



**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA E DA
DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Staphylococcus
aureus* EM LEITE DE VACAS MASTÍTICAS**

ROBERTO MACIEL DE OLIVEIRA

2003

55905

MFN047877

ROBERTO MACIEL DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA E DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Staphylococcus aureus EM LEITE DE VACAS MASTÍTICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Doutor".

Orientadora

Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2003**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Oliveira, Roberto Maciel de

Avaliação da microbiota e estudo da diversidade genética de
Staphylococcus aureus isolados de leite de vacas mastíticas / Roberto
Maciel de Oliveira. -- Lavras : UFLA, 2003.

144 p. : il.

Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Microbiologia. 2. Leite. 3. Mastite. 4. RAPD. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

-637.1

ROBERTO MACIEL DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA E DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
Staphylococcus aureus EM LEITE DE VACAS MASTÍTICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 01 de abril de 2003

Profa. Dra. Celeste Maria Patto de Abreu

UFLA

Profa. Dra. Ivana Aparecida da Silveira

UNILAVRAS

Prof. Dr. Célio Mauro Viana

UFF

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

UFLA


Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Joaquim (in memorian) e Beatriz,
pela oportunidade de vida, pelo amor, dedicação, carinho e incentivo à
carreira;

Ao meu irmão, Renato, pelo apoio, amor e amizade;

A todos aqueles que sabem que são especiais em minha vida.

OFEREÇO.

A Deus, por me fazer compreender, a cada dia, o quanto está presente
em minha vida.

À amiga e companheira de alegrias e tristezas, minha esposa Liége, e
aos meus filhos, Alexandre, Thiago e Leonardo, pela compreensão, amor e
apoio, compartilhando cada momento deste trabalho, me ajudando a encontrar o
fio da meada deste novelo; desculpem-me se fui um pouco ausente. Nossos
esforços não foram em vão. Amo vocês!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

Ao Departamento Ciência dos Alimentos, pela convivência.

À CAPES - Comissão de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior pelo suporte financeiro por meio da bolsa concedida para a realização deste projeto.

Aos professores do Departamento de Ciência dos Alimentos, que de maneira direta e indireta, contribuíram para a realização deste curso. Em especial, à professora Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho, pela orientação, estímulo, carinho e amizade sempre demonstrados durante a realização deste trabalho. Seu voto de confiança foi muito importante e sem ele não chegaria onde estou agora.

Ao professor Célio Mauro Viana, da Universidade Federal Fluminense (UFF- RJ), pela atenção e amizade.

Ao professor João Bosco dos Santos (DBI) e ao funcionário Lamartine, pelo apoio e convívio nas análises moleculares.

Ao professor Luiz Ronaldo de Abreu (DCA), pela amizade, apoio e disponibilidade constante.

Às professoras Dulcinéia de Carvalho, Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle e Maria de Fátima Piccolo Barcelos, pelo apoio e amizade.

Aos Laticínios Serrabella, em especial ao funcionário Paulinho, pelas informações, cooperação e acompanhamento com muito boa vontade nas coletas das amostras nas fazendas.

Aos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos, ao Laboratório de Genética Molecular (DBI), ao Laboratório de Bioquímica (DQI) e ao Laboratório de Melhoramento Florestal, que tiveram fundamental participação e importância na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de mestrado e doutorado do Departamento de Ciência dos Alimentos, em especial Alberto, Cleube, Simone, Odívia Rosa, Cristiane Gattini, Alexandre Tourino, Daniela Hirsh (atualmente locada no DMV), Pedro, Rogerinho, Eduardo e Adenilde, pelo apoio incondicional e pela convivência tão harmoniosa e agradável.

À Flávia, amiga presente em todos os momentos, cujo auxílio foi de fundamental importância. Meus sinceros agradecimentos.

Às amigas que tiveram uma participação fundamental com seu carinho especial, atenção e apoio: Ivana, Ivani e Marlúcia. Não me esquecerei de vocês.

Aos funcionários do DCA, Eliane, Cipriano (Piano), Cleuza, Tina, Gicelda e Luciana, pela amizade e atenção.

Às minhas cunhadas Xulita e Cristiane e aos meus sobrinhos Rodrigo, Igor e Renata.

Aos meus tios Vicente Naves e Carminda (in memoriam) e primos Leila e Vicente pelo convívio, atenção e amizade.

À toda família do Centro Universitário do Sul de Minas (UNIS), em especial à Ronei Ximenes, Cleusa Elisabet, Márcia Bittencourt, Eduardo Cidade, Gaby Patrícia, Ana Cláudia e Tadeu Bueno, pela oportunidade, amizade e confiança. Aos funcionários Kelly, Elaine, João Lúcio e Valmir, por estarem sempre me ajudando.

SUMÁRIO

Página

Resumo geral	i
General abstract.....	ii
CAPÍTULO 1: Avaliação da microbiota e estudo da diversidade genética de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de leite de vacas mastíticas.....	1
1 Introdução Geral.....	2
2 Referencial Teórico	5
2.1 O leite e sua importância	5
2.2 Conceitos e definições sobre mastite bovina	6
2.3 O papel das células somáticas	9
2.4 Impacto da mastite sobre a composição do leite	13
2.5 Etiologia da mastite	15
2.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.5.1.1 Vacinação contra mastite causada por <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.5.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	31
2.6 Tratamento com antibióticos.....	35
2.7 Caracterização molecular.....	38
2.7.1 Reação da polimerase em cadeia (PCR).....	38
2.7.2 RAPD (random amplified polymorphic DNA)	41
2.7.3 Análise de DNA	43
3 Referências Bibliográficas	46
CAPÍTULO 2: Isolamento e caracterização da microbiota do leite proveniente de bovinos leiteiros com mastite	69
1 Resumo	70
2 Abstracts	71
3 Introdução	72

4	Material e Métodos.....	78
4.1	Obtenção das amostras	78
4.2	Análises realizadas	79
4.2.1	Análises microbiológicas	79
4.2.1.1	Preparo e diluições das amostras.....	79
4.2.1.2	Plaqueamento e contagem.....	79
4.2.1.3	Para o isolamento e identificação de coliformes totais e à 45°C	80
4.2.1.4	Para o isolamento e identificação de <i>Staphylococcus</i>	80
4.2.1.5	Para o isolamento e identificação de <i>Streptococcus</i>	81
4.2.1.6	Para o isolamento e identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	82
4.2.1.7	Para o isolamento e identificação de bacilos gram positivos	83
4.2.1.7.1	Catalase positiva, motilidade positiva.....	83
4.2.1.7.2	Bastonetes gram-positivos curtos (Cocobacilos), catalase positiva, motilidade negativa	83
4.2.1.7.3	Catalase negativa, motilidade negativa, sem produção de gás a partir da glicose.....	83
4.2.2	Preservação das colônias isoladas	84
5	Resultados e Discussão.....	85
5.1	Número de animais reagentes ao CMT	85
5.2	Microbiota presente em leite mastítico.....	86
5.2.1	Total de microrganismos aeróbios mesófilos.....	87
5.2.2	Caracterização de coliformes totais e a 45°C	89
5.2.3	Contagem e caracterização de <i>Staphylococcus</i> sp.	92
5.1.5	Isolamento de <i>Streptococcus</i> sp.	100
5.1.6	Isolamento de <i>Listeria</i> sp.	101
5.1.7	Isolamento de bacilos	102
5.1.7.2	Bacilos gram-positivos, catalase positiva, esporulados	102
5.1.7.3	Bacilos gram-positivos, catalase positiva, não esporulados	104

5.1.7.4 Bacilos gram-positivos, catalase negativa, não esporulados, produtores de ácido sem gás.....	106
6 Conclusões	107
7 Referências Bibliográficas	108
CAPÍTULO 3: Avaliação da diversidade genética de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de leite proveniente de vacas mastíticas.....	
1 Resumo	120
2 Abstracts	121
3 Introdução	122
4 Material e Métodos.....	127
4.1 Obtenção dos isolados	127
4.2 Caracterização genotípica	127
4.2.1 Extração e purificação do DNA cromossômico	127
4.2.2 Quantificação e qualificação do DNA cromossômico.....	128
4.2.3 RAPD por reação em cadeia da polimerase (PCR)	128
4.2.4 Eletroforese do DNA amplificado.....	129
4.2.5 Análise dos dados moleculares e obtenção das similaridades genéticas	129
5 Resultados e Discussão.....	131
5.1 Análise de RAPD	131
5.2 Avaliação da similaridade genética	133
6 Conclusão	138
7 Referências Bibliográficas	139

Resumo Geral

OLIVEIRA, Roberto Maciel de. **Avaliação da microbiota e estudo da diversidade genética de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vacas mastíticas.** Lavras: UFLA, 2003. 143p. (Tese-Doutorado em Ciência dos Alimentos).

Vários relatos têm sido feitos indicando que a ocorrência de mastite subclínica em vacas é elevada. É a doença mais importante que acomete a pecuária leiteira em todo o mundo, gerando grandes perdas econômicas, tanto na propriedade quanto de indústria. A etiologia da mastite é complexa e multivariada. Com a finalidade de avaliar a microbiota presente em amostras de leite proveniente de fazendas leiteiras da região de Lavras apresentando casos de mastite subclínica, utilizaram-se os meios ágar sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro e ágar Baird-Parker (ABP) em condições de aerobiose. Empregando-se o CMT como método de diagnóstico de mastite subclínica em 6 rebanhos leiteiros, observou-se uma reação positiva em 47,9% dos animais testados. A contagem média de microrganismos mesófilos aeróbios (\log_{10} UFC/mL) no meio ágar sangue nas propriedades que adotavam ordenha manual e mecânica foi de 5,86 e 5,49, respectivamente. Considerando os valores propostos pela Instrução Normativa nº 51, verificou-se que 66,7% das amostras (4/6) atenderiam ao padrão proposto para contagem de microrganismos mesófilos aeróbios. Durante as análises bacteriológicas foram isoladas 414 bactérias, sendo que 65 (15,7%) corresponderam a bactérias gram-negativas e 95 (22,9%) foram identificadas como bacilos gram-positivos. Em relação a cocos gram-positivos, 226 (54,6%) foram identificados como *Staphylococcus* como o principal gênero das mastites subclínicas, sendo o *S. aureus* (26,8%) a espécie predominante e 28 (6,76%) como *Streptococcus*. Não foi identificada *Listeria monocytogenes* nas amostras de leite analisadas. Adicionalmente utilizou-se o método RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), para avaliar o polimorfismo do DNA cromossômico de 20 isolados de *Staphylococcus aureus*, escolhidos aleatoriamente. Os resultados das análises dos perfis RAPD pela combinação dos resultados de 5 “primers” utilizados para a tipagem molecular possibilitou a divisão em 10 grupos, permitindo concluir uma variabilidade muito grande entre os isolados de *Staphylococcus aureus* por meio do coeficiente de similaridade.

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA

General Abstract

OLIVEIRA, Roberto Maciel de. **Evaluation of the microbiota and study of the genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolates of mastitic cows' milk**. Lavras: UFLA, 2003. 143p. (Thesis- Doctorate in Food Science).

There are several reports on the occurrence of sub-clinical mastitis in dairy herds around the world. This disease is an important cause of economical losses. The etiology of mastitis is complex and multivariate. With a view to evaluating the microbiota present in milk samples from dairy farms from the region of Lavras presenting cases of subclinical mastitis, the Blood agar (BA) containing 5% of defibrinated sheep blood and Baird-Parker Agar (BPA) under aerobiosis conditions were utilized. By employing CMT as a diagnosis method of subclinical mastitis in six dairy herds, a positive reaction to the test was observed in 47.9%. The average count of aerobic mesophyllic microorganisms (\log_{10} UFC/ml) in the blood agar medium for the farms, which adopt hand and mechanic milking, was of 5.86 and 5.49, respectively. By considering the values proposed by the Normative Instruction number 51, it was found that 66.7% of the samples (4/6) would meet the standard proposed for count of aerobic mesophyllic microorganisms. On the bacteriologic analyses were isolated 414 bacteria, 65 (15.7%) of them corresponding to gram-negative bacteria and 95 (22.9%) were identified as gram-positive bacillus. As regards gram-positive cocci, 226 (54.6%) were identified as *Staphylococcus* as the main genus of the subclinical mastitis, *S. aureus* (26.8%) being the predominant species and 28 (6.76%) as *Streptococcus*. *Listeria monocytogenes* was not identified in the milk samples analyzed. Additionally, the RAPD method (Random Amplified Polymorphic DNA) was utilized to evaluate the polymorphism of the Chromosomal DNA of 20 *Staphylococcus aureus* isolates, chosen randomly. The results of the analyses of the RAPD profiles by the combination of the results of five primers utilized in the molecular typing enabled the division into 10 groups, allowing to conclude a very large variability among the *Staphylococcus aureus* isolates through the similarity coefficient.

*Adviser: Professor Ds. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

CAPÍTULO 1

Isolamento, caracterização e estudo da diversidade de bactérias isoladas de leite proveniente de vacas mastíticas

1 Introdução Geral

Em decorrência do processo de internacionalização da economia, o setor leiteiro brasileiro vem passando por várias transformações, desde a melhoria da qualidade do leite na fazenda, passando pela coleta e transporte do leite refrigerado a granel. Outro fator consiste no surgimento benéfico da competitividade por melhor qualidade dos produtos, além do custo de produção e comercialização.

Embora o rebanho leiteiro brasileiro seja numericamente equivalente aos EUA, a produção americana é quase cinco vezes maior que a nossa. Esta baixa produtividade, que determina sérias conseqüências econômicas e sociais, é reflexo de vários fatores, tais como: potencial genético, manejo inadequado, mão-de-obra não qualificada, baixa tecnologia, política econômica ineficiente e problemas sanitários do rebanho, dentre estes, principalmente a mastite.

A mastite, termo derivado da palavra grega *mastos*, que significa mama, é a inflamação desta glândula normalmente em resposta a uma infecção microbiana e posterior instalação no tecido secretor de leite. A mastite pode se apresentar sob duas formas: clínica e subclínica. Além da causa infecciosa, a mastite pode ter outras: fisiológica (nos primeiros dias de lactação), na interrupção da lactação, traumática, metabólica e alérgica. A mastite infecciosa é mais importante pelos aspectos econômicos e de saúde pública.

Os prejuízos causados pela mastite são muito expressivos, isto porque, além da queda na produção, o leite produzido sob estas condições apresentará alterações físicas, químicas, microbiológicas e, ainda, modificações patológicas do tecido secretor de leite.

Diversos microrganismos podem ser considerados agentes etiológicos da mastite, tais como bactérias, leveduras, fungos filamentosos, vírus e algas. Dentre os agentes etiológicos, as bactérias merecem destaque, representando

80% a 90% dos casos. Os mais comumente relatados são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Nocardia* sp., entre outros. Dessa forma, torna-se necessária à identificação destes microrganismos patogênicos de uma forma mais rápida e confiável.

Até recentemente, a diversidade taxonômica e genômica de microrganismos era avaliada principalmente por meio da caracterização fenotípica e/ou genotípica de organismos isolados e cultivados em laboratório. Entretanto, tem sido demonstrado que os organismos cultivados representam apenas uma fração pequena da diversidade de espécies em comunidades microbianas sendo comum surgirem problemas técnicos que dificultam a interpretação dos resultados obtidos. Além disso, algumas características são instáveis, apresentando variações decorrentes do meio de cultura utilizado.

Várias metodologias envolvendo cepas de *S. aureus* têm sido descritas na literatura, no sentido de elucidar questões a respeito de surtos de intoxicação alimentar, mastite bovina, infecção hospitalar e taxonomia. O emprego de técnicas de biologia molecular tem propiciado melhor rapidez e confiabilidade nos resultados, permitindo melhor caracterização além de uma detecção fácil e segura.

A técnica de *fingerprinting* de DNA, o ensaio de RAPD (random amplified polymorphic DNA) tem sido amplamente descrita, proporcionando uma metodologia na caracterização de bactérias. A técnica utiliza pequenos “primers” únicos de seqüência arbitrária para amplificação de DNA genômico. Os perfis de produtos de amplificação, obtidos após separação eletroforética, podem ser usados como *fingerprints* das linhagens de várias espécies de microrganismos. O ensaio de RAPD é rápido, tecnicamente simples e não requer conhecimento anterior da seqüência de DNA genômico. Mudanças mínimas na

seqüência do “primer” podem produzir mudanças nos *fingerprints*, tornando possível a discriminação visual entre as linhagens.

Apesar dos êxitos da investigação, vulgarização dos seus resultados e penalizações ao produtor pela má qualidade do leite, a mastite continua sendo a doença mais importante que afeta a indústria leiteira nos nossos dias. Mesmo assim, não tem merecido a devida atenção de alguns produtores de leite, a tal ponto que uma exploração leiteira sem mastite, por mais moderna que seja, é ainda um sonho a alcançar.

