes) a pessoa que é responsável por minha formação pessoal e profissional, uma mulher guerreira, que dedicou toda sua vida aos filhos; PAI (Antônio Peixoto Neto) o senhor também foi o responsável por minha formação pessoal e profissional; IRMÃO e co-orientador (Rodolfo de Moraes Peixoto) serei eternamente grata por ter você ao meu lado, tenho por você respeito e um carinho inexplicável, você é a minha referência como profissional; IRMÃ (Anne Caroline de Moraes Peixoto), muito obrigada por ser minha companheira e muito obrigada pela ajuda na confecção do trabalho. Agradecer a minha cunhada Luciana Jatobá, pelo amor, carinho e amizade, além da grande ajuda nas análises do trabalho. Agradecer ao nosso avô (Manoel Nunes de Moraes) por ser nosso exemplo de humildade e sabedoria. Agradecer a nossa avó (Maria Moraes, *in memoriam*) que foi uma mulher guerreira, a sua história está em nossos corações. Agradecer aos nossos vizinhos que fazem parte da família – Valdeci, José, Jéssica, Joselito, Júnior e Jeferson.

Agradecer a Cleiton Roberto (meu esposo) serei eternamente grata pelo seu esforço, carinho e amor. Agradecer a Carmelita Alves, Batista Araújo, Cleiane Araújo, Cleison Araújo e Rayanne Moreira, sou muito feliz por fazer parte dessa família.

Agradecer ao meu orientador, Prof. Mateus Matiuzzi da Costa. O Prof. Mateus já faz parte da minha história de vida profissional e pessoal, desde o terceiro período da faculdade compartilhando de muito conhecimento no Laboratório, sou muito grata por todas as oportunidades concedidas e pela confiança, o Prof. é um ser humano muito generoso, muito obrigada Prof. Mateus! Agradecer a Prof^a Gisele Veneroni Gouveia, pela participação na banca e pela grande ajuda no trabalho, a Prof^a Gisele é uma profissional muito competente e muito importante para nossa equipe do Laboratório. Agradecer a Dr^a Josir Laine Aparecida Veschi, pela participação na banca e a grande ajuda na parte escrita do trabalho. Agradecer com carinho a

Michelline Lins Silvério (PNPD do Laboratório) que também é uma profissional muito competente, querida e amiga.

Agradecer a todos os proprietários, juntamente com a Agroindústria de Afrânio-PE, que permitiram a visita e a coleta das amostras, meus sinceros agradecimentos. Agradecer ao Lídio Coelho (Veterinário da Prefeitura de Afrânio) que nos ajudou nas coletas juntamente com sua esposa, Lucy Mary Maciel.

Muito obrigada a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco-FACEPE, pela concessão da bolsa de Pós-graduação.

Agradecer aos colegas da turma pioneira do Mestrado em Ciências Veterinárias no Semiárido, desejo muito sucesso a todos vocês. Agradecer a Coordenadora da Pós-Graduação, a Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena que é uma profissional muito competente.

Muito obrigada a **TODAS** as pessoas que fazem parte do Laboratório de Microbiologia da UNIVASF/CCA, faço parte dessa equipe desde 2009. E agradecer a Ranna Santos, estudante de Iniciação Científica Júnior.

Agradecer aos anjos que tenho na vida, meus poucos e precisos amigos: Cristiane, Michelly, Gilane, Silvana, Sabrina, Laisa, Priscila, Milena e Valéria, agradeço a Deus por nossa amizade. Agradecer a Laíse, Ana Isabel e Amandinha, amigas que fiz na faculdade. Amigos novos que fiz no Inglês – Prof. Alan, Ellen, Thiago, Irene, Daniel e Nayara. Muito obrigada!

Agradecer aos servidores da UNIVASF tenho por eles, carinho, respeito e muita admiração (*in memoriam* Liria).

Ao Sistema Integrado de Bibliotecas da UNIVASF pela ajuda e orientação na confecção deste trabalho.

Epígrafe: “Só eu sei cada passo por mim dado,

nessa estrada esburacada que é a vida,

passei coisas que até mesmo Deus duvida,

fiquei triste, capiongo, aperriado,

porém, nunca me senti abandonado,

me agarrava sempre numa mão amiga,

e de força minha alma era munida,

pois do céu uma voz dizia assim:

-Suba os queixo, meta os pés, confie em Mim,

vá pra luta que eu cuido das feridas.”

Poeta cearense: Bráulio Bessa Uchoa

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade higiênico-sanitária do leite cru produzido em 44 propriedades no município de Afrânio. A contagem bacteriana total (CBT) foi realizada através da contagem padrão em placas (CPP) e da citometria de fluxo, sendo observada uma correlação positiva substancial ($r=0,61$, $p < 0,01$). Procedeu-se a pesquisa de *Staphylococcus* spp., coliformes totais, *Pseudomonas* spp. e *Streptococcus* spp. Na contagem de *Staphylococcus* spp. 20,4% (9/44) propriedades obtiveram contagens significativas para a produção de enterotoxinas estafilocócicas (ES). Na contagem de coliformes totais 56,8% (25/44) das amostras de leite analisadas apresentaram contagens superiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/mL. Não foi observado isolamento de *Pseudomonas* spp. A presença de *Streptococcus* spp., foi observada em 6,8% (3/44) das propriedades avaliadas, e o resultado do sequenciamento identificou as espécies como *Lactococcus lactis* e outras duas como *Enterococcus* spp. A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada através da citometria de fluxo, e 6,8% (3/44) das propriedades apresentaram valores superiores a um milhão de células mL⁻¹. Foram avaliados 58 isolados de *Staphylococcus* spp., os quais foram identificados genotipicamente como *S. aureus*. Desses isolados, não foi observada resistência frente à cefalotina e oxacilina, 62% (36/58) apresentaram resistência frente à ampicilina, amoxicilina e penicilina. De acordo com identificação genotípica aos beta-lactâmicos, 50% (29/58) dos isolados apresentaram o gene *blaZ*. Na caracterização fenotípica da formação de biofilme, 56,8% (33/58) dos isolados apresentaram produção moderada. Na caracterização genotípica de biofilme (*icaA*, *icaD* e *bap*), o gene *icaA* foi o mais representativo entre os isolados. Os resultados demonstraram que algumas propriedades leiteiras apresentaram baixa qualidade do leite produzido, sendo relevante a introdução de técnicas de manejo que reduzam a contaminação do leite.

Palavras-chave: Qualidade. Leite cru. Bovinos. Mastite. *S. aureus*.

ABSTRACT

The aim of this study were to evaluate the hygienic-sanitary quality of the raw milk produced in 44 properties in the municipality of Afrânio. The total bacterial count (TBC) was performed by standard plate count (SPC) and flow cytometry, it was observed a significant positive correlation ($r=0,61$, $p< 0,01$). Research was carried out of *Staphylococcus* spp., total coliform, *Pseudomonas* spp. and *Streptococcus*. The count of *Staphylococcus* spp, 20% (9/44) of properties obtained significant counts for production of staphylococcal enterotoxin (SE). The count of total coliforms, 56,8% (25/44) of analyzed milk presented counts higher than $1,0 \times 10^3$ UFC/mL. There was no observed the isolation of *Pseudomonas* spp. The presence of *Streptococcus* spp., it was observed in 6,8% (3/44) of properties, and the sequencing results identified the species as *Lactococcus lactis* and two other as *Enterococcus* spp. The somatic cell count (SCC) was performed by flow cytometry, and 6,8% (3/44) of the properties showed values high than millions cells mL^{-1} . Were evaluated 58 strains of *Staphylococcus* spp., which were genotypically identified as *S. aureus*. From these isolated, there was not resistance to cephalothin and oxacillin, 62% (36/58) showed resistance to ampicillin, amoxicillin and penicillin. According to genotypic identification of beta-lactams, 50% (29/58) of the isolates showed the *blaZ* gene. The phenotypic characterization of biofilm formation, 56,8% (33/58) of the isolates showed moderate production. In genotypic characterization of biofilm (*icaA*, *icaD* e *bap*), the *icaA* gene was the most representative among the isolates. The results showed that some properties showed low quality of the milk produced, being relevant the introduction of techniques of management that reduce the contamination of the milk.

Key-words: Quality. Raw milk. Bovine. Mastitis. *S. aureus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Percentual de resistência dos 58 isolados *S. aureus* frente aos antimicrobianos: CFL: cefalotina; AMP: ampicilina; AMO: amoxicilina; OXA: oxacilina; PEN: penicilina.....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores utilizados para amplificação dos genes <i>nuc</i> , <i>rdr</i> , 16S rRNA, <i>blaZ</i> , <i>icaA</i> , <i>icaD</i> e <i>bap</i>	50
Tabela 2 – Estatística descritiva com os resultados das variáveis obtidas em propriedades leiteiras no município de Afrânio, PE.....	58
Tabela 3 - Correlação entre variáveis produtivas e microbiológicas obtidas em propriedades leiteiras no município de Afrânio, PE.....	59
Tabela 4 - Descrição dos achados relacionados à produção de biofilme nos isolados provenientes de leite cru no município de Afrânio, 2014.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAO – do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

PE - Pernambuco

pH - Potencial Hidrogeniônico

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

IN - Instrução Normativa

° C – Grau Celsius

PNQL - Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite

CCS - Contagem de Células Somáticas

CBT - Contagem Bacteriana Total

UFC – Unidade Formadora de Colônia

ES - Enterotoxinas Estafilocócicas

CPP – Contagem Padrão em Placas

Cs – Células somáticas

mL - Mililitro

NMC – do inglês *National Mastitis Council*

spp. - Espécies

SCN - *Staphylococcus* coagulase negativo

IDF – do inglês *Internacional Dairy Federation*

CMT – do inglês *California Mastitis Test*

NAG-ase - N-acetil- β -Dglucominidase

LDH - Lactato desidrogenase

PCR – do inglês *Polymerase chain reaction*

WMT – do inglês *Wisconsin Mastitis Test*

NaOH - Hidróxido de sódio

Ig - Imunoglobulinas

PFA - Proteínas de fase aguda

Hp - Haptoglobina

bap – do inglês *Biofilm associated protein*

ica – do inglês *intercellular adhesin*

PBP - do inglês *penicillin-binding protein*

nm - Nanômetro

s/nº - Sem número

km - Kilometro

PCA – do inglês *Plate Count Ágar* (Ágar padrão para contagem)

VRB – do inglês *Violet Red Bile* (Ágar bile vermelho violeta)

MSA - do inglês *Mannitol Salt Agar* (Ágar sal manitol)

TSB - do inglês *Tryptone Soya Broth* (Caldo triptona de soja)

BHI - do inglês *Brain Heart Infusion* (Infusão de cérebro e coração)

L - Litro

H – Horas

PROGENE – Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco

CLSI – do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Mg - Magnésio

DO - Densidade óptica

TE – Tris e EDTA (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

SDS – do inglês *sodium dodecyl sulfate*

NaCl – Cloreto de Sódio

M - Molaridade

CTAB – do inglês *Cetyl trimethylammonium bromide*

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

IRMA - Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos

mM - Milimolar

pmol - Picomoles

U - Unidade

Taq – *Thermus aquaticus*

UV - Ultravioleta

ng - Nanograma

mg - Miligrama

pb – Pares de bases

g – Grama

MRSA - do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

μ - Micro

% - Porcentagem

® - Registrado

™ - *Trade Mark*

x - Multiplicação

< - Menor

> - Maior

\leq - Menor ou igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Produção de leite no Brasil e no Mundo	20
2.2	Qualidade do leite	21
2.3	Mastite bovina: aspectos econômicos da doença	26
2.4	Etiologia e epidemiologia da mastite bovina	27
2.5	Ferramentas diagnósticas empregadas	32
2.6	<i>Staphylococcus aureus</i> : fatores de virulência e genes de resistência	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	Locais de realização do experimento	40
3.2	Amostragem	40
3.3	Procedimento para coleta de amostra em latão	40
3.4	Análises laboratoriais	41
3.4.1	Contagem Padrão em Placas – CPP	41
3.4.2	Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp.	41
3.4.3	Contagem de coliformes totais	42
3.4.4	<i>Pseudomonas</i> spp.	42
3.4.5	<i>Streptococcus</i> spp.	42
3.5	Análises realizadas na PROGENE	43
3.5.1	Contagem Bacteriana Total (CBT)	43
	Composição (proteína e gordura) e Contagem Eletrônica de Células	43
3.5.2	Somáticas (CECS)	
3.6	Caracterização dos isolados bacterianos	43
3.6.1	Identificação fenotípica	43
3.6.2	Identificação genotípica – <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Streptococcus</i> spp.	44
3.6.2.1	Extração de DNA	44
3.6.2.2	Quantificação DNA	44
3.6.2.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	45
3.6.2.4	Identificação genotípica de <i>Staphylococcus</i> spp. – genes <i>nuc</i> e <i>rdr</i>	45
3.6.2.5	Identificação genotípica de <i>Streptococcus</i> spp. por sequenciamento de parte do gene rRNA 16S	46
3.7	Estudo da resistência bacteriana em isolados de <i>S. aureus</i>	46
3.7.1	Teste fenotípico de resistência aos beta-lactâmicos	46
3.7.2	Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos	47
3.7.3	Resistência aos beta-lactâmicos – gene <i>blaZ</i>	47
3.8	Produção de biofilme em <i>S. aureus</i>	47
3.8.1	Caracterização fenotípica da produção de biofilme	47
3.8.2	Caracterização genotípica da formação de biofilme - genes <i>icaA</i> , <i>icaD</i> e <i>bap</i>	48
3.9	Estatística	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
4.1	Contagem bacterina total	51

4.2	Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp.	53
4.3	Contagem de coliformes totais	54
4.4	<i>Pseudomonas</i> spp.	55
4.5	<i>Streptococcus</i> spp.	56
4.6	Contagem eletrônica de células somáticas - CECS	57
4.7	Teores de gordura e proteína no leite	58
4.8	Identificação genotípica de <i>Staphylococcus</i> spp. – genes <i>nuc</i> e <i>rdr</i>	59
4.9	Testes fenotípico e genotípico de resistência aos beta-lactâmicos	60
4.10	Caracterização fenotípica e genotípica da formação de biofilme	62
5	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICE A - Número de vacas e produção diária de leite por propriedade	84

1. INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais completos, devido aos seus valores nutritivos e energéticos e a sua composição físico-química. Sendo assim, o setor lácteo é muito relevante para o desenvolvimento econômico e social do Brasil. O país ocupa o sexto lugar com aproximadamente 34 milhões de toneladas na produção de leite e produtos lácteos segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2014). Contudo, a qualidade do leite constitui um dos principais problemas na cadeia láctea, a qual interfere negativamente na produção e rendimento de derivados (MATTOS et al., 2010).

Entre as características que definem a qualidade do leite, vem crescendo em importância a preocupação com as características microbiológicas (ARAÚJO et al., 2009). Sendo assim, é relevante a utilização de indicadores para monitoramento da qualidade microbiológica do leite cru refrigerado, dentre estes, estão: contagem de células somáticas (CCS), a contagem bacteriana total (CBT) que avalia a contaminação microbiana do leite e, paralelamente, uma avaliação de como é realizado o manejo da ordenha e o armazenamento do leite na propriedade rural (FONSECA e SANTOS, 2001; GARGOURI et al, 2013).

A Instrução Normativa 62 estabelecia que até 30 de Junho de 2015 os limites para CBT e CCS eram de $6,0 \times 10^5$, a partir de 01 de Julho de 2015 até 30 de Junho de 2017, o limite exigido é de $3,0 \times 10^5$ UFC/mL para CBT e $5,0 \times 10^5$ cs/mL para CCS. De modo geral, os parâmetros utilizados para avaliar o leite cru podem indicar: deficiências de manejo (falhas na higiene da ordenha), saúde da glândula mamária dos animais no rebanho, falhas no transporte e armazenamento do leite até seu beneficiamento. Outros parâmetros que podem auxiliar na avaliação da qualidade do leite são: contagem de bactérias psicotróficas, principalmente aquelas do gênero *Pseudomonas* (MOLINERI et al., 2012; SANTOS et al., 2013); contagem de coliformes, que indicam contaminação ambiental e fecal (RUEGG, 2003; GOTTARDI et al., 2008) e avaliação da presença de patógenos que causam mastite como o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (BRITO et al., 1998; FONSECA e SANTOS, 2001). Sendo assim, a mastite é o fator mais importante relacionado com a qualidade do leite produzido (OLIVER e MURINDA, 2012). A mastite é uma das principais causas de perda financeira para a indústria de laticínios e um desafio significativo para o produtor de leite (BRADLEY et al., 2014).

S. aureus continua a ser um dos principais patógenos nos casos de mastite bovina (CHAGAS et al., 2012; VEH et al., 2014), e sua prevalência pode estar relacionada aos mecanismos de resistência, tais como a presença do biofilme associados à redução da susceptibilidade aos antimicrobianos (MELO et al., 2013). O biofilme é definido como uma matriz de exopolissacarídeos sintetizados pelas células microbianas, considerado uma proteção contra condições adversas, entre estas, os antibióticos e as defesas do organismo (SUTHERLAND, 2001). A produção deste é controlada pelo *operon ica* (*icaADBC*) e a co-expressão dos genes *icaA* e *icaD* acarreta um aumento significativo na produção do polissacarídeo envolvido na maturação dos biofilmes, além destes o gene *bap* (*Biofilm Associated Protein - bap*) codifica a proteína associada ao biofilme (GERKE et al., 1998; ARCIOLA et al., 2012; CUCARELLA et al., 2004).

O tratamento da mastite consiste na utilização de antimicrobianos locais ou sistêmicos, dependendo do comprometimento do estado geral do animal acometido (JÚNIOR e BELOTI, 2012). O uso indiscriminado dessas drogas antimicrobianas acarreta uma seleção de cepas resistentes, característica esta que pode ser agravada pela produção de biofilme nos patógenos (KRYCHOWIAK et al., 2014).

A resistência aos antibióticos é codificada por vários genes, muitos dos quais podem ser transferidos entre bactérias (BLAIR et al., 2014). Tais genes podem ser responsáveis por controlar a síntese de enzimas (ex. beta-lactamases) capazes de se ligar e hidrolisar o anel beta-lactâmico presente nos antibióticos do grupo dos beta-lactâmicos, mediada pelo gene *blaZ* (LOWY, 2003; RICE, 2012).

Diante da influência que a mastite bovina tem na qualidade do leite, o presente trabalho teve como objetivos avaliar a qualidade higiênico-sanitária do leite produzido no município de Afrânio-PE por meio da Contagem Padrão em Placas-CPP (contagem de aeróbios mesófilos), da contagem de *Staphylococcus* spp. e coliformes totais, da presença de *Pseudomonas* spp. e *Streptococcus* spp., além de avaliar a Contagem Bacteriana Total (CBT) e a Contagem de Células Somáticas (CCS) por meio da técnica de citometria de fluxo. Além destes indicadores microbiológicos gerais, isolados de *S. aureus* foram analisados fenotipicamente quanto à resistência aos antimicrobianos e a produção de biofilme, e avaliados genotipicamente quanto à presença de gene de resistência aos beta-lactâmicos (*blaZ*) e genes envolvidos na produção de biofilme (*icaA*, *icaD* e *bap*).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção de leite no Brasil e no Mundo

O leite é um alimento que está associado com a história da humanidade, pois apresenta elevado valor nutricional, além de ser considerado relevante na produção de alimentos na maioria dos países (PAIVA et al. 2012; ADJLANE-KAOUCHE et al., 2014).