Devido à importância desta doença no mundo e, principalmente no Brasil, justifica-se a execução de um trabalho onde se objetiva estudar a microbiota responsável pela mastite. Assim será possível fazer uma correta avaliação e interpretação dos microrganismos isolados, utilizando testes de identificação que levem a informações úteis, para o direcionamento de medidas de controle.

2 Referencial Teórico

2.1 O leite e sua importância

O leite é considerado o mais nobre dos alimentos, dada sua composição peculiar rica em proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e vitaminas. Constitui o alimento essencial dos recém-nascidos, para todas as espécies de mamíferos, incluindo o homem. Para a espécie humana, em particular, é indicado para todas as idades e as restrições ao seu uso são limitadas a casos excepcionais. O mesmo se aplica para todos os derivados lácteos.

Resultado de uma síntese perfeita da natureza, o leite é fundamental para a alimentação humana; no entanto, suas características nutricionais especiais constituem-se em seu ponto mais fraco, sendo altamente perecível, exigindo grandes cuidados e procedimentos tecnológicos adequados, desde a produção até o consumidor final, para que sejam mantidas suas características de qualidade como alimento (Borges & Oliveira, 1988).

Na saúde pública, o leite ocupa lugar de destaque em nutrição humana. Contudo, ao lado da indiscutível qualidade intrínseca, há o permanente risco do leite servir como veiculador de microrganismos patogênicos ou de ser alvo de fraudes durante o processamento (Chen & Hotchkess, 1993). Estes microrganismos podem contaminar o leite durante ou após a ordenha e, conseqüentemente, seus derivados, os quais podem sofrer contaminação durante o processamento e estocagem, principalmente nos casos em que há muita manipulação (Nout, 1994). O controle higiênico-sanitário dos rebanhos e da ordenha é fundamental para se garantir a composição ideal do leite e reduzir o risco de transmissão de agentes de doenças (Oliveira et al., 1999a).

Na pecuária leiteira, a doença mais importante é a mastite, havendo a necessidade do emprego de diversos antibióticos administrados por diferentes

vias e com períodos de eliminação variáveis. O leite contendo resíduos de antibióticos torna-se um alimento extremamente perigoso para a saúde pública, pois sua ingestão poderá provocar o aparecimento de cepas bacterianas antibiótico-resistentes, trazendo dificuldades de tratamento no caso de infecções posteriores, além de provocarem reações alérgicas, toxicidade, podendo causar até choques anafiláticos em indivíduos com alta sensibilidade.

2.2 Conceitos e definições sobre mastite bovina

A mastite é definida como sendo uma reação inflamatória da glândula mamária, sendo causada em grande parte por microrganismos, tais como fungos e bactérias, estas os principais agentes etiológicos. É uma doença ou, antes, um grupo de doenças comuns a todos os mamíferos, mas assumindo a sua maior importância econômica na vaca leiteira. De acordo com o National Mastitis Council dos EUA (1996), em rebanhos que não adotam medidas de controle, cerca de 50% das vacas encontram-se infectadas, em média, em dois quartos cada. No Brasil, há estimativas que apontam uma variação de 20% a 70% na prevalência da doença (Langenegger et al., 1970; Fonseca, 1992; Costa et al., 1999).

A mastite pode ser dividida em dois grandes grupos, quanto à sua forma de manifestação. Chamam-se mastite clínica os casos da doença em que existem sinais evidentes de manifestação desta, tais como edema, dor, calor, rubor, ou seja, o quarto apresenta-se edemaciado, mais quente, avermelhado e o animal reage ao toque devido à dor. Estes sintomas são acompanhados por alterações das características do leite, ou seja, descoloração, presença de filamentos, grumos e pus formado por leucócitos, os quais passam para o leite (Nikerson et al., 1994; Costa et al., 1999).

O custo de um caso clínico de mastite geralmente situa-se entre US\$ 46 e US\$ 142, com média de US\$ 107 por caso e, desse custo total, cerca de 85%

ocorrem pela diminuição da produção e descarte do leite. Pesquisas têm apontado que um único quarto infectado pode produzir aproximadamente 725 kg de leite a menos, durante uma lactação, quando comparado com um quarto sadio (National Mastitis Council, 1996). Portanto, é muito mais importante a redução da ocorrência de casos clínicos do que a diminuição dos custos com o tratamento.

Outra forma de manifestação da doença é chamada de mastite subclínica, que se caracteriza por alterações na composição do leite. Entre elas, aumento na contagem de células somáticas (CSS), aumento de ácidos graxos livres, γ -caseína, proteínas do soro, soroalbumina, IgG, lactoferrina, transferrina, plasmina, nos teores de Cl, Na⁺, lipase e diminuição nos teores de caseína total, α -caseína, β -caseína, α -lactoalbumina, β -lactoalbumina, potássio, lactose e gordura do leite. Estas ocorrências representam perdas na qualidade do leite e, conseqüentemente, na indústria de derivados lácteos (Langoni et al., 1991; Costa et al., 1994c, Auldish & Hubble, 1998; Machado et al., 1998) e que, na maioria das vezes, passa despercebido pelos produtores.

Como não existem sinais evidentes da doença, não é possível diagnosticá-la sem a utilização de testes auxiliares. Dessa forma, o sinal clássico da mastite subclínica é a elevação da contagem de células somáticas (CCS) e os testes auxiliares para o diagnóstico desta são o CMT (California Mastitis Test), o WMT (Wisconsin Mastitis Test) e a CECS (Contagem Eletrônica de Células Somáticas) (National Mastitis Council, 1996).

Considerando a redução da produção leiteira, o prejuízo causado por este tipo de mastite, segundo Costa et al. (1994b), é de algo estimado em 711.000 litros/ano em propriedades produtoras de leite B. Uma estimativa para a produção brasileira de leite tipo A, B e C está em torno de 14 bilhões de litros de leite por ano.

Em 1994 foi estimado, nos EUA, que 40% das vacas leiteiras apresentam pelo menos um quarto com mastite subclínica (Harmon, 1994). Calcula-se em US\$ 180 o prejuízo por vaca, anualmente, quando da inexistência de implantação das medidas de controle (Cullor, 1993).

No Brasil, Costa et al. (1995a), estudando propriedades leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais, avaliaram que os níveis de mastite clínica e subclínica são da ordem de 17,45% e 71,56%, respectivamente (vacas que apresentavam pelo menos um quarto com mastite). Embora não existam estimativas oficiais, pode-se inferir que o prejuízo brasileiro, devido à mastite, seja ainda maior que nos países da Comunidade Européia e nos Estados Unidos (Costa et al., 1999).

De acordo com Fonseca & Santos (2000), a mastite subclínica apresenta prevalência muito maior que a mastite clínica. Dessa forma, considera-se que, em média, a mastite subclínica é responsável por 90% a 95% dos casos da doença. A mastite subclínica se torna, assim, a forma mais importante, pois ocorre com maior frequência.

A cultura de amostras de leite de quartos mamários individuais é usada para determinar a presença de infecção na glândula mamária de vacas leiteiras (Sears et al., 1993; Bramley et al., 1996). Embora de grande utilidade para o diagnóstico e controle da mastite bovina, este processo apresenta, como limitação, o grande número de amostras que precisam ser examinadas, principalmente quando se faz acompanhamento de rebanhos e se necessita avaliar amostras repetidas vezes (Brito et al., 1998).

Uma alternativa aos exames individuais é a cultura de amostras do leite total do rebanho (Farnsworth, 1993; Brito et al., 1998), que tem sido usada para o isolamento de patógenos específicos, especialmente os patógenos contagiosos da mastite: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Godkin & Leslie, 1993).

2.3 O papel das células somáticas

A mastite, sendo uma infecção da glândula mamária, apresenta como consequência direta o aumento no número de leucócitos de origem sanguínea que são transportados para dentro do lúmen alveolar. Dessa forma, o termo “células somáticas no leite” é utilizado para designar todas as células presentes no leite, que incluem as de origem do sangue (leucócitos) e as de descamação do epitélio glandular secretor (Natzke, 1981). Portanto, quando há presença de um microrganismo patogênico na glândula mamária, geralmente a contagem de células somáticas (CCS) se apresenta elevada e esse aumento é a principal característica utilizada para o diagnóstico da mastite subclínica.

A CCS de animais individuais ou do tanque tem sido utilizada em países desenvolvidos durante as últimas décadas, desde que a ampla disponibilidade de contadores eletrônicos tornou esta metodologia acessível em grande escala. Atualmente, a CCS do tanque tem sido usada como uma importante ferramenta para monitoramento da qualidade do leite e da saúde da glândula mamária visando detectar mastite subclínica no rebanho, para estimar as perdas de produção de leite em decorrência da mastite e como um indicador das características qualitativas/higiênicas do leite (Brito et al., 1998)

Em animais sadios, 65% a 70% do total de células somáticas são células de origem epitelial. Este número cai para 50% em animais com mastite crônica e alcança valores ainda mais baixos (10% a 45%) em casos mais severos (Fonseca & Santos, 2000).

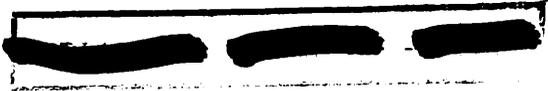
As células somáticas predominantes são os neutrófilos polimorfinucleares (PMN) no colostro e os macrófagos no leite. Particularmente, os PMN são vitais para a eliminação das infecções por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A maior parte das infecções por *Escherichia coli* é autolimitada (Rendos et al., 1975). Por outro lado, falha nos mecanismos fagocitários permite que o *S. aureus* sobreviva no interior dos fagossomas,

principal razão pela qual as infecções por esse microrganismo tendem a ser de caráter crônico. Devido a tal fato, esse microrganismo é mais comumente relacionado a casos de mastite bovina. Particularmente no caso do controle de mastites por *S. aureus*, é muito interessante conhecer a maneira como os diversos antibióticos interatuam com os fagolisossomas e se aí são capazes de manter sua atividade (Matos, 1994). Outras bactérias, como *Salmonella*, *Mycobacterium* e *Legionella*, são também conhecidas por evitarem a fusão dos fagossomas com os lisossomas, escapando assim às suas enzimas (Finlay & Falkow, 1997).

Existem alguns métodos para a detecção da mastite que podem ser feitos no campo ou em laboratórios. Dentre eles, destacam-se o “tamis” ou teste da caneca de fundo preto, o exame visual das características do úbere, métodos químicos indiretos (CMT), exame microbiológico do leite e CCS.

De acordo com Radostitis et al. (1994), o teste da caneca de fundo preto é utilizado ao pé do animal, antes de se iniciar a ordenha, facilitando a observação de grumos, pus, filamentos e soro, quando desprezados os primeiros jatos de leite. Portanto, tem como objetivo detectar a mastite clínica.

Outro método de detecção da mastite é o CMT (*California Mastitis Test*), o qual consiste num teste um pouco mais sofisticado, detectando a mastite subclínica em leite de vacas aparentemente normais. Apresenta resultado instantâneo, podendo ser realizado antes da ordenha, permitindo classificar o leite em normal ou anormal (Brito et al., 1997). O princípio da prova do CMT baseia-se na reação de um detergente aniônico (alquil-lauril sulfonato de sódio) que atua sobre as células somáticas presentes no leite, rompendo suas membranas e liberando material nuclear (DNA). A liberação deste material produz uma viscosidade que caracteriza a reação, cuja concentração é proporcional ao número de células somáticas. Este método foi idealizado por



Schalm & Noorlander (1957) e o resultado do CMT é dado como negativo, suspeito, fracamente positivo, positivo e fortemente positivo.

Entre os padrões para avaliação da qualidade do leite em âmbito mundial, a contagem de células somáticas (CCS) tem sido utilizada pela grande maioria dos países. A União Européia, a Nova Zelândia e a Austrália adotam, atualmente, como limite máximo legal, 400.000 cél./mL para o leite destinado ao consumo humano. O Canadá adota 500.000 cél./mL e os EUA fixam esse valor em 750.000 cél./mL (Philpot, 1998). Historicamente, tem havido um crescente esforço desses países no sentido de reduzir o limite máximo para a CCS, uma vez que o leite com baixa CCS apresenta qualidade superior.

Recentemente, a legislação sobre a produção de leite no Brasil foi alterada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O antes denominado "Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite", que tinha como objetivo implementar várias mudanças na legislação brasileira no que se refere à qualidade do leite, passou por consulta pública e, após algumas alterações, se transformou na Instrução Normativa nº 51. As principais mudanças que esta nova Instrução Normativa traz são: a adoção de parâmetros de qualidade, como a contagem padrão em placas; a contagem de células somáticas; a ausência de resíduos de antibióticos, entre outras. A adaptação dos produtores a esta nova lei será feita de forma gradual, até atingir os níveis finais de requerimento em um prazo de dois anos (Brasil, 2002).

Não existem, na literatura, resultados quantitativos sobre os efeitos da alta CCS no leite cru sobre a qualidade do leite pasteurizado. Entretanto, em recente estudo, Ma et al. (2000) analisaram a qualidade do leite pasteurizado com alta ($>8,94 \times 10^5$ cél./mL) e baixa ($<4,5 \times 10^4$ cél./mL) CCS e concluíram que o leite com alta CCS apresentou maior taxa de lipólise e proteólise quando armazenado à temperatura de 5°C em comparação com leite com baixa CCS. Os autores relataram que o leite com baixa CCS apresentou alta qualidade

organoléptica, mesmo após 21 dias de armazenagem a 5°C, enquanto que o leite com alta CCS apresentou sérios defeitos organolépticos após 14 dias de armazenagem a 5°C, principalmente os sabores amargo e de ranço. Os resultados desse estudo podem justificar a implementação de programas para pagamento diferenciado para leite produzido com baixa CCS, quando destinado à produção de leite pasteurizado.

Existe uma relação entre a contagem de células somáticas e o rendimento de transformação do leite, de tal forma que os laticínios produzidos com leite com mais de 500.000 células possuem numerosos defeitos (Fonseca & Santos, 2000). Matioli (2000), verificando a influência do leite mastítico no rendimento do queijo minas frescal, observou uma redução do rendimento em até 9,81% em leites com alta CCS.

A facilidade com que estas células podem ser contadas eletronicamente fez delas um parâmetro muito utilizado para o pagamento do leite segundo a qualidade em muitos países. Este método pode ser conduzido de duas maneiras: em grande escala, por meio do método fluoro-opto-eletrônico em equipamento Fossomatic 90 ou em laboratório, pela visualização em placas de petri marcadas.

A correlação entre CCS e a percentagem de quartos infectados, num rebanho, não é muito elevada. Por esta razão, este parâmetro não deve ser utilizado como critério de decisão único para o tratamento (Matos, 1994).

Comparando a sensibilidade do método CMT com o método CCS, Brito et al. (1997) concluíram que ambos os métodos possuem vantagens e desvantagens. O CMT é o método mais indicado para ser utilizado pelo produtor, possibilitando, dessa forma, identificar animais sob risco. A CCS representa uma tendência em países economicamente desenvolvidos, que pagam pelo leite em função da qualidade, mostrando o CMT como o teste mais preciso. Os escores do CMT apresentam correlações variadas com a CCS (Philpot & Nickerson, 1991; Quinn et al., 1994).

O exame microbiológico de amostras de leite permite detectar e identificar a presença do agente etiológico causador da infecção intra-mamária. Ao comparar o CMT e o exame microbiológico para detecção da mastite bovina, Costa et al. (1993) concluíram que 5.047 exames de CMT positivos coincidiram com o exame microbiológico em 70,97%, apontando uma boa correlação entre os dois métodos comparados. Em 1997, Costa et al., comparando métodos de diagnóstico microbiológico para detecção de mastite, concluíram que maior sensibilidade foi registrada para a incubação a 37°C por 12 horas, embora uma maior taxa de contaminação tenha sido observada do que em outros métodos.

2.4 Impacto da mastite sobre a composição do leite

Como resultado da resposta inflamatória, durante a mastite são observadas intensas mudanças nas concentrações, tanto dos principais componentes (p. ex., proteína, gordura e lactose) quanto dos componentes encontrados em menores níveis no leite (p. ex., minerais e enzimas) (Kitchen, 1981). Estas mudanças na composição do leite ocorrem devido à redução na secreção de componentes do leite que são sintetizados na glândula mamária, como a proteína, gordura e lactose. Adicionalmente, durante a mastite, ocorre aumento da permeabilidade vascular, resultando em aumento do influxo de componentes do sangue para dentro do leite.