Segundo a FAO (2014), o continente Asiático é o maior produtor de leite com 305.7 milhões de toneladas, em segundo lugar está o continente Europeu com 219.9 milhões de toneladas e a América do Norte em terceiro lugar, seguido da América do Sul. Nos países da União Europeia, a produção é de 160.8 milhões de toneladas, seguido da Índia com 144.9 milhões de toneladas, em terceiro lugar está os Estados Unidos (93.9), em quarto lugar a China (45.2), seguida do Paquistão (38.7) e o Brasil ocupa o sexto lugar com 34.4 milhões de toneladas. Os maiores exportadores estão no continente Europeu com 23.9 milhões de toneladas (União Europeia) e a Oceania com 22.6 milhões de toneladas (com destaque da Nova Zelândia). O maior importador é o continente Asiático com 41.2 milhões de toneladas (China), seguido do continente Africano com 8.7 milhões de toneladas (FAO, 2014).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2014) a aquisição de leite cru no primeiro trimestre de 2014 pelas indústrias processadoras de leite foi de 6,2 bilhões e a maior parte é proveniente do Sudeste, que foi responsável por 41,4% da aquisição nacional de leite, seguido pela região Sul (33,8%) e Centro-oeste (14,7%). O Norte e Nordeste participaram com percentual de 5,0% cada. Minas Gerais é o estado que mais adquire leite, cerca de 27,6% do total nacional, seguido do Rio Grande do Sul com 13,7%, Paraná com 11,7%, Goiás com 11,1% e São Paulo com 10,3% de participação. Na Região Nordeste, os estados com maior aquisição de leite cru no primeiro trimestre de 2014, foi a Bahia com 93,9 milhões litros de leite, seguido do Ceará (61,1 milhões litros) e Pernambuco com 52,5 milhões litros.

Segundo o IBGE (2013) os maiores produtores de leite em Pernambuco estão no Agreste, sendo eles: Pedra com 58,6 milhões litros, Buíque com 51,3 milhões litros, Itaíba com 46,1 milhões. No Sertão Pernambucano existe a bacia leiteira de Afrânio, que possui uma produção de 1,343 milhões de litros de leite (IBGE, 2013).

2.2. Qualidade do Leite

A produção de leite é muito importante, tendo em vista as questões econômicas e nutricionais. Entretanto, a qualidade insatisfatória do leite produzido no Brasil é um problema crônico, de difícil solução, em que fatores de ordem social, econômica, cultural e até mesmo climática estão envolvidos e que não têm merecido a devida atenção das esferas políticas, apesar do relevante papel representado por este alimento para a população (ZENI et al., 2013). Segundo Verraes et al. (2014) e Tremonte et al., (2014), nos últimos anos têm havido um interesse crescente pelo consumo de alimentos minimamente processados, levando ao aumento da ingestão do leite cru, e o leite de vaca é o mais consumido pela população. Entretanto, o leite por ser um alimento muito rico em nutrientes, com alta atividade de água e pH próximo da neutralidade, apresenta as condições ideais para a proliferação de micro-organismos (SOUTO et al, 2009; ARCURI et al., 2006). Além disto, fatores como a qualidade bacteriológica da água, utensílios mal higienizados, estado de saúde e higiene dos ordenhadores e dos animais, contribuem de modo decisivo para a microbiologia do leite (ZENI et al., 2013).

Sendo assim, é imprescindível que os produtores sigam as normas exigidas pela legislação, para obter leite com maior qualidade. Rosa et al. (2012) afirmam que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o responsável pela regulamentação da produção, do transporte e do processamento do leite com o intuito de aplicar medidas que visem o aumento da qualidade do leite que é produzido no Brasil. Uma vez que a Instrução Normativa n.º 62 aprova o Regulamento Técnico de Produção Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, estabelecendo padrões mínimos de qualidade para que o leite seja comercializado (BRASIL, 2011).

Uma questão relevante na produção de leite é a qualidade do leite cru, por ser a matéria-prima dos derivados lácteos (NORNBERG et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2013). O leite cru refrigerado é definido pela IN 62 como leite mantido em temperatura constante (7°C na propriedade rural/tanque comunitário e 10°C no estabelecimento processador) que deve ser transportado em veículo com tanque

isotérmico da propriedade rural para um posto de refrigeração de leite ou estabelecimento industrial adequado para, então, ser processado (BRASIL, 2011). Contudo, alguns produtores fazem o uso de latões/tarros para o envio do leite até o estabelecimento processador. A IN 62 admite o uso destes latões/tarros em temperatura ambiente, desde que, o estabelecimento processador esteja de acordo, e que o leite seja entregue até no máximo duas horas após a ordenha (BRASIL, 2011).

Apesar da existência da IN 62, que instrui sobre a obtenção de leite com mais qualidade, diversos trabalhos publicados sobre a qualidade do leite cru produzido no Brasil denotam uma realidade diferente, visto que o assunto é considerado complexo dado à multiplicidade do sistema de produção, de propriedades e produtores de leite (FAGUNDES et al., 2006). O Plano Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL) foi implementado em 2000, visando a melhoria na qualidade do leite além dos padrões da IN vigente, em que, um dos seus objetivos se referia ao sistema de pagamento pelo aumento dos componentes desejáveis (proteína, gordura e demais sólidos) e redução dos componentes indesejáveis (CCS- Contagem de Células Somáticas e CBT – Contagem Bacteriana Total), sistema esse que foi adotado por diversos países desenvolvidos, com a obtenção de resultados satisfatórios (MACHADO, 2008).

Em relação à composição do leite, sabe-se é composto por inúmeras moléculas. O conhecimento sobre os componentes desejáveis do leite é de grande importância para a indústria, a qual depende de uma matéria prima de qualidade para a produção de derivados lácteos (FONSECA e SANTOS, 2001). Sabe-se ainda que, a composição do leite depende de alguns fatores como: raça, manejo de ordenha, alimentação, além de fatores microbiológicos, em que, a presença de determinados micro-organismos podem ocasionar hidrólise de proteínas e lipídios (RIBEIRO NETO et al., 2012; VARGAS et al., 2002; FONSECA e SANTOS, 2001). A IN 62 além de atribuir normas para a CCS e CBT, possui também requisitos mínimos para proteína e gordura, as quais devem ter valor mínimo de 2,9g/10g e 3,0g/100g respectivamente (BRASIL, 2011).

Segundo Guimarães et al. (2013) a qualidade do leite cru é medida segundo padrões físico-químicos pelo teor de proteínas e gordura, uma vez que afetam diretamente o rendimento industrial dos derivados lácteos; e padrões microbiológicos como CBT, CCS e o nível de psicrotóxicos (bactérias resistentes à

refrigeração), que afetam negativamente o processo e a qualidade do produto final. Ruegg (2003), afirma que as contagens de coliformes no leite do tanque devem ser realizadas de forma rotineira como um indicador de contaminação fecal. Guerreiro et al. (2005) descrevem que durante o intervalo entre as ordenhas, enquanto as vacas estão deitadas, ocorre excessiva contaminação da pele dos tetos e do úbere, principalmente se o ambiente estiver muito contaminado.

Outro fator importante é realizar contagem de *Staphylococcus* spp., dentre estes, os *S. aureus* são encontrados com frequência em leite de tanque e são a principal causa de mastite em vacas leiteiras no mundo (OLIVER et al., 2005) e, conseqüentemente, acarretam um aumento na contagem de células somáticas (JAYARAO et al., 2004). São micro-organismos patogênicos de origem alimentar, responsáveis por uma diversidade de doenças (JAMALI et al., 2015). Segundo Borges et al. (2008), os *Staphylococcus* spp. quando presentes em populações elevadas (10^5 - 10^6 UFC mL⁻¹) e sob condições favoráveis (temperatura, pH, atividade de água e oxigênio), são capazes de produzir as enterotoxinas estafilocócicas (ES) nos alimentos, as quais depois de ingeridas podem causar intoxicação. Segundo Oliver et al. (2005) a prevalência de bactérias patogênicas de origem alimentar em leite pode ser influenciada por diversos fatores, tais como o tamanho da propriedade, número de animais no rebanho, higiene, práticas agrícolas, variação da amostragem e tipos de amostras avaliadas, além das diferentes metodologias utilizadas na detecção, localização geográfica e o período/estação do ano. Verraes et al. (2014) afirma que a contaminação do leite cru por bactérias patogênicas se dá por meio dos animais (mesmo clinicamente saudáveis) ou durante a coleta e armazenamento do leite. Segundo Fonseca e Santos (2001), a contaminação pode ser proveniente do contato com lama e fezes.

Segundo Hayes et al. (2001), a CBT auxilia como um parâmetro da saúde do rebanho, da eficácia do saneamento da propriedade, do manuseio do leite e da temperatura de armazenamento. Para Fonseca e Santos (2001) a carga bacteriana do leite é uma variável, dependente da carga bacteriana inicial e da taxa de multiplicação dos micro-organismos, desta forma, a carga bacteriana inicial é definida como a concentração de micro-organismos existentes logo após a ordenha que depende de quatro fatores: carga microbiana no interior da glândula mamária (saúde do rebanho relacionada a mastite), higiene de ordenha (desinfecção da superfície dos tetos), limpeza dos utensílios e equipamentos de ordenha e, por fim, a

qualidade da água utilizada na lavagem dos tetos e do sistema de ordenha. Contudo, raramente uma alta contagem na CBT é decorrente de problemas de mastite na propriedade, sendo, portanto, mais associada com a ordenha realizada com os tetos sujos.

O aumento da CCS é a consequência de um processo inflamatório, devido à presença de uma infecção intramamária ou sob condições não patológicas decorrentes de processos fisiológicos, tais como estro ou avançado estágio de lactação (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007). Devido à reação inflamatória, por infecções bacterianas, ocorre um influxo das células de defesa (neutrófilo polimorfonuclear, outros leucócitos e fagócitos) e, alguns deles, localizam-se dentro dos alvéolos, acarretando no aumento da CCS (YEUNG, 2012). Segundo Zanela et al. (2006), a CCS é considerada normal para tanque de mistura, quando menor ou igual a 300 mil células mL⁻¹; valores superiores a um milhão de células mL⁻¹ representam ocorrência de mastite. Bozo et al. (2013) observaram que o estabelecimento que realiza boas práticas na ordenha, manutenção e higienização dos equipamentos e o monitoramento da sanidade da glândula mamária permitem a redução na CBT e na CCS.

Segundo Izidoro et al. (2013) o grupo das bactérias psicotróficas é o mais impactante na indústria de laticínios. Apesar da melhoria na qualidade do leite cru com uso da refrigeração, o resfriamento associado com práticas na coleta e armazenamento do leite cru favoreceu o crescimento das bactérias psicotróficas em temperaturas abaixo de 7°C (MUNSCH-ALATOSSAVA e ALATOSSAVA, 2006), principalmente as do gênero *Pseudomonas* (LAFARGE et al., 2004). Estes micro-organismos provocam deterioração do leite por meio das proteases, lipases e fosfolipases, acarretando diminuição da *shelf-life* (vida de prateleira) (BRAUN et al., 1999), uma vez que essas enzimas são termo-resistentes (SORHAUG e STEPANIAK, 1997). *Pseudomonas* spp. é considerado como o micro-organismo que possui maior atividade metabólica no leite (tendência a lipolítica) (NORNBERG et al., 2010). Com isso, é considerado imprudência utilizar o leite cru com contagem de psicotróficos superior a 5,0x10⁶UFC/mL para fabricação de produtos lácteos (PINTO et al., 2006). A contaminação do leite por *Pseudomonas* spp. ocorre devido a má higienização dos equipamentos de ordenha e problemas durante o armazenamento e transporte (MUNSCH-ALATOSSAVA e ALATOSSAVA, 2006).

De acordo com Brito e Brito (2015) o *status* sanitário do animal, o ambiente do curral e o local da ordenha, os procedimentos utilizados na higienização e desinfecção dos equipamentos de ordenha, tanque de refrigeração e utensílios que são intimamente relacionados com leite, são relevantes quanto à contaminação microbiana do leite cru. Sendo assim, a IN 62 estabelecia que até 30 de Junho de 2015 o limite para CBT e CCS (por propriedade rural ou por tanque comunitário) era de $6,0 \times 10^5$ /mL, a partir de 01 de Julho de 2015 até 30 de Junho de 2017, o limite exigido é de $3,0 \times 10^5$ UFC/mL para CBT e $5,0 \times 10^5$ cs/mL para CCS. A contagem padrão em placas (CPP) é o método de referência para a CBT, contudo, em decorrência do tempo na execução destes métodos de referência, metodologias mais rápidas baseadas na citometria de fluxo, têm sido realizadas para determinar a CBT (SAMPAIO et al., 2015; JAYARAO et al., 2004). A CBT é o principal indicador de qualidade utilizado internacionalmente e a CCS é um indicador menos restritivo, pois, a presença de células somáticas no leite não afeta a saúde humana, porém é considerado um indicador da sanidade e, indiretamente, do nível de utilização de antibióticos no rebanho (GUIMARÃES et al., 2013).

Quando o padrão brasileiro é comparado com os internacionais relacionados à CCS e CBT, a União Europeia exige 400 mil CCS (em cs/mL⁻¹), o Canadá < 500 mil células/mL e os Estados Unidos < 750 mil células/mL⁻¹, quanto à CBT, a União Europeia e os Estados Unidos exige valor inferior a 100 mil UFC/mL⁻¹ (ZANELA et al., 2006). Essa elevada exigência internacional confere maior qualidade ao leite, pois, entre os padrões que definem a qualidade do leite, está crescendo em importância a preocupação com as bactérias presentes no leite (ARAÚJO et al., 2009), dentre estas, as patogênicas, principalmente as que causam mastite (HAYES et al., 2001). Segundo Decimo et al., (2014) o estado de saúde do gado, a natureza de sua alimentação, e as condições de conservação do leite cru, são fatores importantes que determinam a composição da carga microbiana. De acordo com Langoni (2013), para melhorar a qualidade do leite e garantir um alimento seguro e de alto valor nutricional, é fundamental o controle da mastite nos animais do rebanho.

2.3. Mastite bovina: aspectos econômicos da doença

A mastite é a principal enfermidade que afeta os bovinos dos rebanhos leiteiros ao redor do mundo e, conseqüentemente, a doença que acarreta as maiores perdas econômicas na exploração de animais leiteiros (COSTA, 1998; FONSECA e SANTOS, 2001; BRADLEY, 2002; HALASA et al., 2007; LANGONI, 2013).

Em rebanhos sem um programa eficiente, cerca de 40% das vacas são infectadas em média de dois trimestres, estimando que a mastite custa cerca de US\$ 200 por vaca ao ano, segundo o *National Mastitis Council* (NMC, 2015), agravo este, representado principalmente por 70% de perda devido à diminuição na produção dos quartos com mastite subclínica; 8% pela perda por leite descartado por alteração e/ou pela presença de resíduos após tratamento; 8% pelos gastos com tratamentos (veterinários e medicamentos); 14% por morte ou descarte animal, ou ainda pela desvalorização comercial da vaca, por quartos inviáveis ou atrofiados (COSTA, 1998). Segundo Bennett et al. (1999), quanto aos custos relacionados as doenças endêmicas (diarreia viral bovina, fasciolose, laminite, leptospirose e mastite) do gado leiteiro no Reino Unido, a mastite possui maior custo em relação as outras doenças. No Brasil, pela alta prevalência da mastite nos rebanhos, pode ocorrer perda na produção entre 12% e 15%, significando um total de 2,8 bilhões de litros ao ano em relação à produção anual de 21 bilhões de litros de leite (FONSECA e SANTOS, 2001).

De acordo com Costa (1998), estimativas feitas em vários países calculam perdas por esse processo da ordem de 10% a 15% da produção. Segundo HALASA et al. (2007), os cálculos econômicos sobre a doença variam entre países e até entre as regiões de um mesmo país. Segundo Nielsen (2009), isso ocorre devido às diferenças na incidência de mastite, frequência do patógeno, a gravidade dos casos, o número de casos por vaca e manejo. Sendo assim, a fim de apoiar as decisões relativas ao manejo da mastite em rebanhos individuais as avaliações da perda econômica associada com a doença deve ser o mais específico possível (HOOGEVEEN, 2005).

As perdas econômicas são oriundas principalmente pela redução na produção e as alterações na composição do leite (SIMÕES e OLIVEIRA, 2012). Segundo Bradley (2002), é ainda mais difícil quantificar as perdas associadas à mastite

subclínica, as quais surgem com um resultado do tratamento, diminuição da produção e qualidade de leite, além do aumento da probabilidade de descarte. Em ambas (mastites clínicas e subclínicas) ocorrem as perdas econômicas (HOOGEVEEN, 2005). Contudo, o déficit na produção de leite se dá principalmente pela mastite subclínica (82%), e a mastite clínica representa apenas 18% das despesas totais (COSTA, 1998). Sendo assim, o principal objetivo em realizar uma análise econômica das perdas na produção, seria em apoiar as decisões com relação ao controle da mastite (HOOGEVEEN, 2005; NIELSEN, 2009; SINHA et al., 2014).

De acordo com Halasa et al. (2007), o controle da mastite se dá por meio do tratamento da doença clínica/subclínica e terapia da vaca seca; evitando a transmissão da infecção (vaca para vaca ou ambiente) e melhoria do sistema imune. Segundo Barbalho e Mota (2001), o controle da mastite nos rebanhos leiteiros constitui um relevante passo para a elaboração de produtos de boa qualidade e redução dos riscos à população. Contudo, bem como as implicações financeiras da mastite e sua importância em saúde pública não deve ser esquecida, pois, a propagação de micro-organismos de potencial zoonótico, embora raro com a pasteurização, continua a ser um risco, especialmente em locais que comercializam os produtos lácteos sem pasteurização, ou mesmo após falhas na pasteurização (BRADLEY, 2002).

2.4. Etiologia e epidemiologia da mastite bovina

Segundo descrição de Bradley (2002), a mastite é a inflamação da glândula mamária, de etiologia infecciosa ou não infecciosa. De acordo com Dibbern et al. (2015), a maioria dos casos da doença é ocasionada principalmente por bactérias. A mastite é classificada quanto a sua forma de manifestação e transmissão. Quanto à manifestação, tem-se a forma clínica, em que são observados os sinais clínicos (ex. edema, aumento da temperatura, alterações nas características do leite) e na forma subclínica, caracterizada por alterações na composição do leite (ex. aumento da CCS, redução nos teores da caseína, gordura) sem aparecimento de sinais clínicos evidentes e redução na produção de leite (FONSECA e SANTOS, 2001; RIBEIRO et al. 2003; MAHMMOD, 2013).

Quanto a sua forma de transmissão, a mastite contagiosa, geralmente não apresenta sinais clínicos, mas alta incidência em casos subclínicos; ocasionada por

patógenos do interior da glândula mamária e superfície dos tetos, a principal forma de transmissão ocorre durante a ordenha (mãos do ordenhador, o mesmo pano utilizado para secar o teto de várias vacas e teteiras de ordenhadeira mecânica) (FONSECA e SANTOS, 2001; FERGUSON et al., 2007). Já a mastite ambiental é ocasionada por agentes presentes no habitat da vaca, em esterco, urina, barro, ar, cama, água; de forma geral desencadeia casos clínicos e sua transmissão geralmente ocorre entre as ordenhas (COSTA, 1998; FONSECA e SANTOS, 2001). Segundo Costa et al. (1996) a infecção por agentes ambientais pode ocorrer, durante ou após a ordenha, no período seco ou depois do parto, e tem como fatores condicionantes, o período de lactação, época do ano, parto, instalações e manejo. Os patógenos ambientais são considerados invasores oportunistas da glândula mamária, não são adaptados para sobrevivência no organismo animal e em geral ocorre a invasão e multiplicação no hospedeiro, ocasionando uma resposta imune causando a eliminação do agente (BRADLEY, 2002). É importante ressaltar que a prevalência da mastite subclínica (90% a 95% dos casos) é maior que a forma clínica da doença (FONSECA e SANTOS, 2001). A mastite difere da maioria das outras doenças em animais, pois diversas bactérias são capazes de infectar o úbere (OLIVER e MURINDA, 2012).

Em classificação definida por Costa (1998) e Bradley (2002) os principais patógenos contagiosos são: *Staphylococcus* spp., *S. aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *S. agalactiae* e *Corynebacterium bovis*; e os principais patógenos ambientais compreendem as bactérias da família *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Serratia* spp.) *S. uberis*, *Actinomyces pyogenes*, *Pseudomonas* spp. e outros micro-organismos ubiqüitários tais como fungos, principalmente leveduras e algas aclorofladas, do gênero *Prototheca* spp. Outros autores descrevem que o *S. dysgalactiae* não deve ser considerado como sendo originário da glândula mamária, consideram-no como micro-organismo de origem ambiental (BRITO et al. 1998; FONSECA e SANTOS 2001). HOGAN et al., (2005) descrevem que a fonte desse patógeno pode ser úbere e o ambiente, ou seja, pode ser patógeno contagioso ou ambiental, podendo ser transmitido de vaca para vaca durante ordenha e vacas podem ser infectadas pelo ambiente.

As estratégias de controle são diferentes para patógenos contagiosos e ambientais, logo, uma cultura microbiológica do leite deve ser utilizada para definir a

prevalência de uma infecção contagiosa ou ambiental em um rebanho, auxiliando no desenvolvimento de um programa de controle da mastite (FERGUSON et al., 2007).

Segundo Rinaldi et al. (2010), mais de cem micro-organismos são capazes de causar mastite. Dentre os patógenos descritos, os do gênero *Staphylococcus* são os mais frequentemente isolados (COSTA, 1998; BUZZOLA et al., 2006) e representam grande importância epidemiológica e clínica nas mastites bovinas, de origem contagiosa (BARBALHO e MOTA 2001; ZASTEMPOWSKA et al., 2014). *S. aureus* é comumente isolado de mastite subclínica em bovinos, os quais são geralmente encontrados colonizando o canal do teto, o interior da glândula mamária ou a pele do teto (quando está lesada), por sua vez, são considerados os micro-organismos mais contagiosos, pois, sua transmissão ocorre principalmente por meio de fômites (mãos do ordenhador e panos de uso múltiplos), além de serem os agentes patogênicos mais importantes em humanos e animais, já que estudos epidemiológicos mostraram que a prevalência de *S. aureus* pode chegar a aproximadamente 50% (FONSECA e SANTOS, 2001; REINOSO et al., 2004; FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; FERREIRA et al., 2006; XUE et al., 2014; KLEIN et al., 2015). Para Veh et al. (2014), *S. aureus* é um importante agente etiológico da mastite bovina clínica e subclínica. Trata-se de uma bactéria gram-positiva que pertence à microbiota natural da pele humana intacta e saudável, no entanto, a presença de ferimentos ou alterações na fisiologia da pele podem tornar esta bactéria patogênica (KRYCHOWIAK et al., 2014). Segundo Williams (1963), os humanos agem como reservatório de *S. aureus*, uma vez que esta bactéria está presente nas narinas e nas mãos.

Em trabalho realizado em municípios do estado de Pernambuco o principal patógeno isolado do leite em vacas com mastite subclínica foi o *Staphylococcus* spp. (BARBALHO e MOTA 2001). Os autores afirmaram que existe uma correlação entre a formação de biofilme e a persistência do *S. aureus* na glândula mamária, geralmente ocasionando mastite crônica e, a maior frequência de isolamento de *S. aureus* pode estar relacionada com períodos de chuva (CUCARELLA et al., 2004; FERREIRA et al., 2006), provavelmente devido as condições de umidade e temperatura, as quais são favoráveis para sua proliferação (ZAFALON et al., 2008). Semelhante ao *S. aureus*, o *S. agalactiae* também é encontrado no interior da glândula mamária, a transmissão ocorre durante a ordenha e o ordenhador também tem papel fundamental na transmissão (FONSECA e SANTOS, 2001).

Alguns trabalhos demonstram isolamento de *Corynebacterium* spp. em casos de mastite subclínica (MARTINS et al., 2010), e clínica (OLIVEIRA et al., 2011). Em trabalho realizado na Finlândia, com dados coletados em seis anos (1995 a 2001) observaram que ocorreu uma maior prevalência de *C. bovis* ao contrário do número relativo de isolamentos de *S. aureus*, o qual ocorreu diminuição quando em comparação com estudos anteriores (PITKALA et al., 2004). Em trabalho realizado na Alemanha com amostras de leite de vacas clinicamente saudáveis, os estafilococos coagulase negativa e *C. bovis* foram os patógenos mais frequentemente isolados (TENHAGEN et al., 2006). A disseminação do *C. bovis* no rebanho ocorre durante o processo de ordenha, a qual quando realizada de maneira não higiênica e quando a desinfecção das tetas pós-ordenha não é realizada (MARTINS et al., 2010).

Já em trabalho realizado na região central do México, os patógenos mais isolados das amostras de leite de 535 vacas foram os SCN (*Staphylococcus* coagulase negativo) (LEÓN-GALVÁN et al., 2015). Segundo Zadoks e Watts (2009) existem estudos que consideram os SCN importantes patógenos causadores de mastite e outros consideram os SCN patógenos menores com impacto limitado, sob a qualidade do leite e saúde do úbere. Piessens et al. (2012) relataram que os SCN são comumente relacionados com mastite subclínica, porém, sua epidemiologia ainda não está bem estabelecida. Portanto, observa-se a possível transmissão de SCN por fontes ambientais, assim, avaliaram a diversidade genética destas bactérias de SCN a partir de amostras de leite e de ambiente e observou-se que o *S. haemolyticus* que causaram a mastite, possuíam um grande número de genótipos em diversos locais na fazenda, indicando que esta espécie é altamente versátil e oportunista e que pode adaptar-se a glândula mamária, assim como as condições do ambiente (PIESSENS et al., 2012).

Taponen et al. (2008) observaram que a origem de mastite por SCN pode variar dependendo da espécie. De acordo com Jaglic et al. (2010) a hipótese é de que o *S. epidermidis* possam ser introduzidos em um rebanho leiteiro por meio de fontes humanas, em especial os tratadores.

Nos últimos anos tem havido um foco maior sobre o papel dos SCN em mastite bovina (BEXIGA et al., 2014; HOSSEINZADEH e SAEI, 2014), sendo considerados como patógenos emergentes causadores de mastite (PYÖRÄLÄ e TAPONEN, 2009; MOTA et al., 2012). Segundo El-Jakee et al. (2013), os SCN são

oportunistas e possuem a capacidade de produzir biofilme na ordenhadeira, facilitando sua propagação. Björk et al, (2014) descrevem que é mais comum a mastite subclínica ocasionada por patógenos do grupo dos SCN em bovinos leiteiros em Uganda. Suspeita-se que a presença de biofilme afeta a severidade ou a persistência da mastite causada SCN, contudo, em pesquisa realizada na Finlândia com 244 SCN, não foi observada uma associação entre a capacidade de formar biofilme com a persistência do SCN na glândula mamária ou na gravidade da mastite (SIMOJOKI et al., 2012).

Sendo assim, várias espécies de SCN podem apresentar características diferentes relacionadas à cronicidade, ocasionar mastite clínica ou subclínica, além de ter prevalência variável entre países e regiões (PYÖRÄLÄ e TAPONEN, 2009). De acordo com Oliveira et al. (2011) os SCN são frequentemente isolados de animais de rebanhos leiteiros, geralmente associados à casos subclínicos ou clínicos de intensidade leve. Segundo Barbalho e Mota (2001) isso denota uma divergência em relação à frequência de bactérias isoladas do leite de vacas com mastite clínica e subclínica. Ou seja, isso seria um fator que sofre variação, logo, devem ser avaliados os fatores condicionantes de cada propriedade, e as características do patógeno envolvido além da resposta do animal à infecção.

Em relação a outros patógenos ambientais, existem dois grupos: coliformes e *Streptococcus* ambientais, no grupo dos coliformes estão a *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. (FONSECA e SANTOS 2001). As infecções por patógenos ambientais ocorrem no início da lactação, época quente e chuvosa, em vacas mais velhas e sistemas de manejo com falhas na higiene (FONSECA e SANTOS 2001). Em relação à *Pseudomonas* spp., este é um psicrotrófico encontrado na água e nas camas úmidas, assim, este micro-organismo alcança a glândula mamária após o contato com fontes ambientais, tais como cama molhada e água contaminada utilizada para lavar as tetas antes da ordenha, e a mangueira pode ser fonte de contaminação ocasionando geralmente a mastite clínica (HOGAN et al., 2005). A glândula mamária apresenta-se com hiperemia, edemaciada e sensível à palpação, constituindo um risco para saúde da glândula mamária pela dificuldade de tratamento (FERNANDES et al., 2009; COSTA et al., 1996). Em trabalho realizado por Fernandes et al. (2009), foi verificado surto de mastite por *Pseudomonas aeruginosa*, as quais, a multirresistência dos 19 isolados foi verificada para ampicilina, cefalexina, gentamicina, tetraciclina, penicilina/novobiocina e cloxacilina.

A diversidade, bem como a variação na prevalência e abundância de organismos causadores de mastite, bem como a variação da resposta do hospedeiro faz da mastite uma doença complexa que continua a ser um problema para a indústria de laticínios (THOMPSON-CRISPI et al., 2014).

2.5. Ferramentas diagnósticas empregadas

De acordo com Ribeiro et al. (2003), a etiologia da mastite é complexa e multivariada, sendo assim, torna-se importante a identificação dos micro-organismos que estão envolvidos na infecção, tanto para o controle, quanto para profilaxia e monitoramento dos rebanhos. A mastite subclínica demanda bastante atenção, devido à ausência de alterações visíveis na glândula mamária e no leite (PILLA et al., 2013). Assim, a disponibilidade de métodos de diagnósticos que possam indicar enfermidades subclínicas ou que avaliem a recuperação de medidas curativas são úteis na bovinocultura de leite, além de técnicas que sejam eficazes em identificar a mastite no início da infecção (AMARAL et al., 1995; BABAEI et al., 2007).

O exame microbiológico é considerado o método padrão ouro para determinação da saúde do úbere e para o diagnóstico da mastite bovina, porém, apesar de ser decisivo é considerado dispendioso, de resultado demorado, com desvantagens para fazendas com um número elevado de animais (RIBEIRO et al., 2003; BABAEI et al., 2007).

A *Internacional Dairy Federation* (IDF) recomenda o uso da CCS e análise bacteriológica para a determinação da saúde do úbere (HOGAN et al., 2005). Contudo, há uma ampla gama de procedimentos de diagnóstico para a mastite com diferentes princípios, que incluem: exame físico e clínico do úbere, CCS (método eletrônico), CMT (*California Mastitis Test*), teste da condutividade elétrica, medidor de pH, *Whiteside*, medição de N-acetil- β -Dglucominidase (NAG-ase), lactato desidrogenase (LDH), a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) entre outros, como o “teste da caneca de fundo preto”, WMT (*Wisconsin Mastitis Test*) e testes em amostras de tanque (FONSECA e SANTOS, 2001; MAHMMOD, 2013). Desta forma, cada procedimento possui suas próprias vantagens e desvantagens e muito dos fatores estão relacionados com o procedimento de coleta (conservação e análise no laboratório), grau de infecção e estado do úbere, tipo de patógeno causador e sua virulência e por fim a experiência do laboratorista (MAHMMOD, 2013).

Para detecção da mastite clínica pode ser realizado, o exame físico do úbere, no qual se observam alterações, tais como dor, rubor, consistência do tecido mamário/nódulos, edema, devendo este procedimento ser realizado com o úbere vazio, ou seja, logo após a ordenha; e o exame das características físicas do leite com o “teste da caneca de fundo preto”, em que nos casos de mastite clínica serão observados grumos, pus, sangue ou/e leite aquoso (FONSECA e SANTOS, 2001).

Para detecção da mastite subclínica, existe o CMT, que é considerado um dos testes mais populares e práticos, estimando uma contagem de células somáticas no leite, sendo realizado com um detergente neutro aniônico que é capaz de romper a membrana das células presentes na amostra, liberando o material genético e, conseqüentemente, promovendo variados graus de viscosidade no leite. Os resultados são expressos em cinco escores: negativo, traços, um, dois ou três sinais positivos (FONSECA e SANTOS, 2001).

O teste de WMT é considerado um aprimoramento do CMT, pois, eliminou a subjetividade do teste, sendo realizado em um tubo graduado com CMT e água destilada (1:1) (FONSECA e SANTOS, 2001).

De acordo com Akerstedt et al. (2007) a CCS do leite é o padrão ouro no diagnóstico da mastite subclínica. A CCS em amostras de leite de composição (leite de todos os quatro quartos) maior do que 200.000 células/mL é geralmente utilizada para indicar que um ou mais quartos estão infectadas (ROYSTER e WAGNER, 2015). Portanto, a importância de realizar a detecção de vacas com mastite subclínica e aparentemente sadias, pelo uso da CCS individual, é descobrir quais animais podem ser transmissores de infecção pela linha de ordenha ou pela mão do ordenhador (BARBOSA et al., 2009).

No entanto, a coleta de leite a granel também fornece informações relevantes (ARCURI et al., 2006). Desde o início de 1990, os pesquisadores utilizam o leite do tanque para diagnosticar problemas múltiplos, que podem existir em um rebanho leiteiro relacionada com a qualidade do leite e patógenos que podem causar mastite (JAYARAO et al., 2004). A CCS do tanque é um procedimento simples e de custo reduzido que é realizado enviando amostras de leite de tanque periodicamente para laboratório especializado, sendo possível a realização de cultivo microbiológico da amostra do leite de tanque como uma ferramenta simples, prática e de baixo custo que pode fornecer informações úteis sobre a saúde da glândula mamária do rebanho (FONSECA e SANTOS, 2001). Assim, os produtores de leite, veterinários e

os laticínios realizam análise do leite a granel como uma ferramenta para determinar a sua qualidade e solucionar problemas. Muitas cooperativas preocupadas com a qualidade do leite têm implementado essa análise para recompensar os produtores que se destacam na produção de leite pela alta qualidade e uma baixa incidência de mastite (JAYARAO et al., 2004).

Outro teste que é realizado em laboratório é o *Whiteside*, que consiste da mistura de leite com NaOH (Hidróxido de sódio), e a formação de grumos ou consistência filamentosa é interpretada como reação positiva e a ausência de grumos como negativa (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2008). Os testes da condutividade elétrica e pH, avaliam a reação inflamatória e/ou a extensão da lesão, pois, vacas com mastite apresentam alterações na carga iônica do leite em virtude da lesão no epitélio secretor e/ou alteração na permeabilidade vascular (FONSECA e SANTOS, 2001; FRAGA et al., 2009).

Além destas ferramentas diagnósticas, Amaral et al. (1995) descreveram que a presença de soroalbuminas e imunoglobulinas (Ig) no leite, em níveis não fisiológicos pode auxiliar na detecção precoce de infecções na glândula mamária, além de observarem que quanto maior a viscosidade no teste de CMT maior a quantidade de soroalbuminas e imunoglobulinas, indicando aumento na permeabilidade capilar e resposta específica a micro-organismos respectivamente. Segundo Funayama et al. (2006) quando ocorre um aumento na permeabilidade capilar ou alguma lesão nas glândulas mamárias há o extravasamento de proteínas plasmáticas, dentre elas, a albumina.

Existem enzimas presentes no leite mastítico que podem ser indicativo de mastite clínica e subclínica. Após a entrada de bactérias na glândula mamária, ocorre uma liberação de oxidantes e proteases que irão destruir as bactérias e algumas células epiteliais, ocasionando assim, redução na produção de leite e liberação de enzimas como a N-acetil- β -Dglucominidase (NAG-ase) e lactato desidrogenase (LDH) (VIGUIER et al., 2009). Chagunda et al. (2006) descreveram um modelo estatístico para detecção precoce da mastite, tendo como indicador a LDH, pois com a destruição do parênquima mamário como consequência do processo inflamatório, pode ocorrer liberação da enzima intracelular LDH, além de alterações nas concentrações dos minerais. Desta forma, do ponto de vista nutricional, o aumento da carga bacteriológica não só faz com que o leite seja impróprio para consumo humano, alterando a concentração de minerais do leite

(GUHA et al., 2012). Mohammadian (2011), concluiu que a origem do aumento da LDH no leite mastítico é oriunda dos leucócitos e de células parenquimatosas do úbere, assim, esse parâmetro teve potencial para detectar a mastite clínica e subclínica. Murata et al. (2004) descreveram que o papel fisiológico da LDH na defesa do hospedeiro durante inflamação não é bem compreendida.

Hiss et al. (2007) descrevem que além da LDH existe a haptoglobina (Hp) que pode ser utilizada como parâmetro para diagnóstico da mastite subclínica. As haptoglobinas são proteínas de fase aguda -PFAs- as quais são expelidas pelo fígado e outros tecidos em virtude de estímulos que afetam a estabilidade do sistema imune, geralmente infecções, inflamações e transtornos metabólicos (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2001).

Para Jayarao et al. (1991) e Mahmmod (2013) o diagnóstico molecular a exemplo da PCR, poderia ser a técnica mais apropriada para identificação das espécies de patógenos causadores de mastite, devido sua sensibilidade, rapidez e limitações existentes na cultura microbiológica, uma vez que é relatada a identificação errônea de certos patógenos através da caracterização bioquímica (DOMENICO et al., 2015). Assim, é descrito na literatura a utilização de genes responsáveis pela identificação molecular de espécies, como o gene *nuc* que é responsável por codificar uma nuclease termoestável (BRAKSTAD et al., 1992; PEPE et al., 2006; KATEETE et al., 2010; BORELLI et al., 2011) e o gene *rdt* (ribonucleosídeo difosfato redutase) (SHOME et al., 2012), cujas presenças identificam o micro-organismo como pertencente às espécies *S. aureus* ou *S. epidermidis*, respectivamente. Entretanto, os métodos diagnósticos mais precisos nem sempre podem ser executados, considerando as dificuldades inerentes à rotina de campo e seu alto custo (RIBEIRO JÚNIOR et al., 2008).

2.6. *Staphylococcus aureus*: fatores de virulência e genes de resistência

Dentre estas espécies causadoras de enfermidades, os *S. aureus* requerem maior atenção devido a seu alto potencial patogênico e também a sua capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos utilizados, além de que, a infecção bem sucedida em animais depende também dos fatores de virulência e é notório que o agente patogênico evoluiu em numerosos meios para evitar a sua destruição pelo sistema imune, agindo contra funções antimicrobianas de leucócitos fagocíticos (DELEO et al., 2009; LV et al., 2014).

Sendo assim, o estabelecimento de uma infecção por um determinado patógeno na glândula mamária depende de vários fatores ligados ao micro-organismo, ao hospedeiro e ao meio ambiente (COSTA, 1998). Com relação ao patógeno estão os fatores de virulência que podem ser: capacidade de multiplicação no leite, habilidade na adesão ao epitélio mamário e presença de cápsula (dificultando a fagocitose) (COSTA, 1998).

Outros componentes podem ser citados: parede celular, proteínas de superfície, enzimas (coagulase, catalase, desoxirribonucleases-DNase, hialuronidase, lipase, proteases, betalactamases e a estafiloquinase ou fibrinolisinase) e toxinas (enterotoxinas termoestáveis, esfoliatina e a toxina da síndrome do choque tóxico) que estão envolvidas na patogenicidade; os quais contribuem para a sua capacidade de colonizar e causar doença em mamíferos e superar as defesas do hospedeiro (DINGES et al., 2000; HURTADO et al., 2002; BURNSIDE et al., 2010; ARGUDIN et al., 2010). Outro fator descrito é que o desenvolvimento das mastites pode estar também associado à colonização de micro-organismos produtores de caseinase, pois, a caseína é a mais importante proteína do leite, incapaz de penetrar na membrana celular dos micro-organismos, a não ser que haja a sua hidrólise pela caseinase (MARQUES et al., 2013).

Porém, os fatores mais importantes na patogênese da infecção intramamária e que são relevantes para colonização da glândula mamária, são: as hemolisinas, proteína A, coagulase, as α - e β -hemolisinas e a capacidade em produzir biofilme (COELHO et al., 2011). O biofilme é uma camada extracelular polissacarídica que dificulta a fagocitose, atividade de antibióticos e aumenta a aderência aos tecidos do hospedeiro e em superfícies plásticas ou metálicas, além da facilidade em sobreviver em ambientes hostis (CITAK et al., 2003; DHANAWADE et al., 2010; SZWEDA et al., 2012). Sendo assim, a implicação de biofilmes em infecções e resistência às drogas tem provocado um interesse crescente na caracterização dos genes envolvidos na sua formação (DHANAWADE et al., 2010).

A produção deste é controlada pelo *operon ica* (*icaADBC*) e a co-expressão dos genes *icaA* e *icaD* acarreta um aumento significativo na produção e estão relacionados com a expressão fenotípica do polissacarídeo (GERKE et al., 1998; ARCIOLA et al., 2001). Outro gene envolvido na produção de biofilmes é o *bap* que codifica a proteína (*bap* – *Biofilm Associated Protein*) expressa por este gene que promove tanto a fixação primária a uma superfície quanto à adesão intercelular

(CUCARELLA et al, 2004). De acordo com Antunes et al. (2007) diversas hipóteses sobre mecanismos que justificam o aumento da resistência em micro-organismos formadores de biofilme têm sido discutidas: baixa penetração do antimicrobiano, lenta taxa de crescimento bacteriano na maturação do biofilme pela limitação de nutrientes ou como resposta ao estresse iniciado com a formação do biofilme, e, finalmente, indução de um fenótipo caracterizado por bomba de efluxo e alteração da composição da membrana proteica.