O efeito da mastite sobre a concentração total de proteína do leite é variável (Auldism & Hubble, 1998). Entretanto, devido ao aumento do influxo de proteína de origem sanguínea (p. ex., imunoglobulinas e soroalbumina bovina) e a concomitante diminuição da síntese de proteína nas células epiteliais (α -caseína, β -caseína, α -lactoalbumina and β -lactoglobulina), o efeito geral é de manutenção de níveis de proteína total relativamente constantes ou de mudanças muito pequenas (Kitchen, 1981; Auldism & Hubble, 1998).

Durante a mastite, a síntese de caseína é normalmente diminuída. Diversos relatos têm descrito que a caseína como porcentagem da proteína total (CN/PT) é reduzida à medida que ocorre aumento da CCS (Verdi et al., 1987; Klei et al., 1998). Verdi et al. (1987) avaliaram a composição do leite do tanque de diferentes fazendas leiteiras durante o período de dois anos e, desconsiderando as variações sazonais, a porcentagem de caseína/proteína total foi menor para o leite de vacas com mastite subclínica em comparação com leite normal.

A diminuição da caseína como porcentagem da proteína total do leite, à medida que ocorre aumento da CCS, deve-se à redução da síntese e à proteólise da caseína (Senik et al., 1985). A plasmina, a principal protease presente no leite, responsável pela degradação da caseína, causa a sua proteólise dentro do úbere durante a mastite, mesmo antes da ordenha do leite (Saeman et al., 1988; Verdi & Barbano, 1991).

A mastite também determina mudanças nas concentrações das várias frações de caseína presentes no leite com níveis aumentados de CCS. De acordo com Le Roux et al. (1995), quando a CCS do leite está aumentada ocorre redução da concentração de α -caseína e β -caseína, e aumento na concentração de γ -caseína. Estas mudanças na composição das frações de caseína resultam em importantes mudanças sobre a qualidade do processamento do leite.

O aumento da CCS do leite também afeta a concentração de proteína do soro, resultando em aumento da concentração de proteínas do soro, soroalbumina bovina e imunoglobulinas (Rogers et al., 1989). Estas alterações são causadas, principalmente, pelo influxo aumentado de substâncias do sangue para dentro do leite, passando através das membranas. Como a α -lactoglobulina e β -lactoalbumina são sintetizadas na glândula mamária, a concentração destas proteínas encontra-se reduzida durante a mastite (Rogers et al., 1989).

O efeito da mastite sobre a gordura do leite não foi estudado de maneira tão intensiva quanto para a proteína (Auldish & Hubble, 1998). Existe variação quanto ao efeito da mastite sobre a concentração total de gordura do leite. Dessa forma, a concentração total de gordura do leite é normalmente reduzida no leite com alta CCS quando comparado com o leite normal, uma vez que a mastite interfere com a habilidade da glândula mamária de sintetizar a gordura (Kitchen, 1981; Munro et al., 1984). No entanto, de maneira inversa, Miller et al. (1983), avaliando leite de vacas individuais e Mitchell et al. (1986), utilizando leite de tanque, descreveram que a concentração total de gordura do leite aumentou no leite com alta CCS.

A inflamação da glândula mamária resulta em diminuição da síntese de lactose e, conseqüentemente, a concentração deste composto no leite é menor no leite de vacas com mastite em relação ao leite normal (Auldish et al., 1995). A redução da concentração da lactose do leite com alta CCS é, em parte, devido às lesões nas células alveolares. No entanto, outros fatores como a passagem de lactose para o sangue, também podem estar envolvidos. Klei et al. (1998) demonstraram que, quando a CCS do leite aumenta de 83.000 para 872.500 cels/ml, a concentração de lactose do leite diminui de 4,977% para 4,707%.

2.5 Etiologia da mastite

A etiologia da mastite é complexa e multivariada (Watts, 1988). Embora as mastites possam ter uma origem traumática ou num distúrbio fisiológico, sem interferência microbiana, isto constitui mais a exceção do que a regra. Usualmente são as bactérias os microrganismos implicados, mas os fungos (Richard et al., 1980), micoplasmas (Bushnell, 1984) e algas aclorofiladas (Costa et al., 1992, Costa et al., 1995a; Costa et al., 1998) podem ser também responsáveis pela infecção da glândula mamária. A literatura refere-se a 137 espécies microbianas pertencentes a 35 gêneros identificados como agentes

etiológicos de mastite bovina e já isoladas, pelo menos uma vez, da glândula mamária da vaca (Watts, 1988; Brito et al., 1995). Entretanto, o número de espécies mais frequentemente isoladas é bastante reduzido e estudos epidemiológicos mostraram que os agentes etiológicos da mastite podem convencionalmente ser agrupados, quanto à sua origem e modo de transmissão, em dois grupos: microrganismos contagiosos e ambientais. Dessa forma, classicamente, divide-se a mastite em dois grandes grupos, quanto ao tipo de agente patogênico causador: mastite contagiosa e mastite ambiental (Rebhun et al., 1995).

A mastite contagiosa caracteriza-se por apresentar baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos, geralmente de longa duração ou crônicos e apresentando alta contagem de células somáticas (CCS). Esse tipo de mastite é causado por patógenos cujo hábitat preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos. Assim, de acordo com Fonseca & Santos (2000), os microrganismos patogênicos específicos vivem e multiplicam-se no úbere e são transmitidos de vaca para vaca pelas mãos do ordenhador, panos para limpeza dos tetos e teteiras.

Podem-se dividir as bactérias causadoras de mastite contagiosa em dois grandes grupos: patógenos principais e patógenos secundários. Entre os patógenos principais, destacam-se: *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus agalactiae* e, entre os patógenos secundários, o *Corynebacterium bovis*. Este último, em termos de patogenicidade, apresenta limitada virulência, determinando um pequeno aumento na CCS em torno de 300 a 400 mil células/ml. Os casos são quase sempre subclínicos e leves e é isto que determina a classificação de tal agente como sendo um patógeno secundário (Radostidis et al., 1994). É um dos agentes de maior prevalência em mastites, de acordo com levantamentos realizados em diferentes países e no Brasil com prevalência variando entre 9,23% e 32,5% (Costa et al., 1985; Langoni et al., 1991; Costa et al., 1995a).

Entretanto, o agente é isolado em menos de 1% dos quartos nos rebanhos que adotam pré e pós “dipping” (Langoni et al., 1991; Costa et al., 1995b).

Nocard & Mollereau, em 1984, citam o isolamento do primeiro agente etiológico da mastite bovina, que mais tarde foi identificada como pertencente ao gênero *Streptococcus*. No Brasil, em 1931, *Streptococcus* sp. foi o primeiro gênero isolado em amostras de leite mastítico, por Reis e Swenson (Costa et al., 1994a).

Os *Streptococcus* sp. são bastante prevalentes em levantamentos realizados no Brasil, com percentuais variando de 11,4% a 46,5% (Langnegger et al., 1970; Harrop et al., 1975; Ferreira et al., 1981).

Pesquisas têm demonstrado que medidas simples de controle, como a diminuição da exposição dos tetos aos patógenos por meio da desinfecção dos mesmos após cada ordenha com um desinfetante apropriado (pós-dipping); o aumento da resistência imunológica da vaca, conseguida pelo correto balanceamento da dieta e vacinações; antibioticoterapia; o tratamento sistemático de casos clínicos e o refugo de vacas crônicas. Tais procedimentos podem reduzir significativamente a incidência deste grupo de microrganismos (Costa et al., 1999; Oliver et al., 1999; Faria et al., 2000).

Estudos realizados em Nova York e Pensilvânia, em rebanhos acompanhados por um programa de monitoramento, registraram menor incidência de mastite em relação àqueles sem controle adequado (Wilson et al., 1997).

Do ponto de vista do diagnóstico e controle, é extremamente importante diferenciar *S. agalactiae* dos demais. Isto porque este microrganismo por ser suscetível a antibióticos, pode ser facilmente erradicado dos rebanhos, enquanto as outras espécies não podem e não respondem às mesmas medidas de prevenção e controle (Brito & Brito, 1999).

O outro grupo, a mastite ambiental, é causada por agentes que vivem preferencialmente no hábitat da vaca, em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas. Esse tipo de mastite caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração, frequentemente com manifestação aguda e com maior concentração nos momentos do pré e pós-parto imediato (Erb et al., 1984; Erskine et al., 1988).

Segundo Costa (2000), ao contrário da mastite contagiosa, nesse caso, a maioria das novas infecções ocorre durante o período entre as ordenhas, embora também haja ocorrência de novos casos durante as ordenhas, especialmente em situações nas quais há problemas de funcionamento do sistema de ordenhas.

Uma particularidade de destaque na mastite ambiental é que ela geralmente se manifesta em rebanhos bem manejados e com baixa CCS. Isso porque a alta prevalência de mastite subclínica e a alta CCS dos rebanhos com problemas de mastite contagiosa conferem, até certo ponto, uma proteção parcial contra os agentes ambientais (Fonseca & Santos, 2000).

Existem dois grandes grupos de bactérias causadoras de mastite ambiental e que apresentam algumas características próprias: coliformes (*Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. e *Enterobacter* sp.) e *Streptococci* ambientais (*Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*). Os patógenos ambientais mais importantes são os coliformes e os estreptococos esculina-positivos.

Dentre os bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos (Enterobacteriaceae, Vibrionaceae e Pasteurellaceae), a família Enterobacteriaceae é isolada com maior frequência da mastite bovina. A *Escherichia coli* é a espécie característica da família em até três quartos dos casos de mastite (Bramley, 1985; Watts, 1988). Uma proporção similar de estreptococos esculina-positivos foi identificada como *Streptococcus uberis* (Bramley, 1984).

Objetivando estudar a freqüência de mastite clínica e subclínica nos quartos mamários, Leal (1999) isolou, entre outros microrganismos, *E. coli* (58,3%) e *Klebsiella pneumoniae* (8,3%).

Doenças entéricas causadas por espécies de *E. coli* enterotoxigênicas são de grande importância e, freqüentemente, os alimentos são implicados como vetores. As cepas patogênicas de *E. coli*, quando ingeridas com o alimento, poderão produzir cinco tipos de diarreias em humanos: enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC, VEHC) e enteroagregativa (EAgEC), segundo Franco & Landgraf (1996). Particularmente no Brasil, as cepas de *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) representam um dos principais patógenos responsáveis por diarreia em crianças com menos de um ano, sendo continuamente detectados como dominantes os sorogrupos O111 e O119 (Almeida et al., 1998).

O sorotipo O157:H7 (EHEC) tem sido assunto de muitas pesquisas por estar associado à ocorrência de surtos de infecções, os quais muitas vezes, apresentam o leite como veículo, apesar de Duncan & Hackney (1994) e Corrêa et al. (2000) afirmarem não estar relacionada com a mastite.

Pseudomonas aeruginosa tem sido identificada como um patógeno animal e como um agente de mastite bovina, segundo Daly et al. (1999), tendo sido responsável por surtos de mastites em onze rebanhos leiteiros na Irlanda.

Assim como nos métodos de controle da mastite contagiosa, os mesmos métodos para o controle da mastite ambiental baseiam-se, principalmente, em dois princípios básicos: diminuição da exposição dos tetos aos patógenos e aumento da resistência da vaca. Este último preocupa-se, além do balanceamento da dieta, com a integridade do esfíncter do teto.

Em relação à redução da exposição dos tetos aos patógenos, a utilização de camas orgânicas predispõe ao desenvolvimento de alta concentração de bactérias. Sabe-se que as camas à base de maravalha ou serragem apresentam

possibilidade de multiplicação exponencial de coliformes (Rendos et al., 1975). Já as camas à base de palha proporcionam grande crescimento dos *Streptococci* ambientais. Portanto, considerando a característica de crescimento bacteriano, a cama de areia foi eleita a preferida para vacas leiteiras.

Ao avaliarem a CCS em tanques de expansão, Barkema et al. (1998) verificaram que a mastite clínica causada por patógenos gram-negativos, tais como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. ou *Pseudomonas* sp., ocorreram mais freqüentemente em rebanhos com baixas CCS. Já em rebanhos com altas CCS, a mastite era causada por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae*. Resultados semelhantes foram observados por Smith et al. (1985) e Hillerton et al. (1995).

A *Serratia* sp. também poderá apresentar-se como agente da mastite por ocasião do uso de soluções pré e pós “dipping” contaminados (Rebhun et al., 1995).

As bactérias do gênero *Bacillus* são saprófitas e, portanto, patógenos oportunistas. Geralmente estão associadas a contaminações cirúrgicas e a lesões nos tetos, causando mastite aguda ou superaguda, podendo levar o animal a óbito (Blood & Radostis, 1991).

Segundo Rea et al. (1992), entre os microrganismos patogênicos isolados do leite, também considerados como agentes etiológicos da mastite bovina, estão, além de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp. e *Escherichia coli*, a *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*.

Um grupo muito particular de bactérias, nomeadamente outras espécies de *Staphylococcus* que não o *S. aureus*, não pode ser incluído em nenhum dos grupos antes citados, pois não podem ser considerados verdadeiros microrganismos do úbere e não têm também uma origem ambiental. A designação de microbiota oportunista da pele foi proposta para designar este grupo (Fonseca & Santos, 2000).

De todos os microrganismos, *Staphylococcus* sp. é o mais freqüente. Embora possa ser isolado de diferentes locais em um rebanho, a principal fonte de eliminação são as glândulas mamárias infectadas (Brabes, 1999; Leite, 2000; Pádua, 2001). Seguem-se *Corynebacterium bovis* e *Streptococcus* sp. Ao estudarem a etiologia bacteriana da mastite bovina, por meio do exame microbiológico, Costa et al. (1986) observaram que, em 2.533 amostras de leite, fizeram-se presentes os microrganismos *Staphylococcus aureus* (49,23%), *Streptococcus* sp. (27,08%), *Corynebacterium* sp. (30,67%), *Enterobacteriaceae* (4,26%), *Pseudomonas* sp. (1,06%) e 5,64% corresponderiam a *Actinobacillus* sp., *Moraxella* sp., *Brucella* sp., *Listeria* sp., *Aeromonas* sp., *Kurthia* sp., *Alcaligenes* sp., *Lactobacillus* sp., *Chromobacterium* sp., *Neisseria* sp., *Acinetobacter* sp., *Nocardia* sp. e *Streptomyces* sp. Em um outro estudo, também desenvolvido por Costa et al. (1994a) a partir de 11.189 amostras, a porcentagem de *Staphylococcus* sp. foi de 31,20%, a de *Corynebacterium* sp., 24,46% e a de *Streptococcus* sp., 13,42%, enquanto outros microrganismos foram encontrados em menor porcentagem.

Além destes agentes, incluem-se também *Arcanobacterium pyogenes* (antigo *Actinomyces pyogenes*), *Pseudomonas* sp. e outros microrganismos, tais como fungos, principalmente leveduras e algas aclorofiladas (*Prototheca zopfii*). De acordo com Smith et al. (1985), as medidas utilizadas corretamente durante as ordenhas, nomeadamente a desinfecção dos tetos, não são eficazes no controle destes microrganismos, pois a contaminação ocorre entre ordenhas. No entanto, respondem às boas condições gerais de higiene.

Segundo Moretti et al. (1998), os fungos filamentosos e leveduriformes mais comumente encontrados em animais mastíticos foram *Trichosporon capitatum* (31,2%), *T. beigelli* (18,72%), *Candida albicans* (12,48%), *C. guilliermondii* (12,48%), *C. tropicallis* (12,48%), *C. parapsilosis* (6,24%) e *Saccharomyces cerevisiae* (6,24%) e, dentre as bactérias *S. aureus* (34,3% do

total de amostras positivas para bactérias), *S. albo* (19,8%), *Streptococcus* sp. (17,2%), *Escherichia coli* (23,2%), *Proteus vulgaris* (5,15%) e *Pseudomonas aeruginosa* (0,5%).

Amostras de leite de casos de mastite clínica podem dar resultados negativos após cultivo microbiológico em 25% a 30% dos casos. Com alguns microrganismos, por exemplo, os coliformes, o número de bactérias na amostra pode ser muito baixo para ser detectado pelos métodos de rotina. Em outros casos, a infecção pode já ter sido eliminada, mas persiste uma elevada contagem de células porque a cura das lesões não se completou e os leucócitos continuam se movimentando em direção à glândula mamária. Contudo, quando amostras de leite de um rebanho são sempre negativas na cultura, deve-se pensar também na possibilidade de um microrganismo não comum, que não cresce normalmente nos meios de cultivo usados na rotina laboratorial como, por exemplo, espécies de *Mycoplasma* (Brito et al., 1998).