Durante sua evolução, comunidades bacterianas têm desenvolvido várias formas sofisticadas de interagir e de associarem-se com o ambiente em que habitam, os micro-organismos podem responder a uma mudança percebida, alterando o seu fenótipo de modo a que o seu metabolismo e outras atividades são bem sucedidos no novo ambiente, assim, nas últimas décadas, tornou-se também evidente que as interações que ocorre entre as bactérias são possíveis, por meio de sistemas de comunicação (NAZZARO et al., 2013). Sendo assim, para causar doenças e para colonizar diferentes nichos ecológicos dentro do hospedeiro, *S. aureus* desenvolveu um sistema de *quorum-sensing* que consiste na comunicação célula-célula e controla a regulação de uma multiplicidade de fatores de virulência, os quais são regulados por um *operon* (*agr*) que possui cinco genes (*agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* e *hld*) que regulam a produção de fatores de virulência, contudo, o processo molecular responsável pela manifestação da doença não são bem compreendidos, mas presume-se ser causada parcialmente por diferenças no conteúdo de genes e por variações alélicas entre cepas de *S. aureus* (CRAMTON et al., 1999; CAFISO et al., 2007; BOLES e HORSWILL, 2008; COELHO et al., 2011; MARQUES et al., 2013). Sendo assim, a análise genética e molecular demonstra que o *quorum-sensing* é ativado antes e é necessário para o mecanismo de desprendimento das células ao biofilme, que ocorre com a produção das proteases, enzimas secretadas para o mecanismo de desprendimento; este sistema permite que uma população bacteriana possa responder em conjunto quando a densidade celular é atingida ao limite (CAFISO et al., 2007; BOLES e HORSWILL, 2008).

Como foi descrito, a estrutura do biofilme é formado por células bacterianas e polissacarídeos e contribui para a resistência às drogas de *S. aureus* (KRYCHOWIAK et al., 2014). Embora as bactérias em biofilmes sejam rodeadas por uma matriz extracelular que pode restringir fisicamente a difusão de agentes antimicrobianos, isto não parece ser um mecanismo predominante de resistência

antimicrobiana associada ao biofilme, as bactérias possuem ainda os genes de resistência contra drogas antimicrobianas (PATEL, 2005). Estas drogas foram introduzidas pela primeira vez na década de 1930 para tratar doenças infecciosas de humanos e animais e seu uso tem contribuído significativamente para melhoria da saúde nestas espécies (OLIVER et al., 2011). Porém, por muitas décadas, a resistência aos antibióticos tem sido reconhecida como um problema de saúde pública, pois, qualquer uso de antibióticos irá selecionar bactérias resistentes aos medicamentos (MARSHALL e LEVY, 2011; KRYCHOWIAK et al., 2014), uma vez que, diversos antibióticos são utilizados para o tratamento e prevenção de doenças de vacas leiteiras, e a mastite continua sendo a doença mais comumente tratada (OLIVER et al., 2011).

Sendo assim, uma das consequências do uso errôneo de antibióticos seria o surgimento de isolados resistentes, além dos resíduos que podem ser encontrados no leite, uma vez que isso representa um risco à saúde pública, por provocar reações alérgicas aos que ingerem o leite contaminado, além de acarretar prejuízos econômicos (BARROS, 2001). As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a certos antibióticos, mas também podem adquirir resistência aos mesmos por meio de mutações gênicas e por transferência horizontal de genes (BLAIR et al., 2014). Segundo Krychowiak et al. (2014), as mutações que promovem a sobrevivência das bactérias na presença de antibióticos e da transferência horizontal de tais mutações, dá origem a estirpes resistentes a antibióticos. Os mecanismos de aquisição de resistência podem compreender a mutação em um gene no cromossomo bacteriano ou aquisição de um gene de resistência de outro micro-organismo, por meio de transdução, transformação ou conjugação (ITO et al., 2003).

A resistência de *Staphylococcus* spp. aos antibióticos da classe dos beta-lactâmicos ocorre principalmente por dois mecanismos: a produção de PBP2a (proteína ligante de penicilina) que é codificada pelo gene *mecA* e a produção da enzima extracelular beta-lactamase, codificada pelo gene *blaZ*, geralmente presente em plasmídeos, porém, pode estar em cromossomo (MARANAN et al., 1997; OLSEN et al., 2006; SAWANT et al., 2009; MENDOÇA et al., 2012; RICE, 2012; MELO et al. 2013). Em trabalho realizado por Olsen et al. (2006), com *S. aureus* e SCN isolados de bovinos e humanos puderam observar três linhas evolutivas do gene *blaZ*, possuindo origens plasmidial, cromossomal e intermediária. A produção da enzima beta-lactamase pelo *Staphylococcus* spp. promove a hidrólise do anel

beta-lactâmico presente nessa classe de antibióticos (MARANAN et al., 1997). Esse tipo de resistência pode ser considerada constitutiva ou regulada pela presença do antibiótico, por meio de dois genes contíguos, *blaI* e *blaR1*, no qual, o *blaI* é um repressor da transcrição de *blaZ*, e o segundo é considerado um anti-repressor (MARANAN et al., 1997; LOWY, 2003).

Em trabalho com 126 *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina no Nordeste do Brasil, 123 *S. aureus* tinham o gene *blaZ* e nenhum dos isolados apresentou o gene *mecA* (KREWER et al., 2015). O gene *mecA* é o mais encontrado em cepas de *S. aureus* isolados de humanos, contudo, pesquisas sugerem que os animais podem atuar como um de reservatório para o surgimento de *S. aureus* (MRSA – do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), tendo em vista que foi descoberta uma estirpe de *S. aureus* (LGA251) isolada de leite a granel, a qual foi fenotipicamente resistente à meticilina (oxacilina), mas negativa para o gene *mecA*, sendo assim, um novo gene de resistência à meticilina (oxacilina) foi descrito como gene homólogo ao *mecA*, denominado de *mecC* (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011; ITO et al., 2012; BONNEDAHL et al., 2014; PATERSON et al., 2014).

A importância dos antibióticos presentes no leite está associada à saúde pública, pois, a resistência antimicrobiana tornou-se o principal problema de saúde pública no mundo, acarretando, a seleção de cepas resistentes no homem e no ambiente (BARROS et al., 2001; SILVA et al., 2014; NERO et al., 2007). Entretanto, a presença de resíduos de antibióticos no leite cru não está associada apenas a uma questão de saúde pública e segurança alimentar, mas constitui um importante fator econômico para o produtor que pode ser penalizado e para a fábrica de processamento de leite, que põe em risco a produção de alimentos lácteos com a utilização de leite contendo resíduos (OLIVER e MURINDA, 2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Locais de realização do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do *Campus* Ciências Agrárias, localizado na Fazenda experimental da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, situada na Rodovia BR 407, km 12 – Lote 543 – Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/nº “C1”, Petrolina-PE. Foram encaminhadas amostras para o Laboratório da PROGENE/UFRPE, localizado na Av. Dom Manoel de Medeiros, s/nº, Bairro Dois Irmãos, CEP 52171-900 em Recife, PE.

As coletas de amostras leite em latão foram realizadas no município de Afrânio-PE (121 km de Petrolina-PE) nos dias 06, 07, 13, 14, 20, 21 de Setembro de 2014. Nos dias 06 e 07, as coletas de amostras leite de 16 latões foram realizadas na própria Agroindústria, na plataforma de recepção. Esses latões eram entregues na Agroindústria sem refrigeração e realizada pelos proprietários. Nos dias 13, 14, 20, 21 as coletas de amostras de leite de 28 latões foram realizadas *in loco* em cada propriedade, estando o leite também sem refrigeração. O veículo que realizava as coletas a serviço da Agroindústria também não dispunha de refrigeração.

As informações relacionadas aos aspectos produtivos como número de vacas e produção diária de leite por propriedade foram obtidas junto à cooperativa local (ver Apêndice A).

3.2. Amostragem

Para definir o número de propriedades a serem amostradas, utilizou-se o programa Epilnfo versão 7.1.3, tomando-se os seguintes parâmetros: prevalência esperada de 50% (valor adotado para maximizar a amostra); nível de confiança de 95%; e erro absoluto de 10%. Para o cálculo, utilizou-se o quantitativo de propriedades (n=78) com cadastro junto à agroindústria dos produtores de leite de Afrânio, sendo a amostragem calculada de 44 propriedades (THRUSFIELD, 1995).

3.3. Procedimento para coleta de amostra de leite em latão

Foi realizada a coleta de amostras de leite em latões de 44 propriedades. A coleta foi realizada de acordo com o Manual de Instrução para Coleta e Envio de

Amostra de Leite para Análise, de acordo com o Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE). De cada latão foram coletadas três amostras. Em tubo cônico estéril para as análises laboratoriais (UNIVASF): Contagem Padrão em Placas-CPP (aeróbios mesófilos totais), contagem de *Staphylococcus* spp., contagem de coliformes totais e avaliada a presença de *Pseudomonas* spp. e *Streptococcus* spp. As outras duas amostras coletadas foram encaminhadas para PROGENE e realizadas as análises: CBT, composição (proteína e gordura) e CECS pela técnica de citometria de fluxo.

3.4. Análises laboratoriais

As amostras em tubos cônicos estéreis foram encaminhadas ao Laboratório da UNIVASF em caixas isotérmicas e foram analisadas após a coleta.

3.4.1. Contagem Padrão em Placas – CPP

As amostras de leite foram homogeneizadas e realizadas as diluições decimais até a terceira potência (10^{-3}) em água peptonada tamponada. Um mililitro (mL) de cada diluição foi depositado em placas de Petri esterilizadas, em triplicata, e adicionados aproximadamente 18mL de ágar para contagem padrão em placas (PCA) e realizado o plaqueamento em profundidade. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por 48h. Foram selecionadas para contagem as placas com as diluições que continham de 30 a 300 colônias. O número da UFC/mL foi determinado pela média da triplicata, multiplicada pelo inverso da diluição (Adaptado de SILVA et al., 2007).

3.4.2. Contagem de *Staphylococcus* spp.

As amostras de leite foram homogeneizadas e realizadas as diluições decimais até a terceira potência (10^{-3}) em água peptonada tamponada. Da diluição 10^{-1} , foram adicionados 0,3mL em triplicata e em uma placa 0,1mL, das outras diluições (10^{-2} e 10^{-3}) foram acrescentados 0,1mL em uma única placa para cada diluição. As placas com o meio MSA foram mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Foram selecionadas para contagem as placas com as diluições que continham de 30 a 300 colônias. Os resultados das contagens foram corrigidos de acordo com as diluições utilizadas e expressos em UFC/mL (Adaptado de SILVA et al., 2007). Posteriormente, foram isoladas as colônias com características de

Staphylococcus spp., essas colônias foram repicadas em meio BHI, para realização do teste de GRAM e catalase.

3.4.3. Contagem de coliformes totais

As amostras de leite foram homogeneizadas e realizadas as diluições decimais até a terceira potência (10^{-3}) em água peptonada tamponada. Um mililitro de cada diluição foi depositado em placas de Petri esterilizadas, em triplicata, e adicionados aproximadamente 18mL de VRB com lactose, e após a completa solidificação do meio foram adicionados de 5-8mL do meio para uma sobrecamada, realizando o plaqueamento em profundidade com sobrecamada. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Foram selecionadas para contagem as placas com as diluições que continham de 30 a 300 colônias e realizada a contagem apenas das colônias típicas de coliformes totais – vermelho púrpura, com 0,5mm ou mais em diâmetro, rodeadas por um halo avermelhado de precipitação de sais biliares - O número da UFC/mL foi determinado multiplicando o número de colônias pelo inverso da diluição (Adaptado de SILVA et al.,2007).

3.4.4. *Pseudomonas* spp.

Foi realizado o plaqueamento da amostra de leite com Alça de *Drigalski* calibrada (10µL) em meio Ágar *Pseudomonas (for fluorescein)* Himedia®. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Posteriormente, foram isoladas as colônias com características de *Pseudomonas* spp. – colônias circulares e lisas, com produção de pigmento azul (piocianina) e/ou esverdeado fluorescente (pioverdina); odor característico. Essas colônias foram repicadas em meio BHI para realização do teste de GRAM e posteriormente a oxidase (Adaptado de PINTO et al., 2006).

3.4.5. *Streptococcus* spp.

Foi realizado o plaqueamento da amostra de leite com Alça de *Drigalski* calibrada (10µL) em meio *Todd Hewitt*. As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Posteriormente, foram isoladas as colônias com características de *Streptococcus* spp. - colônias translúcidas, pequenas, delicadas e com aproximadamente 1mm de diâmetro, essas colônias foram repicadas em meio

BHI, para realização do teste de GRAM e catalase (Adaptado de ARCURI et al., 2006).

3.5. Análises realizadas na PROGENE

3.5.1 Contagem Bacteriana Total (CBT)

Para a determinação da CBT, as amostras de leite foram coletadas em fracos contendo pastilhas de azidiol e foi realizada a contagem bacteriana total em equipamento automático que utiliza citometria de fluxo para contagem de bactérias no leite cru – *Bactocount* IBC, fabricado pela 88 *Bentley Instruments*®, sendo o resultado em UFC/mL.

3.5.2 Composição (proteína e gordura) e Contagem Eletrônica de Células Somáticas (CECS)

Para a determinação da composição (teores de proteína e gordura) e CECS, as amostras de leite foram coletadas em fracos contendo pastilhas de bronopol, utilizando medidor de fluorescência por citometria de fluxo – *SomaScope* MKII, fabricado pela *Delta Instruments*.

3.6. Caracterização dos isolados bacterianos

3.6.1. Identificação fenotípica

Foram utilizados 58 isolados do meio MSA inicialmente identificados como *Staphylococcus* spp. baseando-se nas características morfológicas e bioquímicas (Gram, catalase). Foi realizada a identificação genotípica, o teste fenotípico de resistência aos beta-lactâmicos e o IRMA (Índice de Resistência Múltipla); a caracterização fenotípica da formação de biofilme, além da caracterização molecular da resistência bacteriana aos beta-lactâmicos e da produção de biofilme.

Foram utilizados três isolados do meio *Todd Hewitt* inicialmente identificados como pertencentes ao gênero *Streptococcus* spp. baseando-se nas características morfológicas e bioquímicas, a fim de realizar a identificação molecular dos mesmos.

3.6.2. Identificação genotípica – *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

3.6.2.1. Extração de DNA

Para realização da técnica de PCR, foi necessário primeiramente realizar a extração do DNA dos isolados – 58 *Staphylococcus* spp. e três *Streptococcus* spp. O DNA foi extraído e purificado seguindo adaptações dos protocolos descritos por Wade et al. (2005) e Ausubel et al. (1989). Primeiramente, fez-se o cultivo bacteriano em meio BHI, mantidos em estufa bacteriológica por 24h a 37°C. Posteriormente, 1,5mL foram retirados desse cultivo para um microtubo estéril e realizada a centrifugação 11.750g por 5 min, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 300µL de TE (Tris-EDTA) e as amostras foram levadas ao vórtex para homogeneizar. Acrescentou-se 70µL de SDS 10%, e novamente foram homogeneizadas. Em seguida foi acrescentado 100µL de NaCl 5M e 80µL CTAB/NaCl. Foram mantidas a 65°C por 10 min. Logo após, foram adicionados 700µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e foram homogeneizadas por inversão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 11.750 g por 5 min. Foi transferida a 1ª fase para outro tubo e acrescentados 450µL de isopropanol. Os tubos foram homogeneizados e deixados em gelo por 20 minutos. Passado esse período as amostras foram centrifugadas a 11.750g por 15 min, desprezado o sobrenadante, e acrescentados 500µL de etanol 70%. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 11.750g por 10 min, foi desprezado o sobrenadante, e os microtubos foram invertidos para facilitar na secagem. As amostras foram suspensas em 80µL de TE (pH 8,0) e deixadas à 65°C por 10 minutos. Ao término foram armazenadas à -20°C.

3.6.2.2. Quantificação de DNA

Após a extração de DNA das 58 amostras de *Staphylococcus* spp. e três de *Streptococcus* spp., essas foram submetidas à quantificação de DNA, pelo espectrofotômetro *Picodrop®*, modelo Pico 200. Posteriormente, foi realizada diluição, e todas as amostras extraídas obtiveram uma concentração final de 50ng/µL de DNA.

3.6.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a identificação genotípica dos 58 isolados de *Staphylococcus* spp. foi realizada a amplificação de parte dos genes *nuc* (*S. aureus*) e *rdr* (*S. epidermidis*). Para identificação molecular dos *Streptococcus* spp. foi realizada a amplificação de parte do gene 16S rRNA para posterior sequenciamento. O resultado da PCR foi verificado em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio ($1,0\text{mg mL}^{-1}$) e documentado em fotodocumentador.

3.6.2.4. Identificação genotípica *Staphylococcus* spp. - genes *nuc* e *rdr*

Todos os 58 isolados de *Staphylococcus* spp. isolados foram testados quanto a presença de parte dos genes *nuc* (KATEETE et al. 2010) e *rdr* (SHOME et al. 2012), cujas presenças identificam o micro-organismo como pertencente às espécies *S.aureus* ou *S. epidermidis*, respectivamente. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 1.

Para pesquisa de parte do gene *nuc*, como molde foi utilizado o DNA extraído (item 3.6.2.1) dos isolados bacterianos, sendo que $4\mu\text{L}$ desta suspensão foram acrescidos a $11\mu\text{L}$ da mistura contendo 2mM de MgCl_2 , $0,4\text{pmol}$ dos *primers*, $0,4\text{mM}$ dos desoxirribonucleosídeos trifosfatados, tampão de enzima 1X e 1.5U de *Taq* DNA polimerase. Os ciclos de amplificação do gene *nuc* foram realizados de acordo com Kateete et al. (2010) com modificações, constando de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 37 ciclos, consistindo, cada um de 94°C por 1 minuto, hibridação do iniciador a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos por uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Para pesquisa de parte do gene *rdr*, a reação de PCR foi baseada no trabalho de Shome et al. (2012), porém com algumas modificações. Para os $5\mu\text{L}$ da suspensão de DNA foram acrescidos a $20\mu\text{L}$ da mistura contendo $1,5\text{mM}$ de MgCl_2 , $0,5\text{pmol}$ dos *primers*, $0,4\text{mM}$ dos desoxirribonucleosídeos trifosfatados, tampão de enzima 1X e 2.5U de *Taq* DNA polimerase. Os ciclos de amplificação do gene *rdr* constaram de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 30 ciclos, consistindo, cada um de 94°C por 30 s, hibridação do iniciador a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 s, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

3.6.2.5. Identificação genotípica de *Streptococcus* spp. por sequenciamento de parte do gene 16S rRNA

Dos três *Streptococcus* spp. isolados, foi realizada extração de DNA e amplificação de parte do gene 16S rRNA, como molde foi utilizado o DNA extraído dos isolados bacterianos como descrito no item 3.6.2.1, o DNA bacteriano foi amplificado por PCR, por meio da utilização dos iniciadores de parte do gene 16S rRNA - 13R e 516F (FREDERICKS e RELMAN, 1998). A reação constou de tampão de enzima 1X, 2 mM de MgCl, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 pmol de cada iniciador, 2.5 U de *Taq* DNA polimerase e 2 µL de DNA molde em um volume final de 20 µL. Os ciclos de amplificação foram constituídos de uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento específico do iniciador a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, sendo que no final houve uma extensão final a uma temperatura de 72 °C por 7 minutos.

Posteriormente, foi realizada a purificação da PCR com a utilização do PureLink™ *Quick gel extraction and PCR purification combo kit* da Invitrogen™ para posteriormente sequenciamento. Esse foi realizado em empresa particular (ACTGene Análises Moleculares LTDA) utilizando-se o método didesoxi ou terminação da cadeia de *Fred Sanger*. Os eletroferogramas obtidos foram enviados e esses foram analisados pelo programa PHRED, para verificar a qualidade dos mesmos e, sequências com qualidade PHRED acima de 20 foram analisadas com a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para confirmação da espécie.