2.5.1 *Staphylococcus aureus*

Mastite bovina é a principal doença do gado leiteiro em todo o mundo devido aos prejuízos econômicos que acarreta ao produtor e à perda da qualidade do leite (National Mastitis Council, 1996). Dentre os agentes da mastite, *Staphylococcus aureus* é o mais freqüentemente isolado em diversos países (Booth, 1995; Aarestrup et al., 1995; National Mastitis Council, 1996). No Brasil, relatos de isolamento de *S. aureus* de mastite subclínica são conhecidos desde o início da década de 1950 (Lacerda Jr. et al., 1954). Desde então, trabalhos realizados nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul do país mostraram a predominância desse microrganismo sobre os demais agentes da doença (Brito & Brito, 1996; Wilson et al., 1997; Sá et al., 2000).

Staphylococcus aureus é a espécie do gênero *Staphylococcus* que se apresenta em forma de cocos gram-positivos não esporulados, catalase e

coagulase positivos, que se dividem em mais de um plano para formar racimos tridimensionais de células, denominados "cachos de uva". Do ponto de vista morfológico, os estafilococos são parecidos ao gênero *Micrococcus*, porém, em contraposição ao metabolismo respiratório estritamente aeróbio dos micrococcos, crescem em anaerobiose e mostram um metabolismo de anaeróbio facultativo. A diferenciação entre as espécies está amparada pela homologia do DNA e por estudos imunoquímicos. A diferenciação e caracterização entre as espécies se baseiam em provas bioquímicas e padrões de resistência. O *S. aureus* pode se dividir em vários biotipos e ecotipos e, além disso, pode ser classificado por fagotipagem, sorotipagem, perfil de plasmídios e mediante ribotipagem (APHA, 1992; Holt et al., 1994; ICMSF, 1998; Pereira et al., 2000).

A taxonomia dos estafilococos tem sofrido mudanças importantes nos últimos 20 anos e na edição do Manual Bergey's (1986) se admitem 19 espécies de estafilococos. Atualmente, cerca de 33 espécies de *Staphylococcus* são reconhecidas, dentre elas, *S. aureus* permanece como sendo um patógeno comum na glândula mamária (Langlois et al., 1990; Kloss et al., 1992).

As provas mais frequentes para diferenciar *S. aureus* de outros estafilococos são as de coagulase e termonuclease (Chang & Huang, 1995; Su & Wong, 1995; Gay & Fox, 2001). Entretanto, nenhuma destas provas é absolutamente específica, uma vez que outras espécies de estafilococos podem produzir quantidades pequenas de coagulase. Por isso, recomenda-se a utilização de outros dispositivos de identificação bioquímica, como o sistema API Staph-Ident e a prova do fator de agregação para determinar os produtores eficazes de coagulase (ICMSF, 1998; Pereira et al., 1999; Sharma et al., 2000).

Baseando-se na capacidade de coagulação do plasma, os *Staphylococcus*, tradicionalmente, são divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos, que é uma propriedade considerada como importante marcador de patogenicidade dos estafilococos (Trabulsi et al., 1999;

Gay & Fox, 2001). Entretanto, as espécies coagulase negativos também podem estar envolvidas em quadros de mastite (Nickerson et al., 1994; Aarestrup et al., 1995; Wilson et al., 1997). No Brasil, foi detectado um índice de 38% de *Staphylococcus* coagulase negativos em rebanhos no estado do Paraná (Filippsen et al., 1996).

Espécies de estafilococos coagulase negativos estão entre os mais importantes patógenos e sua identificação é também considerada importante para provir diagnóstico preciso da etiologia de infecções estafilocócicas. O principal representante é o *Staphylococcus epidermidis*, embora muitas outras espécies do gênero sejam coagulase negativos e também patogênicas (Kotilainen et al., 1991). Em geral, a maioria das espécies estafilocócicas coagulase negativos mais comumente disseminadas parece ser *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus simulans* (Filippsen et al., 1996).

Segundo a Resolução RDC nº 12 (Brasil, 2001), a enumeração de estafilococos coagulase positiva tem por objetivo substituir a determinação de *Staphylococcus aureus*. A determinação da capacidade de produção de termonuclease e, quando necessária, a de toxina estafilocócica das cepas isoladas pode ser realizada a fim de se obter dados de interesse à saúde pública. Embora não haja um padrão para contagem de *Staphylococcus aureus* para o leite, é importante esclarecer que este microrganismo está principalmente envolvido em infecções intramamárias de fêmeas em lactação. Este é o principal agente causador de mastite em bovinos, capaz de produzir uma grande variedade de toxinas extracelulares e de fatores de virulência que estão relacionados à sua patogenicidade, além de apresentar uma grande resistência aos antimicrobianos existentes (Matsunaga et al., 1993).

Existe uma controvérsia com respeito à interpretação correta de resultados para o teste de coagulase. De acordo com Benett & Lancette (1995),

resultados 1+, 2+ e 3+ raramente correlacionam com resultados de outros critérios para *S. aureus*. Entretanto, protocolos da AOAC (1990) e APHA (1992) são mais flexíveis. AOAC considera positivos resultados de 1+ a 4+, enquanto que a APHA considera somente 3+ e 4+ como resultados positivos.

Matthews et al. (1997) advertem que, apesar da maioria das cepas de *S. aureus* ser coagulase positiva, algumas cepas podem ser atípicas e não produzir coagulase. Estas cepas não são rotineiramente identificadas como agentes de mastite bovina, sendo que infecções com cepas atípicas geralmente ocorrem dentro de um mesmo rebanho. Além disso, pode ocorrer que estas cepas não sejam corretamente diagnosticadas (por serem consideradas como estafilococos coagulase negativos), resultando em tratamento incorreto dos animais. Isto pode também influenciar o resultado de pesquisas feitas com o objetivo de determinar a prevalência de algum patógeno em particular, a eficácia de certas terapias ou de agentes germicidas (Fox et al., 1996; Matthews et al., 1997).

Trabalhando com leite proveniente de vacas mastíticas no Rio Grande do Sul, Silva et al. (2000) verificaram que todas as cepas identificadas como *S. aureus* foram coagulase positivos, mas a intensidade da reação variou de acordo com a fonte: cepas isoladas de amostras ambientais foram 3+ ou 4+, enquanto 17,1% daquelas isoladas do leite foram apenas 1+ ou 2+.

Trabalhos mais recentes mostram a importância da participação de *S. aureus* em quadros crônicos de infecções intramamárias e a dificuldade em combater a bactéria, mesmo por meio de combinações de trabalhos entre drogas mais potentes *in vitro*, reafirmando os resultados de trabalhos prévios da natureza intratável dessas infecções causadas por *S. aureus* (Owens et al., 1997).

Após entrar na glândula mamária através do canal do teto e adaptar-se ao úbere, a bactéria pode multiplicar-se rapidamente iniciando uma reação inflamatória, a qual resulta na perda do tecido (Sutra & Poutrel, 1994). A adesão

de *S. aureus* às células epiteliais é considerada como o primeiro e crucial evento no processo de infecção (Almeida et al., 1996).

Um mecanismo confirmadamente empregado por algumas bactérias para evadir-se da imunidade humoral é a sua internalização nas células hospedeiras. Por exemplo, organismos como *Listeria monocytogenes*, *Shigella* sp. e *Mycobacterium tuberculosis* são patógenos intracelulares facultativos que requerem a imunidade mediada por células para serem eliminadas mais eficientemente (Tortora et al., 2000).

Embora *S. aureus* não seja considerado como um patógeno intracelular, muitos estudos *in vitro* mostram a sua internalização e sobrevivência em macrófagos e células alveolares. Sugere-se, assim, que este processo de internalização explique o porquê do sistema imune ser ineficiente e o porquê do tratamento com antibióticos ser, muitas das vezes, falho ao eliminar este patógeno, tão bem adaptado ao ambiente (Almeida et al., 1996; Bayles et al., 1998; Lammers et al., 1999; Dziewanowska et al., 1999; Hébert et al., 2000).

Staphylococcus sp., em especial *Staphylococcus aureus*, produzem uma ampla variedade de fatores de virulência, os quais incluem fatores de superfície (exopolissacarídeos capsulares, peptidoglicano da parede celular, proteína A); enzimas hidrolíticas (nucleases, hialuronidases, proteases, lipases e colagenase); fatores bioquímicos que aumentam sua sobrevivência intracelular (carotenóides, produção de catalase) e resistência natural ou adquirida a antibióticos (β -lactamases e proteínas ligantes a penicilina). Entretanto, alguns dos mediadores principais de injúria patológica são as numerosas toxinas que são produzidas. As toxinas de *S. aureus* podem ser agrupadas pelo modo de ação e incluem citotoxinas, tais como α e β toxinas, as quais são hemolíticas formadoras de poros e toxinas pro-inflamatórias e também a leucocidina. Existem também as toxinas pirogênicas, tais como exotoxinas A e B, que causam hemólise levando à febre; toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), a qual é também uma

exotoxina, sendo mais intimamente relacionada às enterotoxinas (A, B, Cn, D, E, G, H, e I) atuando como superantígenos, causando a proliferação de células T e liberação de citocinas levando, respectivamente, a síndrome do choque tóxico e toxínose (Mims et al., 1998; Lowy, 1998; Cardoso et al., 2000; Dinges et al., 2000).

Proteínas celulares superficiais de *S. aureus* estão mais provavelmente envolvidas na adesão e invasão de células eucarióticas (Baselga et al., 1994). Neste agente patogênico a expressão destas proteínas é fortemente dependente da fase de crescimento. Visto que os fatores de superfície são de importância vital para promover a colonização dos tecidos, conclui-se que estes sejam expressos primeiro, ou seja, durante a fase exponencial, enquanto as exoproteínas são sintetizadas na fase estacionária (Lowy, 1998; Dinges et al., 2000).

Resultados de pesquisas citam o envolvimento de queijo e leite mastítico. Neste último alimento, “toxina formada por estafilococo branco, não produtor de pigmento” havia sido detectada e descrita como o agente tóxico (Bergdoll, 1989).

Aproximadamente cerca de metade das cepas de *S. aureus* é enterotoxigênica (Ewald, 1987; Halpin-Dohnalek & Marth, 1989). Em análises microbiológicas de alimentos, o *S. aureus* coagulase positivo tem sido usado como um organismo indicador. Entretanto, vários pesquisadores já demonstraram que espécies estafilocócicas coagulase negativos são produtores potenciais de toxinas (Bautista et al., 1988; Valle et al., 1990; Vernozy-Rozand et al., 1996; Brabes, 1999).

A caracterização de enterotoxicidade de culturas de *S. aureus* isoladas de leite mastítico, no Brasil, onde os autores buscaram as amostras diretamente do rebanho, foi verificada em alguns trabalhos: Furlanetto et al. (1987), Freitas & Magalhães (1990), Brabes (1999), Leite (2000) e Pádua (2001). Os três

primeiros autores revelaram índices de 8%, 1,1% e 0,5% de positividade para *S. aureus* produtores de SEA, SEA/SEC e SEB, respectivamente, nas amostras analisadas, enquanto Brabes (1999) revelou índices de 30%, 30% e 20% de positividade para aquelas cepas produtoras de SEA/SEC, SEA e SEC, respectivamente. Leite (2000) e Pádua (2001) não observaram produção de toxinas por nenhuma das cepas analisadas, embora o último autor cite que 3,7% dos isolados apresentaram reações inespecíficas.

2.5.1.1 Vacinação contra mastite causada por *Staphylococcus aureus*

Algumas cepas de *Staphylococcus aureus* podem produzir uma camada exopolissacarídica estável (cápsula), a qual está intimamente relacionada com a célula bacteriana, sendo, portanto, mais resistentes à fagocitose do que as não-encapsuladas (não-tipáveis) (Tollersrud et al., 2000). Caracteristicamente, a cápsula não é removida por lavagens sucessivas, sendo mantida através de subculturas *in vitro*, independentemente do meio utilizado e é revelada por coloração negativa (Baselga et al., 1994). Polissacarídeos capsulares tipos 5 e 8, produzidos por cepas de *S. aureus*, têm sido estudados numa tentativa de estabelecer vacinas baseadas em cápsulas para prevenir a mastite bovina por *S. aureus* (Guidry et al., 1997; Tollersrud et al., 2000).

Diversas tentativas de desenvolvimento de vacinas contra *S. aureus* têm sido feitas, em função da importância deste agente. À medida que novos conhecimentos foram gerados e um maior número de fatores de virulência do *S. aureus* foi identificado, novas formulações foram sendo desenvolvidas. Os principais antígenos com capacidade antigênica que podem ser utilizados em vacinas contra *S. aureus* são: proteína A da parede celular, adesinas presentes na parede celular e a pseudocápsula extracelular, composta por polissacarídeos antifagocíticos (Baselga et al., 1993).

Estudos com vacinas compostas por antígenos de proteína A e adesinas demonstram que os animais vacinados são mais capazes de eliminar *S. aureus*, assim como reduzir os sintomas clínicos e a contagem de células somáticas (CCS). No entanto, o polissacarídeo da pseudocápsula extracelular parece ser, atualmente, o antígeno mais promissor quanto ao desenvolvimento de vacinas contra este agente. Desta forma, pode compor uma importante ferramenta no controle da mastite causada por *S. aureus* (Baselga et al., 1994).

Os primeiros estudos de Pankey et al. (1983), porém, não obtiveram sucesso, pois utilizaram bacterinas derivadas do crescimento *in vitro* deste agente, sendo em seguida inativadas. Os resultados obtidos do uso destas vacinas apontavam como vantagens a redução da severidade dos sintomas e apresentavam efeitos positivos no aumento da taxa de cura espontânea, mas não houve redução do número de novas infecções.

Esta mesma vacina foi estudada em trinta vacas da raça Jersey de 1ª lactação da Estação de Pesquisa da Universidade Estadual da Louisiana (Pankey et al., 1985), as quais foram selecionadas para avaliar eficiência da proteína A e de uma vacina comercial (Somato-Staph, Anchor Laboratories, Inc., St. Joseph, MO, USA) contra a mastite causada por *Staphylococcus aureus*. Da mesma forma que o estudo anterior, os resultados apontaram que a vacinação não reduziu o número de infecções intramamárias causadas por *S. aureus*, mas houve um aumento da taxa de cura espontânea, quando comparada com aquela observada para o grupo controle (de 83% proteína A; 73% Lysigin; 47% controle). Por outro lado, a contagem de células somáticas dos quartos infectados por *S. aureus* foi menor entre os animais vacinados do que no grupo controle. Os resultados desse estudo permitem concluir que ainda que a vacinação de vacas de leite não tenha reduzido a incidência de mastite causada por *S. aureus*, pôde-se observar aumento da taxa de cura espontânea deste agente.

Num estudo realizado na Argentina (Giraud et al., 1997), uma vacina baseada em antígenos da pseudocápsula de *S. aureus* foi testada em 30 novilhas durante o período de sete meses. Um grupo de dez novilhas recebeu duas doses da vacina na 8ª e 4ª semanas antes do parto e outro grupo de dez novilhas foi vacinado na 1ª e 5ª semanas após o parto. Os resultados demonstraram que as novilhas vacinadas tiveram redução das novas infecções causadas por *S. aureus* de 18,8% para 6,7%. Para a mastite subclínica, houve diminuição de 8,6% para 3%, com o uso da vacina. Esta mesma vacina também foi testada em 164 vacas em dois rebanhos comerciais na Argentina, durante o período de quatro meses (Calzolari et al., 1997). Duas doses da vacina foram administradas em 82 vacas, com o intervalo de 28 dias. Os resultados do experimento revelaram uma significativa redução das infecções intramamárias causadas por *S. aureus*. O índice de mastite clínica diminuiu de 2,3% para 0,6% entre os animais vacinados e não vacinados, enquanto a mastite subclínica foi reduzida de 10,7% para 6,8%.

Em um estudo realizado na Austrália (Watson & Schwartzkoff, 1990), foi utilizada uma vacina baseada em antígeno da pseudocápsula de *S. aureus*, em 582 vacas distribuídas em cinco fazendas leiteiras comerciais. Os resultados mostraram que a vacinação reduziu os casos de mastite subclínica causada por *S. aureus* em 25% e diminuiu os casos de mastite clínica em 45% a 52% nos rebanhos estudados.

Um ponto importante a ser destacado é que o uso de vacinas contra *S. aureus* tem apresentado bons resultados para o controle de mastite em novilhas. Em experimento realizado nos EUA (Nickerson et al., 1999), uma vacina comercial (Lysigin, Boehringer Ingelheim Animal Health Inc, St. Joseph, MO) foi administrada em novilhas por via intramuscular aos seis meses de idade, seguido por um reforço quatorze dias depois e revacinadas a cada seis meses. O resultados demonstraram que o número de quartos apresentando infecções intramamárias crônicas durante a prenhez foi reduzido em 43,1%, a taxa de

novas infecções intramamárias durante a prenhez foi diminuída em 44,8% e a taxa de novas infecções no período pós-parto foi reduzida em 44,7%.