3.7. Estudo da resistência bacteriana em isolados de *S. aureus*

3.7.1 Teste fenotípico de resistência aos beta-lactâmicos

O perfil de resistência dos micro-organismos foi determinado pelo método de difusão em disco *Kirby-Bauer* modificado. Os isolados foram semeados em caldo *Muller Hinton* e mantidos a 37°C até obtenção de turvação conforme a escala 0,5 de *Mac Farland*. Com auxílio de um *swab*, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura *Agar Muller Hinton*. Logo após, foram aplicados os discos impregnados com os beta-lactâmicos que incluíram: cefalosporinas -

cefalotina (30µg) e penicilinas – ampicilina (10 µg), amoxicilina (10 µg), e oxacilina (1µg). As placas foram mantidas em estufa durante 24h a 37°C. Em seguida, foi realizada a leitura dos halos para determinação do perfil de resistência dos isolados de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008).

3.7.2 Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA)

O IRMA foi calculado seguindo a metodologia descrita por Krumperman (1983), o qual é determinado pela relação entre o número de antimicrobianos em que a amostra é resistente e o número total de antimicrobianos testados.

3.7.3. Resistência aos beta-lactâmicos - gene *blaZ*

A análise do potencial genético para resistência aos antimicrobianos foi realizada por meio da amplificação de parte do gene relacionado com a resistência aos beta-lactâmicos – *blaZ*. Para amplificação de uma parte do gene *blaZ* (fragmento de 517 pb), foi utilizado como molde o DNA extraído (descrito no item 3.6.2.1) dos isolados bacterianos, sendo que 4µL desta suspensão foram acrescidos a 11µL de uma mistura contendo 2 mM de MgCl, 0,4 pmol dos *primers*, 0,4 mM dos desoxirribonucleosídeos trifosfatados, tampão de enzima 1X e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase. O *primer* utilizado está descrito na Tabela 1.

A reação de amplificação do gene *blaZ* constou de uma desnaturação inicial à 94°C por 4 min, seguida por 30 ciclos, que consistiram em 94°C por 1 minuto, 50,5°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e, uma extensão final a 72°C por 5 minutos (Adaptado de SAWANT et al., 2009). O resultado da PCR foi verificado em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio (1,0mg mL⁻¹) e documentado em fotodocumentador.

3.8. Produção de biofilme em *S. aureus*

3.8.1 Caracterização fenotípica da formação de biofilme

A caracterização fenotípica para formação de biofilme dos isolados foi realizada por meio do teste de aderência em microplacas. As colônias isoladas foram inoculadas em 3mL de *Tryptone Soya Broth* (TSB) com glicose (1%) e mantidas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, 200µL do cultivo foram inoculados em placas de

microdiluição e novamente as placas foram mantidas a 37°C por 24 horas. Após as 24 horas foram realizadas três lavagens com 200µL de água destilada e aguardou-se secar em temperatura ambiente. As placas foram coradas com 100µL de cristal violeta 0,25% por 2 a 3 min em temperatura ambiente. Foi repetida a lavagem, mais três vezes com água destilada. Para dissolver o corante, utilizou-se 200µL de álcool-acetona (80:20). A absorbância foi medida em leitor de microplacas de Elisa *Easy*® e mensurada em filtro de 620nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicata, bem como os controles positivo e negativo. Como controle positivo foi utilizada a cepa *S. aureus* ATCC 25923, caracterizada genotipicamente para produção de biofilme, e como controle negativo, uma cepa de *S. epidermidis* 12228. Foi possível determinar a produção de biofilme de acordo com a classificação: sem produção de biofilme (DO amostra ≤ DO controle negativo), fraca produção de biofilme (DO controle negativo < DO amostra ≤ 2.DO controle negativo), moderada produção de biofilme (DO controle negativo < DO amostra ≤ 4.DO controle negativo) e forte produção de biofilme (DO amostra > 4.DO controle negativo) (Adaptado de MERINO et al., 2009).

3.8.2. Caracterização genotípica da formação de biofilme - genes *icaA*, *icaD* e *bap*

Para amplificação de uma parte do gene *icaA*: como molde foi utilizado o DNA extraído (descrito no item 3.6.2.1) dos isolados bacterianos sendo que 5µL desta suspensão foram acrescidos a 20µL de uma mistura contendo 2,5mM de MgCl, 1pmol dos *primers*, 0,28mM dos desoxirribonucleosídeos trifosfatados, tampão de enzima 1X e 2,5U de *Taq* DNA polimerase. A reação de amplificação do gene *icaA* foi realizada de acordo com Vasudevan et al. (2003) com modificações, submetida à 30 ciclos constituídos por 45 segundos a 92°C; 49°C por 45 segundos e 1 min a 72°C e uma extensão final a 72 ° C por 7 min.

Para amplificação de uma parte do gene *icaD*: como molde foi utilizado o DNA extraído (descrito no item 3.6.2.1) dos isolados bacterianos sendo que 2µL desta suspensão foram acrescidos a 13µL de uma mistura contendo 1,33mM de MgCl, 1pmol dos *primers*, 0,2mM dos desoxirribonucleosídeos trifosfatados, tampão de enzima 1X e 1,5U de *Taq* DNA polimerase. A reação de amplificação do gene *icaD* foi realizada de acordo com Vasudevan et al. (2003) com modificações. A reação foi conduzida ao termociclador e submetida à desnaturação inicial a 94°C por 2 min,

seguida por 30 ciclos constituídos por 45 segundos a 92°C; 49,8°C por 45 segundos e 1 min a 72°C e uma extensão final a 72°C por 7 min.

Para amplificação de uma parte do gene *bap*: como molde foi utilizado o DNA extraído (descrito no item 3.6.2.1) dos isolados bacterianos sendo que 5µL desta suspensão foram acrescidos a 20µL de uma mistura contendo 2mM de MgCl, 0,4pmol dos *primers*, 0,4mM dos desoxirribonucleosídeos trifosfatados, tampão de enzima 1X e 2,5U de *Taq* DNA polimerase. A reação de amplificação do gene *bap* foi realizada de acordo com Cucarella et al. (2001) com modificações, a reação foi conduzida ao termociclador e submetida à desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguida por 35 ciclos constituídos por 45 segundos a 94°C; 56,5°C por 45 segundos e 50 segundos a 72°C e uma extensão final a 72°C por 5 min. Os iniciadores utilizados na PCR com a finalidade de obter amplificação dos fragmentos estão descritos no Tabela 1. O resultado das PCR's foi verificado em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio (1,0mg mL⁻¹) e documentado em fotodocumentador.

3.9. Estatística

Foi realizada análise estatística descritiva para as variáveis número de animais, produção de leite (L/dia), CCS, gordura e proteína do leite. Para avaliar a normalidade dos dados, utilizou-se o teste de *Shapiro-Wilk*, sendo observada normalidade para as variáveis referentes aos teores de gordura e proteína. A ausência de normalidade dos dados obtidos da CCS e CBT foi confirmada pelo teste de *Shapiro-Wilk*, mesmo após serem submetidos à transformação logarítmica de base 10 (log₁₀). Logo, utilizou-se a correlação de *Spearman* para avaliação dos resultados obtidos na contagem padrão em placa e citometria de fluxo. Para análise dos dados, foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0 para Windows.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes *nuc*, *rdr*, 16S rRNA, *blaZ*, *icaA*, *icaD* e *bap*.

Gene	Primers	Sequência (5' - 3')	Fragmento amplificado	Referência
<i>nuc</i>	<i>nucF</i>	GCGATTGATGGTGATACGGTT	279 pb	Kateete et al. (2010)
	<i>nucR</i>	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC		
<i>rdr</i>	<i>serF</i>	AAGAGCGTGGAGAAAAGTATCAAG	130 pb	Shome et al. (2012)
	<i>serR</i>	TCGATACCATCAAAAAGTTGG		
16S rRNA	516F	TGCCAGCAGCCGCGGTAA	874 pb	Fredricks e Relman (1998)
	13R	AGGCCCGGGAACGTATTCAC		
<i>blaZ</i>	<i>blaZ F</i>	AAGAGATTTGCCTATGCTTC	517 pb	Sawant et al. (2009)
	<i>blaZ R</i>	GCTTGACCACTTTTATCAGC		
<i>icaA</i>	<i>icaAF</i>	CCTAACTAACGAAAGGTAG	1315 pb	Vasudevan et al. (2003)
	<i>icaAR</i>	AAGATATAGCGATAAGTGC		
<i>icaD</i>	<i>icaDF</i>	AAGCCCAGACAGAGGCAATATCCA	381 pb	Vasudevan et al. (2003)
	<i>icaDR</i>	AGTACAAACAACTCATCCATCCGA		
<i>bap</i>	<i>bap F</i>	AAGCCCAGACAGAGGCAATATCCA	971 pb	Cucarella et al. (2001)
	<i>bap R</i>	AGTACAAACAACTCATCCATCCGA		

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Contagem Bacteriana Total

A contagem bacteriana total foi realizada, utilizando-se duas técnicas: contagem padrão em placas (CPP) e citometria de fluxo (método automatizado). Observou-se uma correlação positiva substancial ($r=0,61$, $p < 0,01$) na comparação realizada entre estas duas técnicas. Sampaio et al. (2015) avaliou 179 amostras de leite cru refrigerado, provenientes de diferentes bacias leiteiras de Minas Gerais, sendo realizadas pelos métodos de citometria de fluxo e contagem padrão em placas. Estes autores observaram uma forte correlação positiva e significativa entre os valores de contagem de mesófilos ($r = 0,70$), corroborando com os achados deste trabalho.

Na CPP, observou-se uma variação de $1,4 \times 10^3$ UFC/mL a $>3,0 \times 10^5$ UFC/mL, enquanto na contagem por citometria de fluxo esta foi de 6×10^3 UFC/mL a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Por meio da CPP, verificou-se que 50% (22/44) apresentaram contagens superiores $3,0 \times 10^5$ UFC/mL. Resultados inferiores quando comparado com os resultados obtidos por Mattos et al. (2010) após avaliação de 53 amostras de leite cru (tanques de expansão/latões) de propriedades leiteiras do Agreste de Pernambuco, com uma média nas contagens igual a $1,68 \times 10^7$ UFC/mL, revelando que a maioria das propriedades apresentava alta contaminação durante a ordenha e que as contagens estavam acima dos padrões antes mesmo do leite sair da propriedade. A inferioridade nas contagens de mesófilos no presente estudo pode ser decorrente do número reduzido de animais por propriedade, conseqüentemente, dos baixos volumes de leite produzidos. De acordo com Luz et al. (2011) os estudos da microbiologia do leite fornecem informações úteis que refletem as condições sob as quais o leite foi produzido e armazenado.

Considerando o limite da IN 62 até 30 de Junho de 2015 ($6,0 \times 10^5$ UFC/mL) todas as amostras avaliadas na CPP seriam aprovadas, enquanto que na citometria de fluxo três propriedades não estariam de acordo. Por outro lado, levando em consideração a IN 62 vigente (a partir de 01 de Julho de 2015 até 30 de Junho de 2017) exige limite de até $3,0 \times 10^5$ UFC/mL, 50% (22/44) das amostras seriam reprovadas. Utilizando-se a citometria de fluxo, observou-se que quatro (9%) amostras estariam reprovadas, levando em consideração o mesmo limite. Embora tenha-se observado uma correlação substancial entre estas duas técnicas, estas

diferenças decorrem de alguns fatores que podem interferir nestas contagens, podendo-se citar: microbiota predominante no leite (Gram positiva ou negativa), tamanho e formato da célula bacteriana, assim como características de agregação destas células (SUHREN e REICHMUTH, 2000).

Outros países apresentam exigências que diferem daquelas encontradas no Brasil, a exemplo da União Europeia e dos Estados Unidos que exigem valores inferiores a 100 mil UFC/mL⁻¹ (ZANELA et al., 2006; SAMARŽIJA et al., 2012) sendo assim, 68,1% (30/44) propriedades avaliadas seriam reprovadas pelas normas internacionais, levando-se em consideração os resultados da CPP. Segundo Silva et al. (2010) e Elmoslemany et al. (2009), altas contagens de mesófilos no leite podem indicar contaminação do leite no período de sua aquisição, como falhas nos procedimentos higiênico-sanitários e falta da limpeza dos tetos antes da ordenha. As ações para a melhoria da contagem bacteriana do leite são consideradas simples, porém, necessitam de cautela constante nos procedimentos adotados (PAIVA et al., 2012).

De maneira geral os trabalhos apresentam resultados insatisfatórios quanto à CBT do leite cru em várias regiões do país (MORAES et al., 2005; NERO et al., 2005; ARCURI et al., 2006; LANGONI et al., 2009; MATTOS et al., 2010; SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2011; LUZ et al., 2011; BOZO et al., 2013; ALVES et al., 2014; SILVEIRA e BERTAGNOLLI, 2014). Nota-se que contagens consideradas satisfatórias estão associadas com refrigeração adequada do leite, manejo adequado da ordenha e número de animais com mastite. Arcuri et al. (2006) observaram que existe uma associação positiva entre a contagem padrão e uso de produtos de limpeza na higienização de equipamentos de ordenha e do tanque de estocagem. Bozo et al. (2013) observaram que após as mudanças de manejo e aplicação correta de boas práticas de ordenha com os produtores, os resultados obtidos demonstraram redução na contagem bacteriana total do leite.

Em um estudo realizado por Santana et al. (2001), os principais pontos de contaminação do leite por mesófilos na produção leiteira foram a água residual dos equipamentos, os tanques de expansão e os latões. Nas propriedades avaliadas no município de Afrânio – PE, o armazenamento do leite era realizado em latão, sugerindo uma possível fonte de contaminação do leite.

Além disso, deve-se considerar que contaminações adicionais e crescimento microbiano podem ocorrer devido a presença de animais com problemas sanitários como a mastite, bem como transporte em condições inapropriadas (PINTO, et al 2006). O transporte do leite em Afrânio-PE, não é realizado em veículo isotérmico, a entrega é realizada com mais de duas horas após a ordenha, ou seja, não respeitando o limite exigido pela IN 62 (BRASIL, 2011), a qual permite que o leite em latões seja mantido em temperatura ambiente desde que, seja entregue no estabelecimento processador até no máximo duas horas após ordenha. Nero et al. (2005) observaram que amostras não refrigeradas apresentaram as maiores contagens de mesófilos aeróbios, nessas condições, a produção leiteira fica em temperatura ambiente por longos períodos durante o transporte, o que favorece a multiplicação bacteriana, tendo em vista que, algumas bactérias conseguem dobrar sua população a cada 20/30 minutos. Assim, o leite deve ser manuseado de maneira correta desde o momento da ordenha até chegar ao laticínio e ao consumidor final (GUERREIRO et al., 2005). Contudo, de acordo com Gargouri et al. (2013), por motivos organizacionais e econômicos, é impossível entregar leite no laticínio após cada ordenha. Entretanto, o leite que não for entregue após ordenha, deve ser mantido em refrigeração, com temperatura máxima de conservação do leite a 7°C na propriedade rural/tanque comunitário (BRASIL, 2011).

4.2. Contagem de *Staphylococcus* spp.

A variação na contagem de *Staphylococcus* spp. foi de $1,0 \times 10^3$ UFC/mL a $3,5 \times 10^5$ UFC/mL, entretanto, três propriedades apresentaram contagem superior a $3,0 \times 10^5$ UFC/mL. Observou-se que essas três propriedades estiveram dentro dos limites considerados de risco. Foi possível observar que em 100% das amostras avaliadas ocorreu crescimento de *Staphylococcus* spp. A variação na contagem de *Staphylococcus* spp. demonstra uma diferença na qualidade do leite entre as propriedades. Essas bactérias, quando presentes em concentrações elevadas (10^5 - 10^6 UFC mL⁻¹ ou g⁻¹) e sob condições adequadas produzem uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas (ES) nos alimentos, as quais depois de ingeridas causam intoxicação (CARMO et al., 2002; BORGES et al., 2008).

A variação na contagem de *Staphylococcus* spp. do presente estudo foi maior quando comparado com um trabalho realizado em Minas Gerais em 32 fazendas (latões ou tanques refrigerados), em que, 23 amostras apresentaram valores

inferiores a 10^3 UFC/mL (ARAÚJO et al. 2009). Contudo, em comparação com outros trabalhos, a contagem do presente estudo foi inferior ao trabalho realizado por Lamaita et al. (2005) com a contagem média de *Staphylococcus* spp. variando de $1,0 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^7$ UFC/mL, em leite cru estocado em tanques refrigerados de 80 propriedades rurais. Em Minas Gerais, um estudo realizado por Borges et al. (2008), a variação foi de $3,3 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^7$ UFC mL. Segundo Araújo et al. (2009) a elevada contagem de *Staphylococcus* spp., na maioria das vezes, está relacionada com a presença de mastite no rebanho. Sendo assim, é notório que as diferenças na contagem de *Staphylococcus* spp. em cada estudo é dependente do manejo da ordenha, da quantidade de animais com mastite, da falta de refrigeração do leite, do volume do leite, dentre outros fatores. Segundo Tebaldi et al. (2008), os manipuladores são os principais carreadores da bactéria, disseminando, dessa forma, grande carga microbiana ao leite.

Pôde-se observar a ausência de pasteurização do leite na agroindústria do município avaliado, facilitando a manutenção e disseminação de patógenos, constituindo um risco para a saúde pública. Em condições de elevada contaminação, embora a pasteurização elimine parte dos micro-organismos patogênicos, ainda assim, não torna o leite viável para consumo, pois um pequeno percentual de bactérias (0,1 a 0,5%) ainda permanece viável (SILVA et al., 2010; LUZ et al., 2011).

4.3. Contagem de coliformes totais

A variação na contagem de coliformes totais foi de $3,5 \times 10^2$ UFC/mL a $3,0 \times 10^5$ UFC/mL. Dentre os micro-organismos como referência da qualidade microbiológica, os coliformes têm sido amplamente utilizados (LUZ et al., 2011). Apesar de não existir na IN 62 (BRASIL, 2011), um número aceitável de coliformes totais, esses micro-organismos são utilizados como referência na qualidade microbiológica, uma vez que, são indicativos de contaminação ambiental e resíduos fecais no leite (JAYARAO et al., 2004; LUZ et al. 2011). Em trabalho realizado por Arcuri et al. (2006) observaram que 29% (7/24) das propriedades obtiveram contagens superiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/mL, essas foram consideradas altas contagens, indicando deficiências de higiene. No presente estudo 56,8 % do leite analisado (25/44) apresentaram contagens superiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/mL, a partir desses resultados pode-se inferir que devem ocorrer falhas no manejo sanitário do rebanho e déficit na higiene no momento de obtenção do leite.

Em trabalho realizado na Bahia a média de três amostras avaliadas foi de $3,7 \times 10^4$ UFC/mL, sugerindo que o uso de água não potável e a manutenção de temperaturas inadequadas são alguns dos fatores que podem ter contribuído para ocorrência do elevado número de coliformes nas amostras de leite analisadas (MACIEL et al., 2008). No presente estudo, 25 amostras obtiveram valores superiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/mL, sugerindo falhas na higienização no momento da ordenha e temperatura inadequada (leite não era transportado de acordo com as normas da IN 62).

Pesquisas realizadas na maior bacia leiteira de Pernambuco, na região do Agreste, verificaram que poucos produtores realizam práticas de higiene na ordenha, não lavam os tetos antes de ordenhar as vacas (MONTEIRO et al., 2007). É comum em propriedades leiteiras, antes da ordenha, o ordenhador fazer a “limpeza” das tetas com a vassoura da cauda do próprio animal (MONTEIRO et al., 2007). Contudo, é importante ressaltar que, por mais higiênica que seja a ordenha, não é possível a obtenção de leite livre de micro-organismos, porém, pode ser controlada a carga microbiana inicial (PALES et al., 2005). A carga microbiana inicial ou a qualidade do leite está intimamente associada com a saúde da glândula mamária (OLIVER e MURINDA, 2012).

4.4. *Pseudomonas* spp.

Das 44 amostras de leite cru avaliadas, nenhuma apresentou crescimento para *Pseudomonas* spp. É uma bactéria psicrófila, presente no leite como resultado da contaminação do equipamento de ordenha, decorrente da lavagem intensiva ou da contaminação oriunda da superfície do úbere (MOLINERI et al., 2012; DECIMO et al., 2014). De acordo com Park et al. (2014), algumas espécies de *Pseudomonas* spp. podem ocasionar mastite bovina. Sugere-se que a ausência de isolamento desse micro-organismo pode estar relacionada com a não refrigeração realizada na agroindústria, uma vez que o leite permanece na temperatura ambiente até à entrega no laticínio. Em trabalho realizado por Fagundes et al. (2006), houve presença de *Pseudomonas* spp. no leite recém-obtido, porém, um maior isolamento desse micro-organismo no leite cru refrigerado. Os trabalhos geralmente obtêm isolamento de psicrófilos no leite refrigerado (PINTO et al., 2006; SILVA et al., 2010; NORBERG et al., 2010; MOLINERI et al., 2012; IZIDORO et al., 2013; SANTOS et al., 2013). A refrigeração do leite, logo após a ordenha, tende a diminuir

a multiplicação de bactérias mesófilas, contudo, favorece o crescimento da microbiota psicrotrofica (SAMARŽIJA et al. 2012; FAGUNDES et al. 2006).

4.5. *Streptococcus* spp.

Das 44 amostras de leite cru avaliadas, 6,8% (3/44) das propriedades apresentaram-se positivas para a pesquisa de *Streptococcus* spp. de acordo com características morfológicas e bioquímicas (Gram e catalase). O resultado do sequenciamento identificou a espécie como *Lactococcus lactis* e outras duas como *Enterococcus* spp. *L. lactis* que tem como hospedeiro os bovinos, sendo uma das principais espécies isoladas do leite cru (LAFARGE et al., 2004).

Lafarge et al. (2004), utilizando técnicas moleculares, identificaram espécies de *Enterococcus* spp. em leite cru. Os enterococos são encontrados no leite cru, estão presentes no solo, água, vegetais crus e em produtos de origem animal, contudo, *E. faecium* e *E. faecalis* têm como habitat natural o trato intestinal de diversas espécies, e são utilizados como indicadores de contaminação fecal (TEBALDI et al., 2008; RIDOLDI et al., 2009; WERNER et al., 2013).

Em outro estudo, foram isoladas três espécies desse gênero, sendo elas representadas por *E. durans*, *E. faecium* e *E. faecalis* (TEBALDI et al., 2008). Fonseca e Santos (2001) descrevem esses agentes como *Streptococcus* ambientais, que podem ocasionar a mastite do tipo ambiental. Contudo, estudos moleculares sugerem que os enterococos são um gênero distinto, anteriormente, considerados como micro-organismos comensais sem importância clínica, porém, atualmente, são patógenos hospitalares mais comumente isolados (HOLLENBECK e RICE, 2012). As espécies de maior importância clínica são *E. faecalis* e *E. faecium* (KRISTICH et al., 2014).

A presença de *Enterococcus* spp. sugere problemas nas condições higiênico-sanitárias de obtenção de leite. Além disso, sabe-se que o consumo de leite contaminado por esses micro-organismos pode ocasionar escarlatina e a dor de garganta séptica (TEBALDI et al., 2008). A contaminação de enterococos nos alimentos é preocupante, pois, além de ser um indicador de contaminação fecal na produção/processamento de alimentos, são reservatórios de genes de resistência, possibilitando a disseminação na cadeia alimentar, e propagação de resistência aos antibióticos na população humana (RIBOLDI et al., 2009; PRICHULA et al., 2013).

Os enterococos são conhecidos por serem resistentes à maioria dos antibióticos utilizados na prática clínica humana (RUZAUSKAS et al., 2009).

4.6. Contagem eletrônica de Células Somáticas - CECS

A CCS é considerada como método de referência utilizado como indicador de qualidade do leite cru (PANTOJA et al., 2009). Na Tabela 2, observa-se a estatística descritiva das principais variáveis avaliadas no laboratório oficial (PROGENE).

Ao analisar a correlação entre as variáveis CCS e UFC/mL obtida por meio a citometria de fluxo, observou-se uma associação positiva baixa ($r = 0,15$), porém sem significância estatística. Sabe-se que não há, necessariamente, uma relação entre a elevada CCS e a CBT no leite, contudo, a alta contagem bacteriana, mesmo com CCS abaixo de 400.000/mL, implica em falhas higiênicas no manejo de ordenha (LIMA et al., 2006). De acordo com Bozo et al. (2013) a CBT é uma medida direta de contaminação do leite e a CCS é uma medida indireta de mastite no rebanho, assim, alguns fatores associados ao animal também influenciam de maneira importante e podem elucidar por que um produtor pode ser capaz de ter controle sob a CBT e não a CCS. A infecção intramamária é o fator que mais contribui para o aumento da CCS do leite (PALES et al., 2005). Sendo assim, a manutenção da sanidade do rebanho, relacionada à infecção da glândula mamária é relevante para um leite de qualidade.

Os valores mínimos e máximos da CCS oscilaram entre $1,8 \times 10^4$ cs/mL e $1,3 \times 10^6$ cs/mL. De acordo com Zanela et al. (2006) um resultado considerado normal para tanque de mistura é a $CCS \leq 300$ mil cs/mL^{-1} ($3,0 \times 10^5$); valores superiores a um milhão de células mL^{-1} pode ser indicativo de mastite. Com base nessa afirmação, 25% (11/44) das amostras avaliadas no presente estudo obtiveram contagem acima de 300 mil cs/mL^{-1} ; e 6,8 % (3/44) apresentaram valor superior a um milhão de células mL^{-1} , sugerindo infecção da glândula mamária em alguns animais na propriedade. Pôde-se observar que os valores mínimos e máximos da CCS oscilaram entre $1,8 \times 10^4$ cs/mL e $1,3 \times 10^6$ cs/mL. Apenas cinco amostras seriam reprovadas, levando em consideração a IN 62, que exigirá valor máximo de $5,0 \times 10^5$, a partir de 01 de Julho de 2015. Os países da União Europeia e Nova Zelândia exigem até 400.000 cél/mL, logo, 18,18% (8/44) das propriedades estariam em desacordo.

Em se tratando de amostras provenientes de baldes/latão, esta correlação tende a apresentar um decréscimo, uma vez que vários fatores podem desencadear

a elevação da CCS ou liberação de patógenos no leite, sendo assim, a homogeneização do leite de vários animais no latão não fornece uma leitura acurada da relação CCS x UFC, como observada nas amostragens individuais.

4.7. Teores de gordura e proteína no leite

Na Tabela 2, estão apresentados os resultados para as demais variáveis avaliadas neste estudo, tais como proteína e gordura. Levando em consideração a IN 62 vigente, poucas propriedades encontram-se em desacordo com o padrão estabelecido pela legislação, esta, que exige requisitos mínimos para proteína e gordura 2,9g/100g e 3,0g/100g respectivamente (BRASIL, 2001). Para a variável teor de proteína, o número de propriedades com valores inferiores a 2,9 g/100g foi igual a 11,3% (5/44). Já para a variável gordura, 4,5% (2/44) estariam em desacordo.

Tabela 2. Estatística descritiva com os resultados das variáveis obtidas em propriedades leiteiras no município de Afrânio, PE.

	Quant. Animais	Produção (L/dia)	CCS (x10³)	UFC (x10³)	Proteína (g/100g)	Gordura (g/100g)
Mínimo	1	7	18	6	2,13	2,14
Máximo	14	120	1305	1526	3,52	5,47
Média	5,73	34,98	278,52	124,07	2,99	3,76
Mediana	5,00	28,00	220,00	33,50	2,98	3,62
Desvpad	3,22	25,04	282,51	303,39	0,27	0,78

Na Tabela 3, têm-se os resultados das correlações avaliadas neste estudo, sendo possível observar uma associação positiva moderada quando comparou-se CCS x proteína e CCS x gordura. Com base nos resultados, observou-se aumento nos valores de proteína e gordura na medida em que a CCS aumentava. A influência da concentração de CCS sobre os constituintes do leite é muito discutida (LIMA et al., 2006), uma vez que, algumas pesquisas apontam para redução nos teores de proteína e gordura com aumento da CCS, enquanto, outras demonstram o que o aumento da CCS não influencia na redução de gordura (NORO et al., 2006; JÚNIOR e BELOTI, 2012; VARGAS et al., 2013). Lima et al. (2006) observaram que a medida que a CCS aumentava, tinha-se um incremento nos teores de gordura. Foi descrito

também, que a variação na composição do leite é influenciada pela redução da CBT, acarretando aumento de gordura e proteína (VARGAS et al., 2013). Segundo Langoni (2013) existem motivos mais que suficientes para se preocupar com a ocorrência de mastite em propriedades leiteiras, uma vez que esta compromete a qualidade do leite produzido, acarretando perda da capacidade de secreção da glândula mamária (ZACARIAS et al., 2014).

Tabela 3. Correlação entre variáveis produtivas e microbiológicas obtidas em propriedades leiteiras no município de Afrânio, PE.

Variáveis	Valor de <i>r</i>	Valor de <i>p</i>
CBT x CCS	0,15	0,331
N. de vacas x CCS	0,0012	0,99
N. de vacas x CBT	0,25	0,09
CCS x Litros de leite	0,0977	0,52
CBT x Litros de leite	0,0712	0,64
CCS x Proteína	0,33	0,02*
CCS x Gordura	0,37	0,01*
CBT x Proteína	- 0,0477	0,75
CBT x Gordura	0,0290	0,85

*Nível de significância estatística ($p < 0,05$).

4.8. Identificação genotípica de *Staphylococcus* spp. - genes *nuc* e *rdr*

Na identificação molecular dos 58 isolados de *Staphylococcus* spp., oriundos das amostras de leite, 100% apresentaram positividade para o gene *nuc* (*S. aureus*). *S. aureus* é o micro-organismo patogênico mais frequentemente isolado do leite cru, comumente associado com intoxicações alimentares, e comumente isolado em casos de mastite bovina (ARAÚJO et al., 2009; KOZYTSKA et al., 2010; SAEKI et al., 2011; SAEKI et al., 2011; JÚNIOR e BELOTI, 2012; CHAGAS et al., 2012;

FONTANA et al., 2012; CHAGAS et al., 2012; FONTANA et al., 2012; LANGONI, 2013; LV et al., 2014; JAMALI et al., 2015; LI et al., 2015). Trata-se de uma bactéria gram positiva que causa uma variedade de infecções em animais e humanos (ARAÚJO et al., 2015; COELHO et al., 2011). Na maioria dos casos, a contaminação por *S. aureus* em leite indica animais com mastite (OLIVEIRA et al., 2011).

O leite e os derivados são alimentos frequentemente responsáveis por intoxicação alimentar, sendo um risco potencial para quem o consome e até para quem o manuseia (ARCURI et al., 2006; HAMADI 2014). O *S. aureus* é considerado como o patógeno mais frequentemente isolado em casos de mastite subclínica bovina, associado aos micro-organismos mais contagiosos (OLIVER et al., 2005; FERREIRA et al., 2006; SOUZA et al., 2012). Com isso, se faz importante o controle da mastite na produção de leite, por meio da realização de práticas higiênicas no momento da ordenha, uma vez que o *S. aureus* está entre os micro-organismos que mais comprometem a qualidade sanitária dos derivados lácteos (PICOLI et al., 2006).

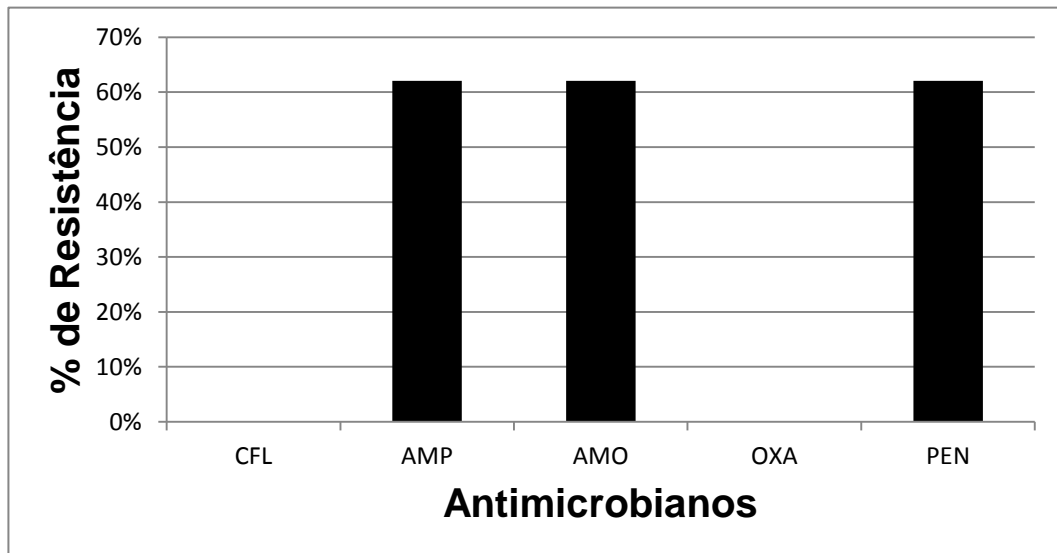
Além de refletir as condições sanitárias do rebanho, elevados números de estafilococos coagulase positiva, acima de 10^5 UFC/mL-1 aumentam o risco de produção de toxinas estafilocócicas que são resistentes ao processo de pasteurização (TEBALDI et al., 2008). Dessa forma, para obtenção de um leite de qualidade, é necessário que o animal esteja saudável, pois toxinas ou até mesmo micro-organismos patogênicos podem ser excretados no leite (PALES et al., 2005).

4.9 Testes fenotípico e genotípico de resistência aos beta-lactâmicos

Foi avaliada a resistência aos antibióticos do grupo dos beta-lactâmicos, da classe das cefalosporinas (cefalotina) e da classe das penicilinas (ampicilina, amoxicilina, oxacilina e penicilina), não sendo observada resistência dos *S. aureus* frente à cefalotina e oxacilina um importante marcador para a resistência à meticilina. Observou-se que 62% (36/58) dos isolados apresentaram resistência frente à ampicilina, amoxicilina e penicilina (Figura 1). A principal forma de controle das mastites bacterianas é a antibioticoterapia (JÚNIOR e BELOTI, 2012). O uso indiscriminado de antibióticos traz sérios problemas para a saúde pública e para a indústria. Pesquisas sobre a presença de resíduos de antibióticos no leite têm demonstrado que alguns proprietários não respeitam o período de carência dos

medicamentos (BARROS et al., 2001; NERO et al., 2007), favorecendo a presença de resíduos no leite.

Figura 1. Percentual de resistência dos 58 isolados de *S. aureus* frente aos antimicrobianos: CFL: cefalotina; AMP: ampicilina; AMO: amoxicilina; OXA: oxacilina; PEN: penicilina.



Não foi observada resistência dos isolados à cefalotina e oxacilina, sugerindo que estes antibióticos não são utilizados nas propriedades avaliadas. Apesar de que, a resistência à oxacilina de *S. aureus* isolados de animais é observada (MEDEIROS et al., 2011; KREWER et al., 2015). Por outro lado, pôde-se observar resistência dos isolados de *S. aureus* frente aos beta-lactâmicos da classe das penicilinas. Antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos são os mais utilizados na terapêutica de doenças em rebanhos leiteiros (SHITANDI e KIHUMBU 2004; TAPONEN et al., 2006).

Em 50% (29/58) dos isolados, não foi observada a presença do gene *blaZ*. Destes, (8/29) foram resistentes para ampicilina, amoxicilina e penicilina. A ausência do gene *blaZ* em isolados resistentes aos beta-lactâmicos foi observada em alguns isolados no presente estudo. Isto acontece em decorrência da existência de outros mecanismos bacterianos (LOWY, 2003). Sawant et al. (2009) avaliaram a resistência fenotípica e (SCN - isolados de leite bovino) molecular, com a pesquisa de genes (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *mecA*, *icaA* e *icaB*) responsáveis por codificar diversos mecanismos associados a resistência em *Staphylococcus* spp., os resultados

demonstraram que alguns isolados possuíam três mecanismos (*blaZ*, *mecA* e *msrA*) de resistência aos antimicrobianos simultaneamente. Além de que, estudos levaram à identificação do gene *mecC*, o qual é homólogo ao gene *mecA*, ambos são responsáveis pela resistência intrínseca aos antibióticos da classe dos β -lactâmicos (BLAIR et al., 2014).

Os 50% dos isolados que foram positivos para o gene, 96,5% (28/29) foram resistentes para ampicilina, amoxicilina e penicilina. A presença do gene *blaZ* prevalece em pesquisas desenvolvidas no Nordeste do Brasil (KREWER et al., 2015; MEDEIROS et al., 2011). Apenas um isolado apresentou o gene *blaZ* e não apresentou resistência fenotípica a nenhum beta lactâmicos. Pode-se sugerir que ocorreram variações na expressão genética desse isolado.

O IRMA apresentou variação de 0 a 0,6, sendo que, 62% (36/58) dos *S. aureus* apresentaram resistência a três (ampicilina, amoxicilina e penicilina) dos cinco antimicrobianos testados. O padrão de multirresistência aos antimicrobianos tem aumentado devido uso contínuo desses fármacos (LOWY, 2003; KRYCHOWIAK et al., 2014). O elevado índice de resistência pode sugerir a ausência de práticas de relacionadas ao uso racional de antibióticos, tais como a realização prévia de testes de sensibilidade antimicrobiana.

4.10. Caracterização fenotípica e genotípica da formação de biofilme

Na caracterização fenotípica da formação de biofilme, dentre as 58 amostras testadas, 31% (18/58) apresentaram fraca produção de biofilme, 56,8% (33/58) moderada e 12% (7/58) amostras foram classificadas como fortes produtoras de biofilme. Por meio da análise molecular da formação de biofilme, foi avaliada a presença dos genes *icaA*, *icaD* e *bap* que são responsáveis em parte pela síntese do biofilme. Das 58 amostras avaliadas, possuíam o gene *icaA* 39,6% dos isolados (23/58), 31% (18/58) apresentaram o gene *icaD* e 5,1% (3/58) apresentaram positividade para o gene *bap*.

Na Tabela 4, tem-se a descrição dos achados relacionados à produção do biofilme. Com base nos resultados, sugere-se que a presença dos genes envolvidos em parte pela produção de biofilme foi relevante na produção fenotípica dos isolados, uma vez que nenhum dos 58 isolados de *S. aureus* foi classificado como negativo na produção fenotípica de biofilme. Arciola et al., (2002) demonstraram que

as técnicas moleculares para identificação dos genes *ica*, que codificam a síntese do biofilme são muito importantes para uma identificação de cepas virulentas.

Tabela 4. Descrição dos achados relacionados à produção de biofilme nos isolados provenientes de leite cru no município de Afrânio, 2014.

Genotípica	Quantidade	Produção de biofilme
<i>icaA</i>	47,8% (11)	Fraca
	47,8% (11)	Moderada
	4,3% (1)	Forte
<i>icaD</i>	50% (9)	Fraca
	44,4% (8)	Moderada
	5,5% (1)	Forte
<i>bap</i>	100% (3)	Fraca
<i>icaD + icaA</i>	50% (9)	Fraca
	44,4% (8)	Moderada
	5,5% (1)	Forte
<i>icaA + icaD + bap</i>	100% (2)	Fraca

Na Tabela 4, pode-se observar que apenas dois isolados que foram positivos para os três genes pesquisados tiveram uma fraca produção de biofilme. Cramton et al. (1999) afirmaram que a formação de biofilme em superfícies inertes é altamente sensível às condições de crescimento. Oliveira et al., (2006) afirmaram que a produção *in vitro* de biofilme das bactérias pode ser influenciada por diferentes condições de crescimento e mecanismos de aderência. Guimarães et al., (2012), verificaram uma baixa concordância entre os métodos fenotípicos e genotípicos, sendo que 50% dos isolados de *Staphylococcus* spp. foram positivos para o biofilme no teste de aderência em placas e 8,3% na PCR pela detecção do gene *icaD*. Quando a técnica de aderência em placa é utilizada, pode-se sugerir que esta é uma técnica fenotípica subjetiva, pois, a produção de biofilme por uma bactéria depende de alguns fatores, dentre esses, às condições as quais são submetidas ou desafiadas.

Além de que essa discussão pode estar relacionada com outros mecanismos genéticos que determinam a produção de biofilme, os quais não foram avaliados neste estudo, tais como as sequências de inserção (*IS256* e *IS257*), que podem ocasionar a inativação do operon *ica*; e o sistema de *quorum-sensing* o qual é regulado por um operon (*agr*) que possui cinco genes (*agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* e *hld*)

os quais são responsáveis pela regulação e produção de fatores de virulência (GILOT e LEEUWEN, 2004; KOZITSKAYA et al., 2004; BOLES e HORSWILL, 2008; CROES et al., 2009; MELCHIOR et al., 2011).