2.5.2 *Listeria monocytogenes*

Os membros do gênero *Listeria* são definidos como bastonetes curtos (cocoides) regulares, gram-positivos, não esporogênicos, catalase positivos, anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose com produção de ácido láctico sem produção de gás e não produtores de H₂S (Silva et al., 1997; ICMSF, 1998; Almeida et al., 1999).

Crescem em ampla faixa de temperatura (3°C a 45°C), com ótimo entre 30°C a 37°C. Em função da capacidade de multiplicar-se em temperaturas de refrigeração, são considerados criotolerantes e psicotolerantes, e são também osmotolerantes (Baek et al., 2000). São móveis a 20°C-25°C, mostrando movimentos rotatórios característicos ou de tombamento, porém não apresentam motilidade a 35-37°C. Exibem elevada tolerância ao sal e calor, sendo capazes de crescer em temperaturas < 4°C, demonstrando também facilidade de crescimento em substratos com baixo pH e atividade de água (Pereira & Rocourt, 1993).

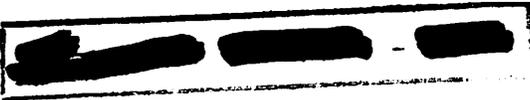
De acordo com Eiroa (1990), até 1979 não tinha sido relatado nenhum surto de listeriose humana veiculada por alimentos, embora a descrição desta bactéria se reporta a mais de 60 anos, quando foi isolada em coelhos e cobaias e descrita como responsável por enfermidades nestes animais (Holt et al., 1994; ICMSF, 1998). Foi primeiramente denominada de *Bacterium monocytogenes* porque infectavam os monócitos do sangue.

Bell & Kyriakides (2000) informam que os índices de listeriose na população humana sempre foram encobertos por outras enfermidades transmitidas pelos alimentos, como salmonelose e campilobacteriose, sendo a confirmação de surtos de listeriose humanas pouco frequentes.

Segundo Silva et al. (1997), o gênero *Listeria* encontra-se atualmente constituído por cinco espécies: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivannovii*, *L. innocua* e *L. welshimeri*. Já o ICMSF (1998) cita seis espécies, sendo a *L. innocua* e *L. murrayi* consideradas patógenas, enquanto que *L. seeligeri*, *L. ivannovii* e *L. welshimeri* rara vez causam infecção humana, e a *L. monocytogenes* é considerada a espécie mais importante. Pereira & Rocourt (1993) demonstraram ser esta bactéria filogeneticamente constituída por dois grupos genomicamente distintos e, atualmente, constitui-se de sete espécies, acrescentando a *L. grayi* como participante do gênero. Os autores esclarecem que, com exceção de *L. grayi* e *L. murrayi*, todas são contaminantes de alimentos; Jay (1992) destaca as espécies mais frequentes como sendo de *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

O manual de Bergey lista oito espécies no gênero *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. murrayi* e *L. denitrificans*. Destas, as espécies *L. grayi* e *L. murrayi* foram reclassificadas no novo gênero *Murraya* (*M. grayi* subsp. *grayi*, *M. grayi* subsp. *murrayi*) e a espécie *L. denitrificans* foi reclassificada no novo gênero *Jonesia* (*J. denitrificans*) (Holt et al., 1994; Silva et al., 1997). Assim, seis espécies podem ser diferenciadas: 1) *L. ivanovii* e *L. monocytogenes* são patogênicas para cobaias, mas somente a *L. monocytogenes* é consistentemente associada com enfermidades humanas; 2) *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. welshimori*, não aparecem até o momento como patogênicas.

A característica ubiqüitária e de resistência fisiológica do microrganismo e a gravidade do processo patológico provocado no homem, aliadas à crescente utilização da cadeia de frio para manutenção de produtos alimentícios prontos para o consumo, explicam o lugar de destaque que *L. monocytogenes* vem ocupando no controle de qualidade da indústria de alimentos e órgãos de saúde.



A listeriose humana acomete principalmente recém-nascidos, gestantes e idosos. Apesar de ser pouco comum em humanos (McClauchlin, 1996), a percentagem de casos fatais é elevada (30%), excedendo, inclusive, a de *Clostridium botulinum*. As manifestações clínicas comumente associadas a tais patogenias são: meningite, septicemia, formas tifóidicas e pulmonares, granulomatose séptica e aborto. Nas bacteremias por *L. monocytogenes* em adultos, o sintoma mais comum é febre, podendo ocorrer fadiga, mal-estar, náusea, vômitos, dores e diarreia (Franco & Landgraf, 1996).

É um agente causador de doenças intracelulares, isto é, se aproveita da maquinaria da célula invadida para se alastrar, agindo como um cavalo de tróia no sistema imunológico, deixando-se capturar pela célula de defesa, o macrófago, o qual o engloba em uma cavidade (fagossomo). Para escapar, a *Listeria* produz a proteína LLO ('listeriolisina O') à sua superfície, que reage com a membrana do vacúolo, conseguindo ultrapassar esta barreira penetrando no citosol, ficando abrigada de qualquer ataque. Mas, já lá dentro, a bactéria tem de encontrar uma maneira de impedir que a LLO continue provocando lesões destruindo a célula, o que é conseguido por uma pequena seqüência de 27 aminoácidos, adicionada à proteína, interrompendo assim a ação desta proteína (Neto, 2000).

Apesar da bactéria *Listeria monocytogenes* ser reconhecida, desde 1925, como um patógeno de importância veterinária e desde 1929 como agente da listeriose humana (Wehr, 1987) só na década passada foi considerada passível de ser veiculada por alimentos. Sobre ela concentram hoje sua atenção a indústria de alimentos e autoridades de saúde de vários países (Uboldi Eiroa, 1990).

Embora infecções intramamárias por *Listeria* sejam raras, a identificação de animais infectados é necessária para a indústria leiteira, visto que leite e derivados contaminados tem sido envolvidos em vários surtos de listeriose (Fleming et al., 1985; Linnan et al., 1988).

O primeiro caso de mastite bovina causada por *L. monocytogenes* ocorrido na Dinamarca foi reportado, em 1973, por Jensen e Larsen. Posteriormente, outros autores isolaram este patógeno. Costa et al. (1986) assinalaram a obtenção de *Listeria* sp. em 0,09% das 2.060 amostras de leite tipo B com mastite subclínica examinadas.

Quando *Listeria monocytogenes* é detectada em várias amostragens sucessivas do tanque de expansão, o exame bacteriológico do leite de cada animal no rebanho deve ser realizado para identificar o animal responsável pela contaminação (Bourry et al., 1997). Os métodos bacteriológicos usados são caros e requerem tempo, além da coleta ser feita assepticamente. Além disso, estes métodos podem ser inapropriados e, assim, alguma infecção intramamária por *Listeria* pode não ser detectada (Sharp, 1989). Uma vez que o nível de excreção de *L. monocytogenes* no leite é variável, a identificação de animais infectados por plaqueamento direto é difícil ou mesmo impossível tornando-se necessário, então, um passo de enriquecimento para o exame bacteriológico.

Prasad et al., citados por Bougle & Stahl (1994), informaram que *L. monocytogenes* é encontrada no leite de vacas devido tanto à contaminação ambiental como a proveniente de mastite bovina. Os mesmos autores afirmam ainda que a pasteurização poderá ser eficiente para eliminar o agente se for bem conduzida; no entanto, esta poderá sobreviver ao tratamento se encontrada no interior dos leucócitos.

Examinando 228 amostras de leite mastítico, Langoni & Fonseca (1997) isolaram *Listeria monocytogenes* em 16 amostras, sendo seis (2,63%) oriundas de mastite subclínica e dez (4,38%) de clínica. Estes autores concluíram, em seu experimento, que o efeito do tempo de refrigeração e criopreservação mostrou-se favorável, aumentando as taxas de isolamento. A maior frequência foi observada nas amostras cultivadas na terceira semana, com isolamento em 1,75% e em 0,88% das amostras mantidas a -20°C e a 4°C .

Steele et al. (1997), analisando amostras de leite cru em tanques de expansão, observaram a presença de *L. monocytogenes* em 2,73% das 1720 amostras estudadas. *Listeria innocua* e *L. welshimeri* foram isoladas por Luisjuan-Morales et al. (1995) em 7 e 2 amostras, respectivamente, de 100 amostras de leite cru coletadas de lojas e de leiteiros na cidade de Guadalajara, México, não identificando nenhuma *L. monocytogenes*.

O Grupo de Estudos da Listeriose da Organização Mundial de Saúde (OMS) admitiu que a *Listeria monocytogenes* pode ser isolada em cerca de 5% das amostras de leite não pasteurizadas (Donini, 1997). Existem relatos de surtos de listeriose na França, decorrentes do consumo de queijo produzido a partir de leite não pasteurizado, causando a morte de 26 pessoas no ano de 1996.

Na Inglaterra, O'Donnell (1995) encontrou 15,43% de amostras de leite cru contaminadas por *Listeria* sp. Destas, 33% foram identificadas como *L. monocytogenes*.

Leal (1999), trabalhando com amostras de leite provenientes de vacas mastíticas, observou que em apenas uma das amostras (0,98%) foi detectada *Listeria monocytogenes*, a qual foi identificada por meio do kit API Listeria.

2.6 Tratamento com antibióticos

Devido à diversidade dos agentes patogênicos e às práticas de manejo que podem estar relacionadas com a mastite, pode-se considerar que o tratamento é bastante complexo. Para seu controle nos animais infectados, diversos antibióticos e quimioterápicos são administrados, geralmente em soluções ou suspensões difundidas diretamente no úbere infectado, por via sistêmica ou com as duas formas combinadas. A ordenha dos animais assim tratados, num período de 72 horas após a última aplicação, revela nitidamente a presença dos antibióticos em uso (Souza & Benedet, 2000).

Destacando a importância da grande maioria dos agentes causadores de mastite, Brady & Katz (1988) concluíram que a taxa de cura com a antibioticoterapia é baixa, o que, associado à necessidade do descarte do leite com resíduos de antibióticos durante o tratamento e o período de carência, torna o tratamento de mastites subclínicas não recomendado, devido à relação custo:benefício desfavorável.

O uso indiscriminado de antibióticos sem a devida prescrição técnica e testes de identificação do patógeno específico pode levar à seleção de cepas resistentes desses microrganismos, tornando a cura da mastite ainda mais difícil, além de representar não somente perigo para a saúde pública, mas também prejuízos para a indústria de derivados lácteos fermentados.

Após o tratamento de mastite (via intra-mamária e/ou sistêmica), a penicilina G procaínica, a penicilina G potássica e a dihidroestreptomicina podem ser encontradas em concentrações suficientes para inibir culturas lácteas e causar perdas econômicas nas indústrias de queijos e leite fermentado (Brady & Katz, 1988).

Para exemplificar esta situação, resíduos de penicilina no leite da ordem de 0,1 a 0,05 UI/mL podem ter efeito inibidor sobre culturas lácteas empregadas na produção de queijo, resultando em deterioração da qualidade final do produto e aumento do tempo de processamento (Packham et al., 2001).

No entanto, o tratamento intramamário é recomendado em casos de mastite clínica, nos quais ocorre alteração do leite ou do úbere do animal, devendo-se começar o tratamento o mais rápido possível para aumentar as chances de sucesso no tratamento. Em rebanhos que apresentam alta prevalência de mastite causada por *Streptococcus agalactiae*, um agente altamente contagioso, o tratamento é frequentemente recomendado, pois este microrganismo é bastante sensível à maioria dos antibióticos (Wilson et al., 1997).

Os resultados do estudo de Adesiyun et al. (1998) apenas confirmaram o conceito existente de que, à medida que há aumento da CCS do rebanho, que significa maior ocorrência de mastite subclínica, maior é a probabilidade de serem encontrados resíduos de antibióticos no leite. Esta probabilidade é cerca de 5 vezes maior nos rebanhos com CCS > 750.000 células/ml que nos rebanhos com baixa CCS, uma vez que em rebanhos com alta CCS umas das medidas utilizadas para a redução da incidência de mastite é justamente o uso de tratamento com antibióticos. Muitas vezes, não são observados os períodos de carência para descarte do leite, o que resulta na presença destes no produto (Fonseca & Santos, 2000).

Pode ocorrer até um aumento temporário dos casos de resíduos de antibióticos no leite, pois alguns produtores com maior CCS irão aumentar o uso de tratamentos com antibióticos para a mastite, buscando reduzir a CCS do rebanho. Entretanto, um ponto importante a ser destacado é que foram fixados limites máximos legais para a CCS no leite, como é o caso da Instrução Normativa nº 51, adotando os parâmetros de qualidade também em relação à ausência de resíduos de antibióticos.

O teste mais usado na rotina laboratorial nos trabalhos de mastite é o da difusão do antimicrobiano (Brito & Brito, 1999). Baseando-se nisto, Raimundo et al. (1999), na Austrália e Lange et al. também no mesmo ano, no Brasil, testaram a susceptibilidade antimicrobiana pelo método de difusão em disco com os seguintes antibióticos: penicilina, eritromicina, oxacilina, streptomina, neomicina, novobiocina, tetraciclina, neomicina, cloranfenicol e kanamicina. Os trabalhos concordam que cepas de *Staphylococcus aureus*, utilizadas em ambos os experimentos, apresentaram resistência à penicilina.

2.7 Caracterização molecular

Até recentemente, a diversidade taxonômica e genômica de microrganismos era avaliada, principalmente, por meio da caracterização fenotípica e/ou genotípica de organismos isolados e cultivados em laboratório. Entretanto, tem sido demonstrado que os organismos cultivados representam apenas uma pequena fração da diversidade de espécies em comunidades microbianas.

Atualmente, métodos moleculares baseados na extração direta de DNA de microrganismos em amostras diversas e posterior amplificação de fragmentos genéticos por PCR (Polymerase Chain Reaction) têm sido amplamente empregados na caracterização de comunidades de microrganismos em amostras ambientais sem a necessidade de isolamento e cultivo prévio (van Leeuwen et al., 1996).

Estas metodologias permitem a caracterização da diversidade taxonômica em amostras complexas, realização de estudos epidemiológicos e caracterização da diversidade genômica de grupos específicos de microrganismos, por exemplo, patógenos clínicos, fitopatógenos, microrganismos associados a biodegradação e, principalmente de organismos não-cultivados presentes em amostras ambientais sob condições extremas de salinidade, temperatura e/ou pH. Nestes estudos, a análise filogenética da seqüência de genes conservados pode ainda elucidar as relações evolutivas entre microrganismos (Harrinson et al., 1992).

2.7.1 Reação da polimerase em cadeia (PCR)

A técnica de amplificação de uma seqüência específica do DNA tem sido usada para detecção e identificação de microrganismos em alimentos. Esse método, referido como reação de polimerase em cadeia ou PCR, é hoje uma tecnologia com inúmeras aplicações em ciências biológicas, tanto em pesquisa

básica como aplicada, tendo proporcionado a seu autor, Kary B. Mullis, no início da década de 1990, o Prêmio Nobel de Medicina (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Por meio de PCR, pode-se, a partir de uma única molécula de DNA, gerar 100 bilhões de moléculas similares em uma tarde (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988). G,S

A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da reação de PCR tornou-a um poderoso instrumento para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

A reação de PCR permite que o DNA de uma região selecionada do genoma seja amplificado um bilhão de vezes, desde que pelo menos parte de sua seqüência nucleotídica seja conhecida. Primeiro, a parte conhecida da seqüência é utilizada para projetar dois oligonucleotídeos de DNA sintéticos (pequenas moléculas de DNA de fita simples), cada um complementar a uma das fitas da dupla-hélice de DNA e posicionado em lados opostos da região a ser amplificada. Esses oligonucleotídeos servem como iniciadores (“primers”) para a síntese de DNA *in vitro*, que é catalizada por uma DNA-polimerase e determinam as extremidades do fragmento de DNA que é finalmente obtido (Alberts et al., 1997).

A DNA-polimerase, enzima responsável pela amplificação do DNA, é capaz de fazer reparos no DNA, assim como, replicá-lo. Esta enzima pode alongar, *in vitro*, um pequeno oligonucleotídeo (“primer”), adicionando nucleotídeos em sua seqüência, desde que este esteja hibridizado a uma fita de DNA complementar, denominada “template” ou molde. Para isso, é necessário um excesso de nucleotídeos na solução, que servem como unidades na montagem da fita complementar à do molde. Desse modo, caso a última base seja T, a enzima coloca um A; se for um C, ela adiciona um G e assim por diante (Saiki et al., 1988).