O gene *bap* foi menos frequente nos isolados testados, achado que corrobora com Cucarella et al. (2001) que encontrou baixas proporções de cepas de *S. aureus* de mastite bovina positivas para pesquisa deste gene. Vautor et al. (2008), pesquisaram a presença do gene *bap* em isolados de *S. aureus* isolados de várias espécies, não sendo observada a presença do mesmo em nenhum dos isolados, sugerindo que a prevalência deste gene entre os isolados de *S. aureus* deve ser reduzida. Em 132 isolados de *S. aureus* provenientes de casos de mastite bovina na Polônia, todos apresentaram os genes *icaA* e *icaD*, e o gene *bap* encontrava-se ausente em todas as estirpes (SZWEDA et al., 2012).

Nos isolados do presente estudo, pôde-se verificar a presença de genes responsáveis pela produção e formação de biofilme de maneira fenotípica. A partir desses resultados, pode-se sugerir que isolados de *S. aureus* poderiam apresentar potencial para realizar a adesão e conseqüentemente produção biofilme nos latões que armazenam o leite, nos equipamentos/utensílios utilizados na agroindústria. Em estudo realizado por Vázquez-Sánchez et al. (2014), demonstraram que as superfícies de aço inoxidável em contato com alimentos atuam como reservatório para os *S. aureus* na indústria alimentar.

Além disso, o biofilme produzido por esses isolados seria um fator de virulência associado à mastite dos bovinos na região, pois, o biofilme é descrito como um sistema de defesa utilizado pelas bactérias, contra o sistema imune dos animais e contra a ação dos antimicrobianos (ANTUNES et al., 2007).

5. CONCLUSÕES

- Na contagem bacteriana total (CBT), a metodologia de referência (CPP) apresentou limitações na identificação de amostras impróprias para envio à indústria, tendo em vista que algumas amostras reprovadas pela citometria de fluxo foram aprovadas na CPP com base na IN 62 que exigia um limite de $6,0 \times 10^5$ UFC/mL.
- A contagem de *Staphylococcus* spp. com base na UFC/mL foi relevante para avaliação do potencial de produção de enterotoxinas.
- A contagem de coliformes totais apresentou-se satisfatória com base na avaliação de contaminantes ambientais e fecais.
- A não refrigeração do leite pode ter subestimado a presença de *Pseudomonas* spp.
- A caracterização molecular dos isolados de *Streptococcus* spp. demonstrou mais acurácia quando comparada aos testes bioquímicos realizados.
- O isolamento de *S. aureus*, representa um risco para indústria, saúde pública e sanidade dos animais do rebanho, pois, a detecção de genes de virulência (biofilme) em alguns dos isolados, demonstra sua capacidade de adesão e formação de biofilme nos utensílios e equipamentos na agroindústria. Destaca-se a importância da realização de treinamento adequado e permanente aos produtores para aplicação de boas práticas de produção.

REFERÊNCIAS

- ADJLANE-KAOUCHE, S. et al. **Nutritional and Hygienic Quality of Raw Milk in the Mid-Northern Region of Algeria: Correlations and Risk Factors.** Scientific World Journal, p. 1-7, 2014.
- AKERSTEDT, M.; WALLER, K. P.; STERNESJO, A. **Haptoglobin and serum amyloid A in relation to the somatic cell count in quarter, cow composite and bulk tank milk samples.** Journal of Dairy Research, v. 74, p. 198–203, 2007.
- ALVES, E.C.; DAHMER, A.M.; BORGES, A.F. **Total bacterial count and somatic cell count in refrigerated raw milk stored in communal tanks.** Campinas, v. 17, n. 3, p. 221-225, 2014.
- AUSUBEL, F.M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology.** John Wiley & Sons, New York, N.Y., USA, 1989.
- AMARAL, J. B. et al. **Detecção de soroalbuminas e imunoglobulinas no leite bovino como indicadores de mastite subclínica.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 25, n. 1, p. 93-97, 1995.
- ANTUNES, A. L. S. et al. **Detecção da produção de biofilme em *Staphylococcus* spp. por agar congo red.** Rev. de Saúde da UCPEL, Pelotas, v.1,n.1, 2007.
- ARAÚJO, A.R. et al. **Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions.** Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 2015.
- ARAÚJO, M. M. P. et al. **Qualidade higiênico-sanitária do leite e da água de algumas propriedades da bacia leiteira do município de Luz – MG.** Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 9, n. 2, 2009.
- ARCIOLA, C. R. et al. **Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials.** Biomaterials, v. 33, p. 5967-5982, 2012.
- ARCIOLA, C.R. et al. **Detection of slime production by means of an optimized Congored agar plate based on a colorimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for *ica* locus.** Biomaterials. v. 23, p. 4233-4239, 2002.
- ARCIOLA, C. R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. **Presence of *icaA* and *icaD* Genes and Slime Production in a Collection of Staphylococcal Strains from Catheter-Associated Infections.** Journal of Clinical Microbiology, v. 39, n. 6, p. 2151–2156, 2001.
- ARCURI, E. F. et al. **Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 58, n. 3, p. 440-446, 2006.
- ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. **Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins.** Toxins, v. 2, p. 1751-1773, 2010.

BABAEI, H. et al. **Assessment of Lactate Dehydrogenase, Alkaline Phosphatase and Aspartate Aminotransferase Activities in Cow's Milk as an Indicator of Subclinical Mastitis.** *Veterinary Research Communications*, v. 31, p. 419–425, 2007.

BARBALHO, T. C. F.; MOTA, R. A. **Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco.** *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v. 2, n. 2, p. 31-36, 2001.

BARBOSA, C. P.; BENEDETTI, E.; GUIMARÃES, E. C. **Incidência de mastite em vacas submetidas a diferentes tipos de ordenha em fazendas leiteiras na Região do Triângulo Mineiro.** *Biosci. J. Uberlândia*, v. 25, n. 6, p. 121-128, 2009.

BARROS, G. M. S.; JESUS, N. M.; SILVA, M. H. **Pesquisa de resíduos de antibióticos em leite pasteurizado tipo c, comercializado na cidade de Salvador.** *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v. 2, n. 3, p. 69-73, 2001.

BENNETT, R. M.; CHRISTIANSEN, K.; CLIFTON-HADLEY, R. S. **Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle.** *Journal of Dairy Research*, v. 66, p. 455-459, 1999.

BEXIGA, R. et al. **Dynamics of bovine intramammary infections due to coagulase-negative staphylococci on four farms.** *Journal of Dairy Research*, v. 81, p. 208–214, 2014.

BJÖRK, S. et al, **Characterization of coagulase negative staphylococci from cases of subclinical mastitis in dairy cattle in Kampala, Uganda.** *Irish Veterinary Journal*, v. 67, n. 12, 2014.

BLAIR, J. M. A. et al. **Molecular mechanisms of antibiotic resistance.** *Nature Reviews Microbiology*, 2014.

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. **agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms.** *Plos Pathogens*, v. 4, 2008.

BONNEDAHL, J. et al. **Staphylococcus aureus Carrying mecC Gene in Animals and Urban Wastewater.** *Emerging Infectious Diseases*, v.20, n.5, 2014.

BORELLI, B. M. et al. **Identificação de *Staphylococcus spp.* isolados durante o processo de maturação de um queijo-de-minas tradicional.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 63, n. 2, p. 481-487, 2011.

BORGES, M. F. et al. **Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 5, p.1431-1438, 2008.

BOZO, G. A. et al. **Adequação da contagem de células somáticas e da contagem bacteriana total em leite cru refrigerado aos parâmetros da legislação.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 65, n. 2, p. 589-594, 2013.

- BRADLEY, A. J. **Bovine Mastitis: An Evolving Disease.** The Veterinary Journal, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.
- BRADLEY, A. J. et al. **An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom.** Journal of Dairy Science, v. 98, n. 3, p. 1706–1720, 2014.
- BRAKSTAD, O. G.; AASBAKK, K.; MAELAND, J. A. **Detection of *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction Amplification of the nuc Gene.** Journal Of Clinical Microbiology, v. 30, n. 7, p. 1654-1660, 1992.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. **Regulamento Técnico de Produção, Identidade, Qualidade, Coleta e Transporte de Leite.** Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1.
- BRAUN, P. et al. **Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage-causing bacteria: a possible basis for improved shelf-life estimation.** Food Microbiology, v. 16, p. 531-540, 1999.
- BRITO, M. A. V. P. et al. **Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina.** Pesq. Vet. Bras., v. 18, n. 1, p. 39-44, 1998.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. **Qualidade do leite.** Disponível em< http://www.fernandomadalena.com/site_arquivos/903.pdf> Acesso em: 05 mai. 2015.
- BURNSIDE, K. et al. **Regulation of Hemolysin Expression and Virulence of *Staphylococcus aureus* by a Serine/Threonine Kinase and Phosphatase.** Plos One, v. 5, 2010.
- BUZZOLA, F. R. et al. **Attenuation and Persistence of and Ability To Induce Protective Immunity to a *Staphylococcus aureus* aroA Mutant in Mice.** INFECTION AND IMMUNITY, v. 74, n. 6, p. 3498–3506, 2006.
- CAFISO, V. et al. **agr -Genotyping and transcriptional analysis of biofilm-producing *Staphylococcus aureus*.** FEMS Immunol Med Microbiol, v. 51, p. 220–227, 2007.
- CARMO, L.S. et al. **Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and rawmilk in Brazil.** Food Microbiology, v. 19, p. 9-14, 2002.
- CHAGAS, L. G. S. et al. **Ocorrência de mastite bovina causada por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. E *Candida* sp. Em uma propriedade rural no município de Indianópolis – Minas Gerais, Brasil.** Biosci. J., Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 1007-1014, 2012.

CHAGUNDA, M. G. G. et al. **A Model for Detection of Individual Cow Mastitis Based on an Indicator Measured in Milk.** Journal of Dairy Science, v. 89, n. 8, p. 2980–2998, 2006.

CITAK, S.; VARLIK, O.; GUNDOGAN, N. **Slime production and dnase activity of Staphylococci isolated from raw milk.** Journal of Food Safety, v. 23, p. 281-288, 2003.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals.** Clinical and Laboratory Standards Institute. Approved Standard, 3rd ed. CLSI/NCCLS document M31 - A3. Wayne, 2008.

COELHO, S. M. O. et al. **Short communication: Profile of virulence factors of Staphylococcus aureus isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil.** Journal of Dairy Science, v. 94, n. 7, p. 3305–3310, 2011.

COSTA, E. O. **Importância da mastite na produção leiteira do país.** Revista de Educação Continuada do CRMV-SP, São Paulo, v. 1, p. 003 - 009, 1998.

COSTA, E. O. et al. **Mastite bovina por agentes ambientais: Pseudomonas sp; Plesiomonas sp; Prototheca sp.** Semina: Ci. Agr., Londrina, v. 17, n. 1, p. 22-25, 1996.

CRAMTON, S. E. et al. **The Intercellular Adhesion (ica) Locus Is Present in Staphylococcus aureus and Is Required for Biofilm Formation.** Infection And Immunity, v. 67, n. 10, p. 5427–5433, 1999.

CROES, S. et al. **Staphylococcus aureus biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the S. aureus lineage.** BMC Microbiology, v. 9, n. 229, p. 1-9, 2009.

CUCARELLA C. et al. **Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation.** J. Bacteriol., v.183, p.2888-2896, 2001.

CUCARELLA, C. et al. **Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine Staphylococcus aureus.** Infection And Immunity, v. 72, n. 4, p. 2177–2185, 2004.

DECIMO, M. et al. **Characterization of Gram-Negative Psychrotrophic Bacteria isolated from Italian Bulk Tank Milk.** Journal of Food Science, v. 79, n. 10, 2014.

DELEO, F.R; DIEP B.A; OTTO, M. **Host Defense and Pathogenesis in Staphylococcus aureus Infections.** Infect Dis Clin North Am., v. 23, n.1, p.17–34, 2009.

DIBBERN, A. G. et al. **Evaluation of methods of DNA extraction from Staphylococcus aureus in milk for use in real-time PCR.** Genetics and Molecular Research, v. 14, n. 1, p. 227-233, 2015.

- DHANAWADE, N.B. et al. **Detection of intercellular adhesion genes and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastites.** Vet. Res. Commun., v.34, p.81–89, 2010.
- DINGES, M.M; ORWIN, P.M; SCHLIEVERT, P.M. **Exotoxins of *Staphylococcus aureus*.** Clinical Microbiology Reviews, v.13, n.1, p.16-34, 2000.
- DOMENICO. E.G.D. et al. **Misidentification of *Streptococcus uberis* as a Human Pathogen: A Case Report and Literature Review.** International Journal of Infectious Diseases, v. 33, p. 79-81, 2015.
- EL-JAKEE, J. K. et al. **Emerging of coagulase negative staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard.** International Journal of Veterinary Science and Medicine, v. 1, p. 74–78, 2013.
- ELMOSLEMANY, A.M. et al. **Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 1: Overall risk factors.** J. Dairy Sci. v. 92, p. 634–2643, 2009.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. O. **Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em paúde pública.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.
- FAGUNDES, C. M. et al. **Presença de *Pseudomonas* spp em função de diferentes etapas da ordenha com distintos manejos higiênicos e no leite refrigerado.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 568-572, 2006.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food Outlook. BIENNIAL REPORT ON GLOBAL FOOD MARKETS, 2014.**
- FERGUSON, J. D. et al. **Prevalence of Mastitis Pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006.** Journal of Dairy Science, v. 90, n. 12, p. 5798–5813, 2007.
- FERNANDES, M. C. et al. **Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 61, n. 3, p. 745-748, 2009.
- FERREIRA, L. M. et al. **Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina.** Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.4, p.1228-1234, 2006.
- FONSECA, L.F.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite.** 2. ed. São Paulo: Lemos Editorial, 2001, 175p.
- FONTANA, V.L.D.D. et al. **Caracterização molecular de *Staphylococcus* isolados de vacas com mastite subclínica e ordenhadores.** Arq. Inst. Biol., v.79, n.4, p.469-476, 2012.
- FRAGA, R. et al. **Avaliação do pH e da eletrocondutividade do leite de bovinos da raça Jersey durante o primeiro mês de lactação.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 30, n. 2, p. 447-456, 2009.

FREDERICKS, D.N.; RELMAN, D.A. **Improved Amplification of Microbial DNA from Blood Cultures by Removal of the PCR Inhibitor Sodium Polyanetholesulfonate**. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n.10, p.2810-2816, 1998.

FUNAYAMA, S. et al. **Uma nova estratégia imunológica para o diagnóstico de mastite bovina subclínica**. *Tuiuti: Ciência e Cultura*, Curitiba, n. 38, p. 43-55, 2006.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L. **Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study**. *Lancet Infect Dis*, v.11, p.595–603, 2011.

GARGOURI, A.; HAMED, H.; ELFEKI, A. **Analysis of Raw Milk Quality at Reception and During Cold Storage: Combined Effects of Somatic Cell Counts and Psychrotrophic Bacteria on Lipolysis**. *Journal of Food Science*, v. 78, n. 9, 2013.

GERKE, C. et al. **Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* Polysaccharide Intercellular Adhesin**. *Journal of biological chemistry*, v. 273, n. 29, p. 18586–18593, 1998.

GILOT, P.; LEEUWEN, W. **Comparative Analysis of *agr* Locus Diversification and Overall Genetic Variability among Bovine and Human *Staphylococcus aureus* Isolates**. *Journal of clinical microbiology*, v. 42, n. 3, p. 1265–1269, 2004.

GOTTARDI, C. P. T. et al. **Qualidade higiênica de leite caprino por contagem de coliformes e estafilococos**. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 743-748, 2008.

GUHA, A; GERA, S; SHARMA, A. **Evaluation of milk trace elements, Lactate deshydrogenase, Alkaline phosphatase and Aspartate aminotransferase activity of subclinical mastitis as and indicator of subclinical mastitis in Reverine Buffalo (*Bubalus bubalis*)**. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, v.25, n.3, p.353-360, 2012.

GUERREIRO, P. K. et al. **Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção**. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

GUIMARÃES, D. et al. **Análise de experiências internacionais e propostas para o desenvolvimento da cadeia produtiva brasileira do leite**. *Agroindústria: BNDES Setorial*, v. 38, p. 5-54, 2013.

GUIMARÃES, G. et al. **Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos**. *Pesq. Vet. Bras.* v. 32, n. 12, p. 1219-1224, 2012.

- HALASA, T. et al. **Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review.** *Veterinary Quarterly*, v. 29, n. 1, p. 18-31, 2007.
- HAMADI, F. et al. **Adhesion of *Staphylococcus aureus* on stainless steel treated with three types of milk.** *Food Control*, v.38, p. 104e108, 2014.
- HAYES, M.C. et al. **Identification and Characterization of Elevated Microbial Counts in Bulk Tank Raw Milk.** *American Dairy Science Association*, v. 84, p.292–298, 2001.
- HOGAN, J.S. et al. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis.** Rev. ed. National Mastitis Council Inc., Madison, WI; 2ª edição, 2005.
- HOLLENBECK, B.L. e RICE, L.B. **Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus.** *Virulence*, v. 3, n. 5, p. 421–433, 2012.
- HOOGEVEEN, H. **Mastitis is an economic problem.** *Proceedings of the British Mastitis Conference*, Stoneleigh, p. 1-13, 2005.
- HISS, S. et al. **Haptoglobin and lactate dehydrogenase measurements in milk for the identification of subclinically diseased udder quarters.** *Veterinarni Medicina*, v.52, n.6, p.245–252, 2007.
- HOSSEINZADEH, S.H. e SAEI, D. ***Staphylococcal* species associated with bovine mastitis in the North West of Iran: Emerging of coagulase-negative staphylococci.** *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, v.2, p.27–34, 2014.
- HURTADO, M. P.; DE LA PARTE, M. A.; BRITO, A. ***Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica.** *Rev. Soc. Ven. Microbiol.*, Caracas, v. 22, n. 2, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=s1315-25562002000200003&script=sci_arttext>. Acesso em: 07 mai. 2015.
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da produção pecuária**, 2014.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em<<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=260020&idtema=135&search=pernambuco|afranio|pecuaria-2013>>. Acesso em: 05 mai. 2015.
- ITO, T. et al. **Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC.** *Drug Resistance Updates*, v. 6, p. 41–52, 2003.
- ITO, T. et al. **Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 10, p. 4997–4999, 2012.
- IZIDORO, T. B. et al. **Atividade proteolítica de bactérias psicrófilas em leites estocados em diferentes temperaturas.** *Rev. Ceres*, Viçosa, v. 60, n. 4, p. 452-457, 2013.

JAGLIC, Z. **Epidemiology and characterization of *Staphylococcus epidermidis* isolates from humans, raw bovine milk and a dairy plant.** *Epidemiol. Infect.*, v.138, p.772–782, 2010.

JAMALI, H. et al. **Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products.** *Food Control*, v. 54, p. 383–388, 2015.

JAYARAO, B.M. et al. **Differentiation of *Streptococcus uberis* from *Streptococcus parauberis* by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 16S Ribosomal DNA.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n.12, p.2774-2778,1991.

JAYARAO, B. M. et al. **Guidelines for Monitoring Bulk Tank Milk Somatic Cell and Bacterial Counts.** *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 10, p. 3561–3573, 2004.

JÚNIOR, J. C. R.; BELOTI, V. **Mastite bovina e seu reflexo na qualidade do leite – revisão de literatura.** *Revista Eletrônica de Educação e Ciência*, v. 02, n. 02, p. 01-12, 2012.

KATEETE, D.P. et al. **Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test.** *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* v.9, n.23, 2010.

KLEIN, R.C. **A C-Type Lectin from *Bothrops jararacuçu* Venom Disrupts *Staphylococcal* Biofilms.** *Plos One*, v.10, n.3, 2015.

KOZITSKAYA, S. **The bacterial insertion equence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: Association with biofilm formation and resistance to minoglycosides.** *Infection and Immunity*, p.1210–1215, 2004.

KOZYTSKA, S. **Identification of specific genes in *Staphylococcus aureus* strains associated with bovine mastites.** *Veterinary Microbiology*, v. 145, p. 360–365, 2010.

KRISTICH et al., 2014 **Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance.** Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190420/> >. Acesso em: 02 jun. 2015.

KUMAR, R; YADAV, B.R; SINGH, R.S. **Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle.** *Curr. Microbiol.* v. 60, p. 379-386, 2009.

KREWER, C.C. et al. **Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastites in the Northeast of Brazil,** *Trop. Anim. Health. Prod.*, v.47, p.511–518,2015.

KRYCHOWIAK, M. et al. **Combination of Silver Nanoparticles and**

Drosera binata Extract as a Possible Alternative for Antibiotic Treatment of Burn Wound Infections Caused by Resistant *Staphylococcus aureus*. Plos One, 2014.

KRUMPERMAN P.H. **Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods.** Appl. Environ. Microbiol., v.46, n.1, p.165-170, 1983.

LAFARGE, V. et al. **Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration.** APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, v. 70, n. 9, p. 5644–5650, 2004.

LANGONI, H. **Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina.** Pesq. Vet. Bras, v. 33, n. 5, p. 620-626, 2013.

LANGONI, H. et al. **Aspectos citológicos e microbiológicos do leite em propriedades no sistema orgânico de produção.** Pesq. Vet. Bras. v. 29, n. 11, p. 881-886, 2009.

LAMAITA, H.C. **Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.57, n.5, p.702-709, 2005.

LEÓN-GALVÁN, M.F. et al. **Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herds of central Mexico,** BioMed Research International, 2015.

LI, L. et al. **Characterization of Methicillin-Resistant and -Susceptible *Staphylococcal* Isolates from Bovine Milk in Northwestern China.** Plos One, v. 10, n. 3, p. 1-8, 2015.

LIMA, M.C.G. et al. **Contagem de células somáticas e análises físico-químicas e microbiológicas do leite cru tipo C produzido na região agreste do estado de Pernambuco.** Arq. Inst. Biol., v.73, n.1, p.89-95, 2006.

LUZ, D. F. et al. **Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*.** Revista Agrarian, v.4, n.14, p.367-374, 2011.

LV, G. et al. **Molecular characterization of foodborne-associated *Staphylococcus aureus* strains isolated in Shijiazhuang, China, from 2010 to 2012.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 78, p. 462–468, 2014.

LOWY, F. D. **Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*.** The Journal of Clinical Investigation, v. 111, n. 9, p. 1265–1273, 2003.

MACHADO, P. F. **Pagamento do leite por qualidade.** Recife: CCS Gráfica e Editora, v. 1, p. 183-191, 2008.

MACIEL, J.F. et al. **Qualidade microbiológica de leite cru comercializado em Itapetinga - BA.** Rev. Bras. Saúde Prod. An., v.9, n.3, p. 443-448, 2008.

MAHMMOD, Y. **The Future of PCR Technologies in Diagnosis of Bovine Mastitis Pathogens.** Adv. Dairy Res., v. 2, n. 1, 2013.

MARANAN, M.C. et al. **Antimicrobial resistance in staphylococci. Infectious disease clinics of north america,** v.11, n.4, 1997.

MARQUES, V.F. et al. **Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina.** Pesq. Vet. Bras. v.33, n.2, p.161-170, 2013.

MARSHALL, B.M e LEVY, S.B. **Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health.** Clinical Microbiology Reviews, v.24, n.4, p.718–733, 2011.

MARTINEZ-SUBIELA , S. **Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria.** An. Vet. (Murcia) v.17, p.97-114, 2001.

MARTINS, P.R.G. et al. **Produção de qualidade do leite em sistemas de produção da região leiteira de Pelotas, RS, Brasil.** Ciência Rural, Santa Maria, v.37, n.31, p.212-217, 2007.

MARTINS, R.P. et al. **Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá,MT.** Ci. Anim. Bras., Goiânia, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MATTOS, M. R. et al. **Qualidade do leite cru produzido na região do Agreste de Pernambuco, Brasil.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 1, p. 173-182, 2010.

MEDEIROS, L.S.et al. **Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolates from cases of mastitis in buffalo in Brazil.** J. Vet. Diagn. Invest., v. 23, n. 4, p.793-6. 2011.

MELCHIOR, M.B. et al. **Extended biofilm susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for association between genetic makeup and biofilm susceptibility.** Journal of Dairy Science, v.94, n. 12, p. 5926–5937, 2011.

MELO, P. C. et al. **Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 44, n. 1, p. 119-124, 2013.

MERINO N. et al. **Proteína A- Mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol., v. 191, n.3, p.832-843, 2009.

MENDOÇA, E.C.L. et al. **Caracterização fenogenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina.** Pesq. Vet. Bras., v.32, n.9, p.859-864, 2012.

MOHAMMADIAN, B. **The effect of subclinical mastitis on Lactate Dehydrogenase in dairy cows.** International Journal of Animal and Veterinary Advances, v.3, n.3, p.161-163, 2011.

- MOLINERI, A. I. et al. **Association between milking practices and psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk.** Revista Argentina de Microbiología, v. 44, p. 187-194, 2012.
- MONTEIRO, A.A. et al. **Características da produção leiteira da região do agreste do Estado de Pernambuco, Brasil.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 28, n. 4, p. 665-674, 2007.
- MORAES, C.R. et al. **Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.** Acta Scientiae, v.3, n.3, p.259-264, 2005.
- MOTA, R. A. et al. **Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil).** Ci. Anim. Bras., Goiânia, v. 13, n. 1, p. 124-130, 2012.
- MUNSCH-ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. **Phenotypic characterization of raw milk-associated psychrotrophic bacteria.** Microbiological Research, v. 161, p. 334-346, 2006.
- MURATA, H; SHIMADA, N; YOSHIOKA, M. **Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview.** The Veterinary Journal, v.168, p.28–40, 2004.
- NAZZARO, F; FRATIANNI, F;RAFFAELE, C. **Quorum Sensing and Phytochemicals.** Int. J. Mol. Sci., v.14, p.12607-12619, 2013.
- NERO, L.A. et al. **Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v. 27, n. 2, p. 391-393, 2007.
- NERO, L.A. et al. **Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v.25, n.1, p.191-195, 2005.
- NIELSEN, C. **Economic Impact of Mastitis in Dairy Cows.** Acta Universitatis agriculturae Sueciae, vol. 29, 2009.
- NMC. National Mastitis Council. Disponível em< <http://nmconline.org/dhiscc.htm>>. Acesso em: 15 mai. 2015.
- NORNBERG, M. F. B. L. et al. **Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk.** International Journal of Dairy Technology, v. 63, n. 1, 2010.
- NORO, G. et al. **Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul.** R. Bras. Zootec., v.35, n.3, p.1129-1135, 2006.

OLIVER, S.P. et al. **Impact of Antibiotic Use in Adult Dairy Cows on Antimicrobial Resistance of Veterinary and Human Pathogens: A Comprehensive Review.** Foodborne Pathogens and Disease, v.8, n.3, 2011.

OLIVER, S. P. et al. **Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications.** **FOODBORNE PATHOGENS AND DISEASE**, v. 2, n. 2, 2005.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. **Antimicrobial Resistance of Mastitis Pathogens.** Vet. Clin. Food Anim., v. 28, p. 165-185, 2012.

OLIVEIRA, M. et al. **Invasive potential of biofilm-forming Staphylococci bovine subclinical mastitis isolates.** J. Vet. Sci., v.12, n.1, p.95-97, 2011.

OLIVEIRA, M. et al. **Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates.** Veterinary Microbiology, v. 118, p. 133–140, 2006.

OLSEN J.E; CHRISTENSEN H; AARESTRUP F.M. **Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci.** J. Antimicro. Chemother., v.57, p.450-460, 2006.

PAIVA, C.A.V. et al. **Evolução anual da qualidade do leite cru refrigerado processado em uma indústria de Minas Gerais.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.64, n.2, p.471-478, 2012.

PALES, A.P. et al. **A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil.** Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos, Goiás, v.1, n.2, p.162 - 173, 2005.

PANTOJA, J. C. F; REINEMANN, D. J; RUEGG P. L. **Associations among milk quality indicators in raw bulk milk.** J. Dairy Sci., v.92, p.4978–4987, 2009.

PARK, H.R. et al. **Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* related to bovine mastitis.** Acta Veterinaria Hungarica, v. 62, n.1, p. 1-12, 2014.

PATEL, R. **Biofilms and antimicrobial resistance.** Clin. Orthop. Relat. Res. v.437, p.41-7, 2005.

PATERSON, G.K; HARRISON, E.M; HOLMES, M.A. **The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Trends in Microbiology, v.22, n.1, 2014.

PEPE, O. et al. ***Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxin A in Breaded Chicken Products: Detection and Behavior during the Cooking Process.** Applied and Environmental Microbiology, v.72, n.11, p. 7057–7062, 2011.

PICOLI, S.U et al. **Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo fresco de leite de cabra em laticínios.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v.26, n.1, p. 64-69, 2006.

PIESSENS, V. **Intra-species diversity and epidemiology varies among coagulase-negative *Staphylococcus* species causing bovine intramammary infections.** *Veterinary Microbiology*, v.155, p.62-71, 2012.

PILLA, R. et al. **Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis.** *J. Dairy Sci.* v.96, p.1653-1660, 2013.

PINTO, C. L. O.; MARTINS, M. P.; VANETTI, M. C. D. **Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrófilas proteolíticas.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 26, n.3, p. 645-651, 2006.

PITKALA, A. et al. **Bovine Mastitis in Finland 2001—Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance.** *J. Dairy Sci.* v. 87, p.2433–2441, 2004.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. **Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens.** *Veterinary Microbiology*, v.134, p.3-8, 2009.

PRICHULA, J. et al. **Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade das espécies de enterococos isolados de leite cru de búfalas no Sul do Brasil.** *R. bras. Ci. Vet.*, v. 20, n. 2, p. 104-109, 2013.

PITKÄLÄ, A. et al. **Bovine mastitis in Finland 2001—prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance.** *J. Dairy Sci.*, v.87, p.2433–2441, 2010.

RAYNAL-LJUTOVAC, K. et al. **Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects.** *Small Ruminant Research*, v. 68, p. 126–144, 2007.

REINOSO, E. et al. **RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts.** *Microbiological Research*, v. 159, p. 245–255, 2004.

RIBEIRO JÚNIOR, E. et al. **California Mastitis Test (CMT) e whiteside como métodos de diagnóstico indireto da mastite subclínica.** *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.9, n.4, p. 680-686, 2008.

RIBEIRO, M. E. R. et al. **Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na Região Sul do Rio Grande do Sul.** *R. bras. Agrocência*, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.

RIBEIRO NETO, A.C. et al. **Qualidade do leite cru refrigerado sob inspeção federal na região Nordeste.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.5, p.1343-1351, 2012.

RICE, L.B. **Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones.** *Mayo Clin. Proc.*, v.87, n.2, p.198-208, 2012.

RIDOLDI, G.P. et al. **Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp isolated from food in southern Brazil.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, p.125-128, 2009.

- RICE, L. B. **Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones.** Mayo Clinic: Symposium on Antimicrobial Therapy, v. 87, n. 2, p. 198-208, 2012.
- RINALDI, M.; LI, R. W.; CAPUCO, A. V. **Mastitis associated transcriptomic disruptions in cattle.** Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 138, p. 267–279, 2010.
- ROSA, D. C. et al. **Qualidade do leite em amostras individuais e de tanque de vacas leiteiras.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 79, n. 4, p. 485-493, 2012.
- ROYSTER, E.; WAGNER, S. **Treatment of Mastitis in Cattle.** Vet. Clin. Food Anim., v. 31, p. 17–46, 2015.
- RUEGG, P.L. **Practical Food Safety Interventions for Dairy Production.** J. Dairy Sci., vol. 86:(E. Suppl.):E1–E9, 2003.
- RUZAUSKAS, M. et al. **Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from livestock in Lithuania.** Veterinarski Arhiv, v.79, n.5, p.439-449, 2009.
- SAEKI, E.K. et al. **Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis.** Acta Veterinaria Brasilica, v.5, n.3, p.284-290, 2011.
- SAMARŽIJA, D. et al. **Psychrotrophic bacteria and milk quality,** Mljekarstvo, v.62, n.2, p.77-95, 2012.
- SAMPAIO, V.S.C. et al. **Influência de diferentes tipos de micro-organismos na contagem bacteriana total por citometria de fluxo do leite cru refrigerado.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.67, n.2, p.607-612, 2015.
- SANTANA, E.H.V. et al. **Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos.** Semina: Ci. Agrárias, Londrina, v. 22, n.2, p. 145-154, 2001.
- SANTOS, A. S. et al. **Crescimento de micro-organismos Psicrotróficos em leite cru refrigerado.** Alim.Nutr., Braz. J. Food Nutr., Araraquara, v. 24, n. 3, p. 297-300, 2013.
- SAWANT A.A; GILLESPIE, B.E; OLIVER S.P. **Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk.** Vet. Microbiol. v.134, p.73-81, 2009.
- SHITANDI, A. e KIHUMBU, G. **Laboratory evaluation of the improved tube test detection limits for β -lactam residues in Kenyan milk.** African Journal of Biotechnology, v.3, n.1, p.82-87, 2004.
- SHOME B.R. et al. **Multiplex PCR for the detection of five important *Staphylococcus* sp. in bovine subclinical mastitis milk.** Indian J. Anim. Sci. v. 82, n. 1, p. 9-14, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 536p.

SILVA, V.A.M. et al. **Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma granja leiteira no RS**. Acta Scientiae Veterinariae, v.38, n.1, p.51-57, 2010.

SILVA, L.C.C. et al. **Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, n. 1, p. 267-276, 2011.

SILVA, N.C.C. et al. **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of lineage ST398 as cause of mastitis in cows**. Applied Microbiology, v.59, p.665-669,2014.

SILVEIRA, M.L.R.; BERTAGNOLLI, S.M.M. **Avaliação da qualidade do leite cru comercializado informalmente em feiras livres no município de Santa Maria-RS**. Vig. Sanit. Debate, v.2, n.2, p.75-80, 2014.

SIMÕES, T. V. M. D.; OLIVEIRA, A. A. **Mastite Bovina, Considerações e Impactos Econômicos**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. 25 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 170). Disponível em: <http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2012/doc_170.pdf> Acesso em: 25 mai. 2015.

SIMOJOKI, H. et al. **Is the biofilm formation and slime producing ability of coagulase negative staphylococci associated with the persistence and severity of intramammary infection?** Veterinary Microbiology, v.158, p.344-352, 2012.

SINHA, M. KR.; THOMBARE, N. N.; MONDAL, B. **Subclinical Mastitis in Dairy Animals: Incidence, Economics, and Predisposing Factors**. Hindawi Publishing Corporation: The Scientific World Journal, 2014.

SORHAUG, T.; STEPANIAK, L. **Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects**. Trends in Food Science & Technology, v. 8, 1997.

SOUTO, L. I. M. et al. **Qualidade higiênico-sanitária do leite cru produzido em propriedades do estado de São Paulo, Brasil**. Veterinária e Zootecnia, v. 16, n. 3, p. 491-499, 2009.

SOUZA, V. et al. **Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* isolates at different sites in the milk producing dairy farms**. Brazilian Journal of Microbiology, p.1646-1650, 2012.

SUHREN, G.; REICHMUTH, J. **Interpretation of quantitative microbiological results**. Journal Milchwissenschaft, v.55, n.1, p.18-22, 2000.

SUTHERLAND, I. W. **Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework**. Microbiology, v. 147, p. 3–9, 2001.

- SZWEDA, P. et al. **Biofilm production and presence of *ica* and *bap* genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis in the Eastern Poland**, Polish Journal of Microbiology, v.61, n.1, p.65–69, 2012.
- TAPONEN, S. et al. **Clinical characteristics and persistence of bovine mastites caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP**. Veterinary Microbiology, v.115, p.199–207, 2006.
- TAPONEN, S.; BJORKROTH, J.; PYORALA, S. **Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd**. Journal of Dairy Research, v. 75, p. 422–429, 2008.
- TEBALDI, V.M.R. et al. **Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, v.28, n.3, p.753-760, 2008.
- TENHAGEN, B. A, et al. **Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany**, J. Dairy Sci., v. 89, n. 7, p. 2542-51, 2006.
- THOMPSON-CRISPI, K. et al. **Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics**. Frontiers in Immunology, v. 5, 2014.
- TREMONTE, P. et al. **Raw milk from vending machines: Effects of boiling, microwave treatment, and refrigeration on microbiological quality**. Journal of Dairy Science, v. 97, n. 6, p. 3314–3320, 2014.
- THRUSFIELD M. V. **Epidemiologia Veterinária**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 1995. 556p.
- VARGAS, L.H. et al. **Adição de Lipídios na Ração de Vacas Leiteiras: Parâmetros Fermentativos Ruminais, Produção e Composição do Leite**. R. Bras. Zootec., v.31, n.1, p.522-529, 2002.
- VARGAS, D.P. et al. **Correlações entre contagem bacteriana total e parâmetros de qualidade do leite**. R. bras. Ci. Vet., v.20, n.4, p.241-247, 2013.
- VASUVEDAN P. et al. **Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation**. Vet. Microbiol. v.92, p.179-185, 2009.
- VAUTOR, E. et al. **Evaluation of the presence of the *bap* gene in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from human and animals species**. Vet. Microbiol. v.127, p.40-411, 2008.
- VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D. et al. **Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products**. Food Control., v.39, p.8-16, 2014.

VEH, K. A. et al. **Genotypic and phenotypic characterization of *Staphylococcus aureus* causing persistent and nonpersistent subclinical bovine intramammary infections during lactation or the dry period.** J. Dairy Sci., v. 98, n. 1, p. 155–168, 2014.

VERRAES, C. et al. **A review of the microbiological hazards of raw milk from animal species other than cows.** International Dairy Journal, v. 39, p. 121-130, 2014.

VIGUIER, C. et al. **Mastitis detection: current trends and future perspectives.** Trends in Biotechnology, v.27, n.8, 2009.

WADE, K.A. et al. **Comparison of Six Methods of Extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from Processed Sputum for Testing by Quantitative Real-Time PCR.** Journal of Clinical Microbiology, v.43, p.2471–2473, 2005.

WERNER, G. et al. **Antibiotic resistant enterococci-Tales of a drug resistance gene trafficker.** International Journal of Medical Microbiology, v. 303, p.360-379, 2013.

WILLIAMS, R. E. O. **Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance.** Bacteriol. Rev., v. 27,1963.

XUE, T.; CHEN, X.; SHANG, F. **Short communication: Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis.** J. Dairy Sci. v. 97, n. 10, p. 6129-34, 2014.

YEUNG, M. **ADSA Foundation Scholar Award: Trends in culture-independent methods for assessing dairy food quality and safety: Emerging metagenomic tools.** Journal of Dairy Science, v. 95, n. 12, p. 6831–6842, 2012.

ZACARIAS, T.A. et al. **Avaliação da contagem bacteriana total e identificação de bactérias encontradas no leite de ovelha em diferentes fases de lactação.** Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ., v.1, n.1, p. 022-028, 2014.

ZADOKS, R. N.; WATTS, J. L. **Species identification of coagulase-negative staphylococci: Genotyping is superior to phenotyping.** Veterinary Microbiology, v. 134, p. 20–28, 2009.

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

ZANELA, M. B. et al. **Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.41, n.1, p.153-159, 2006.

ZASTEMPOWSKA, E.; M. ORCZYKOWSKA-KOTYNA, M.; LASSA, H. **Isolation of *nuc* mutant isolates of *Staphylococcus aureus* from bovine clinical mastitis.** The Veterinary Journal, v. 200, p. 446–448, 2014.

ZENI, M. P. et al. **Influência dos microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado para produção de UHT.** Unoesc & Ciência - ACET, Joaçaba, v. 4, n. 1, p. 61-70, 2013.

APÊNDICE A - Número de vacas e produção diária de leite por propriedade

Nº propriedade	Quantidade vacas	Litros de leite/dia
1	6	16
2	9	35
3	2	10
4	6	40
5	4	20
6	8	100
7	14	80
8	5	20
9	4	26
10	10	20
11	4	20
12	3	30
13	11	55
14	5	18
15	4	13
16	5	45
17	3	15
18	4	12
19	10	72
20	6	20
21	7	35
22	5	30
23	12	120
24	3	17
25	5	26
26	7	35
27	4	46
28	2	11
29	4	26
30	3	22
31	10	70
32	2	10
33	1	7
34	1	10
35	3	21
36	12	50
37	12	79
38	5	48
39	5	34
40	7	40
41	5	22
42	5	52
43	3	30
44	6	31