Os mesmos autores citam que, se existirem dois oligonucleotídeos (“primers”) delimitando uma região do DNA e se as fitas forem separadas pelo calor (95°C), a polimerase realizará cópias complementares às duas fitas, em temperatura inferior, iniciando sempre pela região dos “primers”. Estas novas fitas hibridizam-se, formando uma molécula idêntica à anterior.

Segundo Brown (1994), o processo de amplificação envolve três passos:

- o DNA contendo a seqüência a ser amplificada é desnaturado pelo calor;
- o DNA desnaturado é anelado pelo excesso de oligonucleotídeos;
- a DNA-polimerase é usada para replicar o segmento de DNA, a partir das terminações livres 3'OH dos oligonucleotídeos (“primers”).

A obtenção de uma DNA polimerase termoestável (95°C), extraída de uma bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, denominada de *Taq polimerase* (Saiki et al., 1988) e o desenvolvimento de equipamentos automáticos de PCR têm facilitado a introdução desta técnica nos laboratórios, bem como aumentado suas aplicações (van Belkum et al., 1995), não só pela rapidez, como pela facilidade de realização.

Os produtos obtidos da amplificação são separados por eletroforese em gel de agarose (Giovannoni, 1991). Este processo tem como resultado um padrão de bandas semelhantes a um código de barras. A esse código dá-se o nome de *fingerprints* (impressões digitais) da bactéria, que possibilitam não só caracterizar como diferenciar espécies ou estirpes diferentes, pelo número e tamanho dos fragmentos amplificados (Coutinho et al., 1993; Matthews & Oliver, 1994).

A desvantagem de “primers” com ampla especificidade é a simultânea amplificação de DNA contaminante, o qual aumenta os resultados de falsos-

positivos. A eliminação de falsos-positivos é um pré-requisito para o desenvolvimento de protocolos de PCR para o uso em geral (Carrol et al., 1999).

2.7.2 RAPD (random amplified polymorphic DNA)

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, realizado por Williams e colaboradores. Estes autores descreveram um processo simples, também baseado na amplificação do DNA, mas utilizando um único oligonucleotídeo com seqüência nucleotídica arbitrária. Nesse estudo, foi demonstrado que pequenos oligonucleotídeos (9 a 10 bases) com seqüência nucleotídica arbitrária podiam ser usados para amplificar segmentos de DNA de uma grande variedade de espécies, gerando polimorfismos entre os produtos de amplificação que, por sua vez, poderiam ser utilizados como marcadores genéticos. Neste caso, o polimorfismo era revelado por meio do acesso dos oligonucleotídeos ao DNA genômico. Esta técnica foi então denominada RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso).

O RAPD, portanto, é uma variação do PCR, que consiste na amplificação de seqüências de DNA usando-se “primers” escolhidos sem um prévio conhecimento das bases a serem copiadas. Assim, este método não requer conhecimento prévio da biologia molecular dos organismos a serem estudados e pode, então, ser aplicado a qualquer espécie (Welsh & McClelland, 1990). Segundo os autores, a técnica de RAPD não requer determinado “primer” em particular e pesquisadores de diferentes laboratórios podem escolher uma série padrão de “primers” e os resultados obtidos podem ser comparados entre diferentes laboratórios.

A técnica consiste no anelamento do “primer” com o DNA alvo em ciclos de amplificação à baixa estringência (especificidade), resultando em produtos de amplificação que são característicos de um genoma em particular e denominado “*fingerprinting*” (Welsh & McClelland, 1990; Williams et al.,

1990). Esta técnica evita muitos problemas encontrados por outras técnicas moleculares, porque é uma técnica rápida e simples de ser executada. Sua alta capacidade discriminatória é útil para estudos epidemiológicos, investigação de fontes de contaminação, relacionamento de isolados de origens diferentes e identificação de isolados diferentes de uma mesma origem, sendo amplamente utilizada (van Belkum et al., 1995; Giesendorf et al., 1996)

Porém, um alto nível de padronização e controle interno são necessários para se obter perfis reprodutíveis de DNA. Há muitos parâmetros nos quais pequenas mudanças alteram os perfis (Silva, 1998). Apesar da simplicidade do conceito da técnica, estes parâmetros devem estar dentro de limites ótimos para reprodutibilidade; isto é, concentrações adequadas de DNA, magnésio, “primer” e enzima, assim como o número de ciclos (Tyler et al., 1997).

Aumentando-se a seqüência e o tamanho dos “primers” usados para RAPD, pode-se obter um número ilimitado de comparações possíveis entre os perfis, aumentando assim seu poder discriminatório (Wang et al., 1993).

Vários autores citaram o RAPD como o ideal no estudo do polimorfismo genômico (Welsh & McClelland, 1990; William et al., 1990). Os perfis dos produtos obtidos na amplificação (amplicons), após separação eletroforética, podem ser usados como *fingerprints* de linhagens de vários microrganismos, tanto procariontes como eucariontes (Cancilla et al., 1992; Mazurier et al., 1992; Myers et al., 1993), permitindo discriminação entre elas (Lawrence et al., 1993). Dessa forma, o método tem sido usado para comparar diferenças intra e interespecíficas em bactérias (Welsh & McClelland, 1990), podendo ser usado tanto em DNA purificado, como em extratos de células cultivadas em caldo ou em ágar.

Embora seja recente e apresente algumas limitações, tais como o baixo conteúdo de informações genéticas por loco, a não discriminação de genótipos heterozigotos dos homozigotos e a baixa reprodutibilidade entre laboratórios, a

técnica de RAPD tem sido aplicada, com resultados satisfatórios, para vários microrganismos (Mazurier et al., 1992; Kapur et al., 1995; Daly et al., 1999; Kim et al., 2001).

A biotecnologia industrial freqüentemente necessita identificar uma linhagem em particular e discriminá-la das outras. As linhagens utilizadas em processos de produção são, muitas vezes, protegidas por patentes. Para identificar uma linhagem em particular tem-se um problema de caracterização e a técnica de RAPD fornece um *fingerprinting* da linhagem de interesse (van Belkum et al., 1995; van Leeuwen et al., 1996; Tyler et al., 1997).

A geração de *fingerprintings* de DNA por análises RAPD baseadas em PCR é um método rápido e de grande sensibilidade para o “encaço” epidemiológico e identificação de bactérias implicadas em surtos de toxinfecções alimentares (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

2.7.3 Análise de DNA

O seqüenciamento do genoma inteiro de uma bactéria é uma prática difícil, mesmo pelas modernas técnicas de análise de DNA atualmente disponíveis. O que normalmente se utiliza é a comparação dos genomas bacterianos entre si, em que o DNA de uma bactéria desconhecida é disposto de maneira que o DNA da bactéria de referência possa ser pareado e a homologia dos DNAs calculada. Porém, os resultados obtidos nem sempre permitem afirmar a distinção entre algumas espécies.

Segundo van Leeuwen et al. (1996), uma série de técnicas de biologia molecular vem sendo descrita na literatura, no sentido de melhor elucidar as investigações epidemiológicas. Essas técnicas moleculares conduzem a uma maior rapidez e confiabilidade nos resultados, permitindo uma detecção fácil e segura do microrganismo sob investigação. Infelizmente, todos os procedimentos aplicados até aqui apresentam algumas desvantagens

experimentais específicas. Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE - Eletroforese de isoenzimas) assegura um alto grau de tipagem, mas é tecnicamente muito exigente e possui poder discriminatório limitado em epidemiologia clínica (Musser & Kapur, 1992). Kapur et al., no ano de 1995, investigando a heterogeneidade genética de isolados de *S. aureus* recuperados de vacas mastíticas com o emprego de MLEE, concluíram que a população deste agente pode ser multiclonal. A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) tem provado ser altamente discriminatório, sugerindo ser superior a outras técnicas de tipagem. Entretanto, este método é trabalhoso e os padrões de restrições de DNA podem ser difíceis de interpretar (Tenover et al., 1995). Além disso, a padronização interlaboratorial de PFGE é ainda problemática (Cookson et al., 1996).

Por ser o *Staphylococcus aureus* um patógeno economicamente importante e um dos maiores responsáveis pela mastite, este tem sido objeto de várias pesquisas de genotipagem. Entretanto, substâncias presentes no leite mastítico inibem a reação pela *Taq Polimerase*, tornando-a de uso limitado para a detecção de *S. aureus* em mastite. Kim et al. (2001), empregando *Thermus thermophilus* (*Tth*) DNA polimerase em substituição à *Taq Polimerase*, aumentaram a sensibilidade de detecção deste agente em leite de vacas experimentalmente infectadas, de 65% a 80% e, quando combinando o uso de *Tth Polimerase* com um extrato de DNA purificado, a sensibilidade aumentou para 100%.

Células bacterianas, particularmente estafilococos produtores de termonuclease e a própria enzima termonuclease inibem a reação de amplificação, bem como altas quantidades de RNA nas amostras (Wilson et al., 1994).

Durante o ano de 1993, foram descritas por Kreiswirth et al. sondas genéticas para o estudo epidemiológico de *S. aureus*. Mas, estes sistemas de

tipagem baseados em sondas são trabalhosos, visto que envolvem *Southern blotting*, marcadores, autoradiografia e interpretação de algumas bandas complexas de DNA.

A técnica de *fingerprint* de DNA, denominada RAPD (random amplified polymorphic DNA, ou DNA polimórfico amplificado ao acaso), uma variante da metodologia tradicional de PCR, tem sido empregada por diversos autores para a genotipagem de microrganismos, incluindo aqueles responsáveis pela incidência de mastite. Entre as técnicas de tipagem molecular, a ribotipagem é freqüentemente utilizada. Nela, os padrões produzidos após digestão e absorção de genes ribossomais são analisados. Esta técnica foi aplicada em estudos de 11 surtos de mastites ocorridos na Irlanda, juntamente com DAF (DNA amplification fingerprinting) por Daly et al. (1999). Estes autores concluíram que as linhagens produziram vários padrões de *fingerprintings*, identificando um número de polimorfismos de baixo peso molecular que permaneceram identificáveis por métodos convencionais.

3 Referências Bibliográficas

AARESTRUP, F. M.; ANDERSEN, J. K.; JENSEN, N. E. Lack of staphylococcal enterotoxin production among strains of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Denmark. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vanlose, v. 36, n. 2, p. 273-275, 1995.

ADESIYUN, A. A.; WEBB, L. A.; ROMAIN, H. T. Occurrence of clinical mastitis and antimicrobial residues on dairy farms in Trinidad. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, Trinidad, v. 18, n. 2, p. 83-88, 1998.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294 p.

ALMEIDA, M. T. G.; SILVA, R. M.; DONAIRE, L. M.; MOREIRA, L. E.; MARTINEZ, M. B. Enteropatógenos associados com diarreia aguda em crianças. *Jornal de Pediatria*, v. 74, p. 291-298, 1998.

ALMEIDA, P. F. de; ALMEIDA, R. C. de C.; RODRICK, G. G. *Listeria monocytogenes*: importância e discriminação nos alimentos. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 19-23, abr./maio 1999.

ALMEIDA, R. A.; MATTHEWS, E. C.; GUIDRY, A. J.; OLIVER, S. P. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 79, n. 6, p. 1021-1026, June 1996.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: Marvin L. Speck Editor, 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. *Staphylococcus aureus* in foods. In: HELRICH, K. (Ed.). *Official Methods of Analysis of the Association of Official analytical Chemists*. 15. ed. Arlington, 1990.

AULDIST, M. J.; COATS, S.; ROGERS, G. L.; MCDOWELL, G. H. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. *Australian Journal Experimental Agriculture*, Collingwood, v. 35, n. 4, p. 427-436. 1995.

AULDIST, M. J.; HUBBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 53, n. 1, p. 28-36, Apr. 1998.

BAEK, S. Y.; LIM, S. Y.; LEE, D. H.; MIN, K. H.; KIM, C. M. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* from domestic and imported foods in Korea. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 63, n. 2, p. 186-189, Feb. 2000.

BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J. G. M.; BEIBOER, M. L.; WILMINK, H. BENEDICTUS, G.; BRAND, A. Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 2, p. 411-419, Feb. 1998.

BASELGA, R.; ALBIZU, I.; AMORENA, B. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.39, n. 3/4, p. 195-201, Apr. 1994.

BASELGA, R.; ALBIZU, I.; DE LA CRUZ, M.; DEL CACHO, E.; BARBERAN, M.; AMORENA, B. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, n. 11, p. 4857-4862, Nov. 1993.

BAUTISTA, L. PILAR, G.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 2, p. 566-569, Feb. 1988.

BAYLES, K. W.; WESSON, C. A.; LIOU, L. E.; FOX, L. K.; BOHACH, G. A.; TRUMBLE, W. R. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, n. 1, p. 336-342, Jan. 1998.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. *Listeria*: una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Zaragoza, Espanha: Acribia, 2000. 173 p.

BENNETT, R. W.; LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: **Bacteriological analytical manual**. 8. ed. Gaithersburg. 1995. p. 12. 01-12. 05.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. (Ed). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: INC, 1989. p. 463-523.

BLOOD, D. C.; RADOSTIS, O. M. **Clínica veterinária**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 15, p. 424-463.

BOOTH, J. M. Progress in the control of mastitis. In: INTERNATIONAL MASTITIS SEMINAR, 3., 1995, Tel Aviv. **Proceedings...** Tel Aviv: International Dairy Federation, 1995. p. 3-11.

BORGES, S. F.; OLIVEIRA, J. S. O nosso leite de cada dia. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 155, p. 3-5, 1988.

BOUGLE, D. L.; STHAL, V. Survival of *Listeria monocytogenes* after irradiation treatment of camembert cheeses made from raw milk. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 57, n. 9, p. 811-813, Sept. 1994.

BOURRY, A.; COCHARD, T.; POUTREL, B. Serological diagnosis of bovine, caprine, and ovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* by using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, v. 6, p. 1606-1608, June 1997.

BRABES, K. C. S. **Deteção de *Staphylococcus* sp. e suas enterotoxinas em leite proveniente de bovinos leiteiros com mastite**. 1999. 77 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRADY, M. S.; KATZ, S. E. Antibiotic/antimicrobial residues in milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 51, n. 1, p. 8-11, Jan. 1988.

BRAMLEY, A. J. The control of coliform mastitis. In: ANNUAL MEETING NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 24., 1985, Las Vegas, Nevada. **Proceedings...** Las Vegas, Nevada, 1985. p. 4-17.

BRAMLEY, A. J. *Streptococcus uberis* udder infection – a major barrier to reducing mastitis incidence. **British Veterinary Journal**, London, v. 140, n. 4, p. 328, 1984.

BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J.; FOX, L. K.; HARMON, R. J.; HOGAN, J. S. S.; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P.; SMITH, K. L.; SORDILLO, L. M. **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison: National Mastitis Council, 1996. 64 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1. p. 13-22.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC ANVISA/MS n.º 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 10 jan 2001. Seção I.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Mastite bovina de A a Z. In: BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. **Sanidade do Gado Leiteiro**, Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL/TORTUGA, 1995. p. 7-14.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. **Diagnóstico microbiológico da mastite**. Juiz de Fora: EMBRAPA, 1999. 26 p. (EMBRAPA. Circular Técnica, 55,)

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M.; VARGAS, O. L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 39-44, jan./mar.1998.

BRITO, R. F. B.; CALDEIRA, G. A. F.; VERNEQUE, R. S.; BRITO, M. A. V. B. Sensibilidade e especificidade do 'California Mastitis Test' como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação a contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 49-53, abr./jun. 1997.

BROWN, T. A. **DNA sequencing. The basics**. Oxford: IRL Press, 1994. 101p.

BUSHNELL, R. B. Mycoplasma mastitis. **Veterin Clinical North America, Large**, v. 6, n. 2, p. 301-312, 1984.

CALZOLARI, A.; GIRAUDO, J. A.; HORACIO, R.; ODIERNO, L.; GIRAUDO, A. T.; FRIGERIO, C.; BETTERA, S.; RASPANTI, C.; HERNANDEZ, J.; WEHBE, M.; MATTEA, M.; FERRARI, M.; LARRIESTRA, A.; NAGEL, R. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 5, p. 854-858, May 1997.

CANCILLA, M. R.; POWELL, I. B.; HILLIER, A. J.; DAVIDSON, B. E. Rapid genomic fingerprint of *Lactococcus lactis* strains by arbitrary primed polymerase chain reaction with 32p and fluorescent labels. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 5, p. 1772- 1775, May 1992.

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

CARROL, N. M.; ADAMSON, P.; OKHRAVI, N. Elimination of bacterial DNA from Taq DNA polymerases by restriction endonuclease digestion. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 10, p. 3402-3404, Oct. 1999.

CHANG, T. C.; HUANG, S. H. Evaluation of coagulase activity and protein A production for the identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 8, p. 858-862, Aug. 1995.

CHEN, J. H.; HOTCHKES, J. H. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Clostridium sporogenes* in cottage cheese in modified atmosphere packaging. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 6, p. 972-977, June 1993.

COOKSON, B. D.; APARICIO, P.; DEPLANO, A.; STRUELENS, M.; GOERING, R.; MARPLES, R. Inter-centre comparison of pulsed-field gel electrophoresis for the typing of methicilin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 44, n. 3, p. 179-184, Mar. 1996.

CORREA, M. G. P.; CORRÊA, I.; MARTIN, J. M.; LEMOS, A. M. Análise de linhagens de *Escherichia coli* isoladas do "leite bovino mastítico". **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v. 54, n. 316, p. 41-46, set./out. 2000.

COSTA, E. O. Prevenção da mastite. Importância do uso de cânula curta em tratamentos intramamários. **Veterinary News**, ano VI, n. 44, 2000.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; PARDO, R. B.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Estudo epidemiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 156-158, jul./ago. 1995a.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; CARCIOFI, A. C.; MELVILLE, P. A.; PRADA, M. S.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. Survey on the etiology of intramammary infections in dairy cattle. **Congresso Mundial de Buiatria**, Bolonha, v. 18, p. 853-855, 1994a.

COSTA, E. O.; CARCIOFI, A. C.; SCHALCH, U.; MELVILLE, P. A.; PRADA, M. A.; CORREA, B.; GAMBALE, W.; GANDRA, C. *Prototheca* sp outbreak of bovine mastitis. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 13., 1992, Santiago. **Anais....** Santiago, 1992.

COSTA, E. O.; COUTINHO, S. D. A.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C. M. Etiologia bacteriana da mastite bovina no Estado de São Paulo. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 107-112, abr./jun. 1986.

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R. et al. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 5, p. 215-217, set./out. 1995b.

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; PRADO, R. B.; WHITE, C. R. Métodos para diagnóstico microbiológico de mastite clínica bovina. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 49, n. 2, p. 159-167, mar./abr. 1997.

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Relato de um caso de consumo de queijo fresco contaminado com *Prototheca* sp. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, ano I, n. 1, p. 9-10, 1998.

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; VIANI, F. C.; MASCOLLI, R.; OLIVEIRA, P. J. Mastite bovina: CMT X microbiológico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1993, Santos. **Anais...** Santos, 1993. v. 17, p. 165-170.

COSTA, E. O.; PARDO, R. B.; VIANI, F. C.; WATANABE, E. T.; VENZON, P. Estimativas de prejuízos devido à mastite subclínica em propriedades leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1994, Olinda. **Anais...** Olinda, 1994b. v. 23, p. 268-275.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; PRADO, R. B.; GARINO, F.; SILVA, J. A. B. Estudo da ecologia dos microrganismos contribuindo para o controle da mastite por agentes ambientais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1994, Olinda. **Anais...** Olinda, 1994c. v. 23, p. 233-239.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; SILVA, L. A. B.; GARINO Jr, F.; BENITES, N. R.; HORIUTI, A. M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, ano II, n. 2, mar./abr. 1999.

COSTA, O. C.; CARVALHO, V. M.; COUTINHO, S. D. A. et al. *Corynebacterium bovis* e sua importância na etiologia da mastite bovina no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 4, p. 117-120, out./dez. 1985.

COUTINHO, H. L. C.; HANDLEY, B. A.; KAY, H. E.; STEVENSON, L.; BERINGER, J. E. The effect of colony age on PCR fingerprinting. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 282-284, Dec. 1993.

CULLOR, J. S. The control, treatment, and prevention of the various types of bovine mastitis. **Veterinary Medicine**, Lexexa, v. 88, n. 6, p. 571-579, June 1993.

DALY, M.; POWER, E.; BJORKROTH, J.; SHEEHAN, P.; O'CONNELL, A.; COLGAN, M.; KORKEALA, H.; FANNING, S. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiological investigation of mastitis outbreaks in Irish dairy herds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2723-2729, June 1999.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 1, p. 16-34, Jan. 2000.

DONINI, C. A. A contribuição ao estudo epidemiológico da listeriose como zoonose de causa alimentar. **Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 11, n. 48, p. 54, jul./ago. 1997.

DUNCAN, S. E.; HACKNEY, C. R. Relevance of *Escherichia coli* O157:H7 to the dairy industry. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Iowa, v. 14, n. 11, p. 656-660, Nov. 1994.

DZIEWANOWSKA, K.; PATTI, J. M.; DEOBALD, C. F.; BAYLES, K. W.; TRUMBLE, W. R.; BOHACH, G. A. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, n. 9, p. 4673-4678, Sept. 1999.

EIROA, M. N. U. *Listeria monocytogenes* – características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos. **Coletânea ITAL**, Campinas-SP, v. 20, n. 1, p. 101-102, jan./jun. 1990.

ERB, H. N.; SMITH, R. D.; HILLMAN, R. B.; POWERS, P. A.; SMITH, M. C.; PEARSON, E. G. Rates of diagnosis of six diseases of Holstein cows during 15-day, 21-day and 30-day interval. **American Journal Veterinary Research**, Shaumburg, v. 45, n. 2, p. 333-335, 1984.

ERSKINE, R. J.; EBERHART, R. J.; HUTCHINSON, L. J.; CAMPBELL, M. A. Incidence and types of clinical mastitis in dairy herds with high and low somatic cell counts. **Journal American Veterinary Medicine Association**, Shaumburg, v. 192, n. 6, p. 761-765, Mar. 1988.

EWALD, S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from danish foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 207-214, June 1987.

FARIA, J. E.; PINTO, S. M.; DALE, R.; ZAMPERLINI, B. Influência da vacinação sobre o nível de infecção estafilocócica da glândula mamária de vacas leiteiras submetidas a desafios naturais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2, p. 104-108, mar./abr. 2000.

FARNSWORTH, R. J. Microbiologic examinations of bulk tank milk. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 469-474, 1993.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa, 1996. 220 p.

FERREIRO, L.; SANTOS, E. C. dos; SILVA, N. da. Ocorrência e etiologia da mastite bovina na 'zona da mata' do estado de Minas Gerais. **Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v. 33, n. 1, p. 31-37, abr. 1981.

FILIPPSEN, L. F.; MOREIRA, F. B.; SAKASHITA, A. T.; ZAFALON, L. F.; BRITO, J. R. F. Prevalência da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no Norte do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24., 1996, Goiânia. *Anais...* Goiânia, GO, 1996.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, New York, v. 61, n. 2, p. 136-169, June 1997.

FLEMING, D. W.; COCHI, S. L.; MACDONALD, K. L.; BRONDUM, J. .; HAYES, P. S.; PLIKAYTIS, B. D.; HOLMES, M. B.; AUDURIER, A.; BROOME, C. V.; REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine*, Boston, v. 312, n. 7, p. 404 - 407, 1985.

FONSECA, L. F. L. **Estudo da prevalência da mastite bovina e sua relação com práticas de manejo, higiene e terapia em fazendas produtoras de leite tipo B no Estado de São Paulo.** 1992. 148 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

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

FOX, L. K.; BESSER, T. E.; JACKSON, S. M. Evaluation of a coagulase-negative variant of *Staphylococcus aureus* as a cause of intramammary infections in a herd of dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Chicago, v. 209, n. 6, p. 1143-1146, Sept. 1996.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus*, isolados de vacas com mastite. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 315-319, out./dez. 1990.

FURLANNETO, S. M. P.; NADER FILHO, A.; WILSON, D. et al. *Staphylococcus aureus* enterotoxigêncios isolados a partir de leite de vacas mastíticas. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 138-143, abr./jun. 1987.

GAY, J. M.; FOX, L. K. *Staphylococcus aureus* detection: does the STAPH-AB test fit? Disponível em: <http://www.edu.biotech/workshop/activity/act16/annexd3.htm> Acessado em: Jan. 2001.

GIESENDORF, B. A. J.; QUINT, W. G. V.; VANDAMME, P.; van BELKUM, A. Generation of DNA probes for detection of microorganisms by polymerase chain reaction fingerprinting. *Zentralblatt für Bakteriologie*, Stuttgart, v. 283, n. 4, p. 417-430, apr. 1996.

GIOVANNONI, S. The polymerase chain reaction. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Willey & Sons, 1991. p. 177-203.

GIRAUDO, J. A.; CALZOLARI, A.; RAMPONE, H.; RAMPONE, A.; GIRAUDO, A. T.; BOGNI, C.; LARRIESTRA, A.; NAGEL, R. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 80, n. 5, p. 845-853, May 1997.

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

GUIDRY, A. J.; FATTOM, A.; PATEL, A.; O'BRIEN, C. Prevalence of capsular serotypes among *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis in the United States. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 53-58, Dec. 1997.

HALPIN-DOHNALEK, M.; MARTH, E. H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods – a review. *Journal of Food Protection*, Iowa, v. 52, n. 3, p. 267-282, Mar. 1989.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, July 1994.

HARRISON, S. P.; MYTTON, L. R.; SKOT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random oligonucleotides. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 38, n. 10, p. 1009-1015, Oct. 1992.

HARROP, M. H. V.; PAREIRA, L. J. G.; BRITO, J. R. F. et al. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da zona do agreste meridional de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira Serie Veterinária**, Brasília, v. 10, p. 65-67, 1975.

HÉBERT, A.; SAYASITH, K.; SÉNÉCHAL, S.; DUBREUIL, P.; LAGACÉ, J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 193, n. 1, p. 57-62, Dec. 2000.

HERMAN, L. M. F.; De BLOCK, J. H. G. E.; MOERMANS, R. J. B. Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 mililiters of raw milk by a two-step PCR with nested primers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 2, p. 817-819, Feb. 1995.

HILLERTON, J. E.; BRAMLEY, A. J.; STAKER, R. T.; MCKINNON, C. H. Patterns of intramammary infection and clinical mastitis over a 5 year period in a closely monitored herd applying mastitis measures. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 62, n. 1, p. 39-50, Feb. 1995.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, O. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wikins, 1994. 787 p.

INTERNATIONAL COMMISSION MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS – ICMSF. **Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos**. Zaragoza, Espanha: Acribia, 1998. 606 p.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 5. ed. ITP, 1992. 661 p.

JENSEN, J.; LARSEN, H. H. *Listeria monocytogenes* as the aetiological agent of three cases of mastitis in cows. **Nordisk Veterinaer Medicin**, Copenhagen, v. 25, n. 6, p. 322-329, 1973.

KAPUR, V.; SISCHO, W. M.; GREER, R. S.; WHITTAN, T. S.; MUSSER, J. M. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 2, p. 376-380, Feb. 1995.

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

KITCHEN, B. J. Review of the progress of Dairy Science: Bovine mastitis milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 48, n. 1, p. 167-188, Feb. 1981.

KLEI, L.; YUN, J.; SAPRU, A.; LYNCH, J.; BARBANO, D.; SEARS, P.; GALTON, D. Effects of milk somatic cell count on Cottage cheese yield and quality. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, n. 5, p. 1205-1213, May 1998.

KLOSS, W. E.; SCHLEIFER, K. H.; GOTZ, F. The genus *Staphylococcus*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. L. (Ed.). **The Prokariotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications**. New York: Springer-Verlag, 1992. v. 2, p. 1369-1420.

KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P.; EEROLA, E. Application of gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acids for species identification and typhi of coagulase-negative Staphylococci. **Journal of Chemical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 2, p. 315-322, Feb. 1991.

KREISWIRTH, B.; KORNBLUM, J.; ARBEIT, R. D.; EISNER, W.; MASLOW, J. N.; McGEER, A.; LOW, D. E.; NOVICK, R. P. Evidence for a clonal origin of methicilin-resistance in *Staphylococcus aureus*. **Science**, London, v. 259, n. 5092, p. 227-230, Jan. 1993.

LACERDA Jr., P. M. G.; ZANI NETO, L.; FREITAS, D. C. Estudos sobre as mastites bovinas. I. Contribuição ao estudo dos agentes etiológicos das mastites bovinas. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 5, p. 55-64, 1954.

LAMMERS, A.; NUIJTEN, P. J. M.; SMITH, H. E. The fibronectin binding proteins of *Staphylococcus aureus* are required for adhesion to and invasion of bovine mammary gland cells. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, n. 180, n. 1, p. 103-109, Nov. 1999.

- LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 127-141, June 1999.
- LANGENEGGER, J.; COELHO, N. M. C.; LANGENEGGER, C. H. et al. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 5, p. 437-440, 1970.
- LANGLOIS, B. E.; PARLINDUNGAN, A. K.; HARMON, R. J.; AKERS, K. Biochemical characteristics of *Staphylococcus* species of human and bovine origin. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 53, n. 2, p. 119-126, Feb. 1990.
- LANGONI, H.; FONSECA, T. H. P. Participação da *Listeria monocytogenes* na mastite bovina. Importância para a saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 50, p. 36-38, jul/ago. 1997.
- LANGONI, H.; PINTO, M. P.; DOMINGUES, P. F. et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 43, n. 6, p. 507-515, dez. 1991.
- LAWRENCE, L. M.; HARVEY, J.; GILMOUR, A. Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 9, p. 3117-3119, Sept. 1993.
- LE ROUX, Y.; COLIN, O.; LAURENT, F. Proteolysis in samples of quarter milk with varying somatic cell counts. 1. Comparison of some indicators of endogenous proteolysis in milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 78, n. 6, p. 1289-1297, June 1995.
- LEAL, D. D. M. **Caracterização e identificação de *Listeria monocytogenes* e bactérias gram negativas em mastite clínica e subclínica**. 1999. 47 p. pDissertação (Mestrado em Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- LEITE, R. L. **Avaliação da qualidade microbiológica de queijo “Minas Frescal” e “Minas Padrão” elaborados com leite proveniente de vacas com mastite subclínica**. 2000. 68 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia de Alimentos) – Universidade federal de Lavras, Lavras, MG.

- LINNAN, M. J.; MOSCOLA, L. J.; GOULET, V.; MAY, S.; KLERK, S.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis associated with mexican-style cheese. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 319, n. 13, p. 823-828, Sept. 1988.
- LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **England Journal of Medicine**, Boston, v. 339, n. 8, p. 520-532, Aug. 1998.
- LUISJUAN-MORALES, A. L.; ALANIZ-DE-LA, R. O.; VÁSQUEZ-SANDOVAL, M. E. ROSAS-BARBOSA, B. T. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Guadalajara, México. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 58, n. 10, p. 1139-1141, Oct. 1995.
- MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D. M.; GALTON, D. M.; RUDAM, M.; BOOR, K. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, n. 1, p. 1-11, Jan. 2000.
- MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. A. R.; SILVA, L. F. P. Fatores que afetam a composição do leite. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, n. 17, p. 32-35, set./out. 1998.
- MATIOLI, G. P. **Influência do leite proveniente de vacas mastíticas no rendimento de queijo minas frescal**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MATOS, J. E. S. Mamites: alguns aspectos ligados ao seu diagnóstico e controlo. **Veterinária Técnica**, Lisboa, v. 14, n. 3, p. 32-42, jun. 1994.
- MATSUNAGA, T.; KAMATA, S.; KIKIICHI, N. et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **Journal of Medicine Science**, Tokyo, v. 55, n. 2, p. 297-300, Apr. 1993.
- MATTHEWS, K. R.; OLIVER, S. P. Differentiation of *Staphylococcus* species by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 57, n. 6, p. 486-489, June 1994.
- MATTHEWS, K. R.; ROBERSON, J.; GILLESPIE, B. E.; LUTHER, D. A.; OLIVER, P. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n. 6, p. 686-688, June 1997.

MAZURIER, S.; VAN DE GIESSEN, A.; HEUVELMAN, K.; WERNARS, K. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates : DNA fingerprint without the need to purify DNA. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 260-262, June 1992.

MCLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, Oxford, v. 7, n. 4/5, p. 187-193, Aug./Oct. 1996.

MILLER, R. H.; EMANUELSSON, U.; PERSSON, E.; BROLUND, L.; PHILIPSSON, J.; FUNKE, J. Relationships of milk somatic cell counts to daily milk yield and composition. **Acta Agriculture Scandinavica**, Stockholm, v. 33, p. 209-223. 1983.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Medical microbiology**. 2. ed. London: Mosby International, 1998.

MITCHELL, G. E.; ROGERS, S. A.; HOULIHAN, D. B.; TUCKER, V. C.; KITCHEN, B. J. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk. 2. Composition of farm bulk milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 41, n. 1, p. 9-12, Mar. 1986.

MORETTI, A.; PASQUALI, P.; MENCARONI, G.; BONCIO, L.; PIERGILI FIORETTI, D. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria). **Journal of Veterinary Medicine**, Series B, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 129-132, Apr. 1998.

MUNRO, L. G.; GRIEVE, P. A.; KITCHEN, B. J. Effects of mastitis yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 39, n. 1, p. 7-16, Mar. 1984.

MUSSER, J. M.; KAPUR, V. Clonal analysis of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 8, p. 2058-2063, Aug. 1992.

MYERS, L. E.; SILVA, S. V. P. S.; PROCUNIER, J. D.; LITTLE, P. B. Genomic fingerprinting of "*Haemophilus somnus*" isolates by using a random-amplified polymorphic DNA assay. **Journal of Clinical Bacteriology**, Washington, v. 31, n. 3, p. 512-517, Mar. 1993.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison, 1996. 64 p.

NATZKE, R. P. Elements of mastitis control. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, n. 6, p. 1431-1442, June 1981.

NETO, R. D. Bactéria do leite engana sistema de defesa. **Folha de São Paulo – São Paulo**, 06/11/2000. p. A14.

NICKERSON, S. C.; OWENS, W. E.; BODDIE, R. L. Mastitis in heifers: prevalence and control of mastitis in breeding age heifers. **Agri-Practice**, Santa Barbara, v. 15, n. 5, p. 14-18, May 1994.

NICKERSON, S. C.; OWENS, W. E.; TOMITA, G. M.; WIDEL, P. W. Vaccinating dairy heifers with a *Staphylococcus aureus* bacterin reduces mastitis at calving. **Large Animal Practice**, Irvine, v. 20, n. 3, p. 16-28, May/June 1999

NOCARD & MOLLEREAU, 1974. In: GIESECKE, W. H.; VAN DEN HEEVER, L. V. The diagnosis of bovine mastitis with particular reference to subclinical mastitis: a critical review of relevant literature. **Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 41, n. 8, p. 169-212, Aug. 1984.

NOUT, M. J. R. Fermented foods and food safety. **Food Research International**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 291-298, 1994.

O'DONNELL, E. T. The incidence of *Salmonella* and *Listeria* in raw milk from farm bulk tanks in England and Wales. **Journal of the Society of Dairy Technology**, London, v. 48, n. 1, p. 25-29, Feb. 1995.

OLIVEIRA, C. A. F.; LARANJA, L. F. F.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 62, p. 10-16, jun. 1999.

OLIVER, S. P.; LEWIS, M. J.; GILLESPIE, B. E.; IVEY, S. J.; COLEMAN, L. H.; ALMEIDA, R. A.; FANG, W.; LAMAR, K. Evaluation of a postmilking teat disinfectant containing a phenolic combination for the prevention of mastitis in lactating dairy cows. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 62, n. 11, p. 1354-1357, Nov. 1999.

OWENS, W. E.; RAY, C. H.; WATTS, J. L.; YANCEY, R. J. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 2, p. 313-317, Feb. 1997.

PACKHAM, W.; BROOME, M. C.; LIMSOWTIN, G. K. Y.; ROGINSKI, H. Limitations of standard antibiotic screening assays when applied to milk for cheesemaking. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 56, n. 1, p. 15-18, Apr. 2001.

PÁDUA, I. P. M. **Avaliação da presença de estafilococos enterotoxigênicos em leite mastítico através de métodos convencionais e análise da composição de ácidos graxos celulares por cromatografia gasosa**. 2001. 60 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PANKEY, J. W.; BODDIE, N. T.; WATTS, J. L.; NICKERSON, S. C. Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 68, n. 3, p. 726-731, Mar. 1985

PANKEY, J. W.; DUIRS, G.; MURRAY, G.; TWOMEY, A. **Evaluation of commercial bacterin against *Staphylococcus aureus* mastitis in New Zeland**. Louisiana: Agricultural Experimental Station, 1983. p. 157-161. (Dairy Research Report)

PEREIRA, M. L.; PEREIRA, J. L.; SERRANO, A. M.; BERGDOLL, M. S. Enterotoxinas estafilocócicas: importância e métodos analíticos de detecção. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 24-34, set. 1999.

PEREIRA, M. L.; PEREIRA, J. L.; SERRANO, A. M.; BERGDOLL, M. S. Estafilococos: até onde sua importância em alimentos? **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 68/69, p. 32-41, jan./fev. 2000.

PEREIRA, M. L.; ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes*: uma revisão sobre aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 7, n. 26, p. 5-12, jun. 1993.

PHILPOT, N. W. Programa de qualidade do leite no mundo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR, 1998. p. 1-6.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Mastitis counter attack**. Naperville: Babson Bros, 1991. 150 p.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. Mastitis. In: QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. (Ed.) **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe Publishing, 1994. p. 327-344.

RADOSTIDIS, O. M.; LESLIE, K. E.; FETROW, J. Herd health. **Food animal production medicine**. 2. ed. Sandres: Philadelphia, 1994. p. 229-276.

RAIMUNDO, O.; DEIGHTON, M.; CAPSTICK, J.; GERRATY, N. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 66, n. 4, p. 275-284, May 1999.

REA, M. C.; COGAN, T. M.; TOBIN, SYNTH. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 73, n. 4, p. 331-335, Oct. 1992.

REBHUN, W. C.; GUARD, C.; RICHARDS, C. M. **Diseases of dairy cattle**. USA: Willians & Willians, 1995. 530 p.

RENDOS, J. J.; EBEHART, R. J.; KESLER, E. M. Microbial population of teat ends of dairy cows and bedding materials. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 10, p. 1491-1500, Oct. 1975.

RICHARD, J. L.; McDONALD, J. S.; FICHTNER, R. E.; ANDERSON, A. J. Identification of yeasts from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. **American Journal Veterinary Research**, Shaumburg, v. 41, n. 12, p. 1991-1994, 1980.

ROGERS, S. A.; SLATTERY, S. L.; MITCHELL, G. E.; HIRST, P. A.; GRIEVE, P. A. The relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk 3. Individual proteins. **Australian Journal Dairy Technology**, Highett, v. 44, n. 1, p. 49-52, 1989.

SÁ, M. E. P. de; MOTA, R. A.; SOUZA, M. I.; OLIVEIRA, A. A. F. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 2, p. 100-103, maio/ago. 2000.

SAEMAN, A. I.; VERDI, R. J.; GALTON, D. M.; BARBANO, D. M. . Effects of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 3, p. 505-512, Mar. 1988.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFELL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORY, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, London, v. 239, 4839, p. 487-491, Jan. 1988.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIN, N. Enzymatic amplification of β -globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, London, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, Dec. 1985.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, B. S. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 130, n. 5, p. 199-207, May 1957.

SEARS, O. W.; GONZALES, R. N.; WILSON, D. J. et al. Procedures for mastitis diagnosis and control. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 445-468, 1993.

SENYK, G. F.; BARBANO, D. M.; SHIPE, W. F. Proteolysis in milk associated with increasing somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 2189-2194, Sept. 1985.

SHARMA, N. K.; REES, C. E. D.; DOOD, C. E. R. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 4, p. 1347-1353, abr. 2000.

SHARP, M. W. Bovine mastitis and *Listeria monocytogenes*. **Veterinary Record**, London, v. 125, n. 20, p. 512-513, Nov. 1989.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295 p.

SILVA, W. P. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite.** 1998. 88 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo.

SILVA, W. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 103-106, Jan./Mar. 2000.

SMITH, K. L.; TODHUNTER, D. A.; SCHOENBERGER, P. S. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 68, n. 6, p. 1531-1553, June 1985.

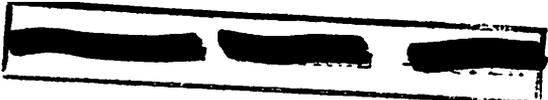
SOUZA, N. G.; BENEDET, H. D. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite de consumo do Estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v. 55, n. 315, p. 156-162, jul/ago, 2000.

STEELE, M. L.; MCNAB, W. B.; POPPE, C.; GRIFFITHS, M. W.; CHEN, S.; DEGRANDIS, S. A.; FRUHNER, L. C.; LARKIN, C. A.; LYNCH, J. A. A.; ODUMERU, J. A. Survey of Ontario bulk tank raw milk for foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 60, n. 11, p. 1341-1346, Nov. 1997.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Identification and purification of new staphylococcal enterotoxin H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1438-1443, Apr. 1995.

SUTRA, L.; POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal Medical Microbiology**, London, v. 49, n. 2, p. 79-89, Feb. 1994.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, Sept. 1995.



TOLLERSRUD, T.; KENNY, K.; REITZ JR, A. J.; LEE, J. C. Genetic and serologic evaluation of capsule production by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* sp. from Europe and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 8, p. 2998-3003, Aug. 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. cap. 18, p. 149-170.

TYLER, K. D.; WANG, G.; TYLER, S. D.; JOHNSON, W. M. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 2, p. 339-346, Feb. 1997.

UBOLDI EIROA, M. N. *Listeria monocytogenes* - características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos. **Coletânea ITAL**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 13-22, jan./jun. 1990.

VALLE, J. et al. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 5, p. 1323-1326, May 1990.

van BELKUM, A.; KLUYTMANS, J.; van LEEUWEN, W.; et al. Multicenter evaluations of arbitrary primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 6, p. 1537-1547, June 1995.

van LEEUWEN, W.; SIJMONS, M.; SLUIJS, J.; VERBRUGH, H.; VAN BELKUM, A. On the nature and use of randomly amplified DNA from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 11, p. 2770-2777, Nov. 1996.

van LEEUWEN, W.; VERBRUGH, H.; van der VELDEN, J.; van LEEUWEN, N.; HECK, M.; van BELKUM, A. Validation of binary typing for *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 3, p. 664-674, Mar. 1999.

VERDI, R. J.; BARBANO, D. M. Properties of proteases from milk somatic cells and blood leucocytes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 7, p. 2077-2081, July 1991.

VERDI, R. J.; BARBANO, D. M.; DELLAVALLE, M. E.; SENYK, G. F. Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n. 2, p. 230-242, Feb. 1987.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUM, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 271-280, July 1996.

WANG, G.; WHITTAN, T. S.; BERG, C. M.; BERG, D. E. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n. 25, p. 5930, Dec. 1993.

WATSON, D. L.; SCHWARTZKOFF, C. L. A Field trial to test the efficacy of a staphylococcal mastitis vaccine in commercial dairies in Australia. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BOVINE MASTITIS, 1990**, Indianapolis. **Proceedings...** Indianapolis, 1990. p. 73.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 41-46, Jan. 1988.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, Dec. 1990.

WEHR, H. M. *Listeria monocytogenes*. A current dilemma. **Journal Association of Official Chemists**, Gaithersburg, v. 70, n. 5, p. 769-782, Sept./Oct. 1987.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFASLKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531- 6535, Nov. 1990.

WILSON, D. J.; DAS, H. H.; GONZALES, R. N. et al. Association between management practices dairy herd characteristics and somatic cell count of bulk tank milk. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Shaumburg, v. 210, n. 10, p. 1499-1502, May 1997.

WILSON, I. G.; COOPER, J. E.; GILMOUR, A. Some factors inhibiting amplification of the *Staphylococcus aureus* enterotoxin C1 gene (*sec+*) by PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 22, p. 55-62, 1994.

CAPÍTULO 2

Isolamento e caracterização da microbiota do leite proveniente de bovinos leiteiros com mastite

1 Resumo

OLIVEIRA, Roberto Maciel de. **Isolamento e caracterização da microbiota do leite proveniente de bovinos leiteiros com mastite***. Lavras: UFLA, 2003. 143p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos).

O termo mastite refere-se à inflamação da glândula mamária, qualquer que seja a causa: fisiológica, traumática, alérgica ou infecciosa. A mastite infecciosa, a de maior ocorrência, resulta principalmente da penetração de bactérias através do canal do teto, onde se multiplica e supera os mecanismos de defesa do hospedeiro. Manifesta-se sob as formas agudas, sub-agudas ou crônicas, tendo ainda a denominação de mastite clínica ou subclínica, de acordo com a intensidade e a severidade do processo inflamatório. Objetivando caracterizar a microbiota presente em amostras de leite proveniente de fazendas leiteiras da região de Lavras, MG, apresentando casos de mastite subclínica, utilizaram-se os meios ágar sangue contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado e ágar Baird-Parker (ABP) em condições de aerobiose. Empregando-se o CMT como método de diagnóstico de mastite subclínica em seis rebanhos leiteiros, observou-se uma prevalência de 47,9%, ou seja, dos 94 animais testados, 45 apresentaram reação positiva ao teste. A contagem média de microrganismos mesófilos aeróbios (\log_{10} UFC/mL) no meio ágar sangue para propriedades que adotavam ordenha manual e mecânica foi de 5,86 e 5,49, respectivamente. Considerando os valores propostos pela Instrução Normativa nº 51, verificou-se que 66,7% das amostras (4/6), atenderiam ao padrão proposto para contagem de microrganismos mesófilos aeróbios ($1,0 \times 10^6$ UFC/mL). Para 2005, a mesma proporção das propriedades analisadas, atenderiam ao requisito proposto. Durante as análises bacteriológicas foram isoladas 414 bactérias sendo que, 65 (15,7%) corresponderam a bactérias gram-negativas e 95 (22,9%) foram identificados como bacilos gram-positivos. Em relação a cocos gram-positivos, 226 (54,6 %) foram identificados como *Staphylococcus* sp., o principal gênero das mastites subclínicas, sendo o *S. aureus* (26,8%) a espécie predominante e 28 (6,76%) como *Streptococcus*. Não foi identificada *Listeria monocytogenes* nas amostras de leite analisadas. Os resultados indicaram a necessidade de medidas higiênico-sanitárias na produção visando à melhoria da qualidade do leite.

*Orientadora: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA

2 Abstracts

OLIVEIRA, Roberto Maciel de. **Isolation and characterization of the microbiota of milk from dairy cattle with mastitis***. Lavras: UFLA, 2003. 143 p. (Thesis - Doctorate in Food Science).

The term mastitis is concerned with the inflammation of the mammary gland, whatever the cause may be; physiologic, traumatic, allergic or infectious. Infectious mastitis, the most widespread, results chiefly from the penetration of bacteria through the roof canal, where they multiply and overcome the host's defense mechanisms. It manifests under the acute, sub-acute or chronic forms, its having still the denomination of clinic and sub-clinic mastitis according to the intensity and severity of the inflammatory process. Aiming to characterize the microbiota present in milk samples from dairy farms from the region of Lavras, presenting cases of subclinical mastitis, the Blood Agar medium containing 5% of defibrinated sheep blood and Baird-Parker Agar (BPA) under aerobiosis conditions were utilized. By employing CMT as a diagnosis method of subclinical mastitis in six dairy herds, a prevalence of 47.9% was found, namely, out of the 94 animals tested, 45 presented a positive reaction to the test. The average count of aerobic mesophyllic microorganisms (\log_{10} UFC/mL) in the blood agar medium for farms, which adopted hand and automatic milking, was of 5.86 and 5.49, respectively. Considering the values proposed by the Normative Instruction number 51, it was found that 66.7% of the samples (4/6) would meet the standard proposed for the count of aerobic mesophyllic microorganisms (1.0×10^6 CFU/mL). For 2005, the same proportion of the farms surveyed would meet the requisite proposed. During the bacteriologic analyses were isolated 414 bacteria, 65 (15.7%) of them corresponding to the gram-negative bacteria and 95 (22.9%) were identified as Gram-positive bacillus. Concerning the gram-positive cocci, 226 (54.6%) were identified as *Staphylococcus* sp. as the main genus of the subclinical mastitis. *S. aureus* (26.8%) being the predominant species and 38 (6.76%) as *Streptococcus*. *Listeria monocytogenes* was not identified in the milk samples analyzed. The results indicated the need for hygienic-sanitary measures in production aiming at the improvement of milk quality.

*Adviser: Professor Ds. Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA

3 Introdução

Os produtores de leite estão encontrando numerosas dificuldades para continuarem suas atividades devido às pressões do mercado advindas, principalmente, do Mercosul. A necessidade de adoção de tecnologia para melhorar a produtividade do rebanho e a qualidade do leite tem sido imprescindíveis para reequilibrar os custos e garantir o valor comercial do produto.

Para que seja obtida a qualidade na produção, deve-se atentar para o controle da mastite, principal doença de rebanhos leiteiros, responsável por perdas, tanto em quantidade de leite produzido como por sensíveis alterações na composição do produto. A mastite diminui os teores de lactose, caseína, Ca^{++} , P^{++} , gorduras e aumenta os teores de imunoglobulinas, lipase, Na^+ e Cl^- (Costa, 1991; Miller et al., 1993; National Mastitis Council, 1996).

A prevenção e o tratamento da mastite são preocupações primárias da indústria leiteira. As práticas como a higiene na ordenha, a redução da exposição aos patógenos ambientais e o tratamento de vacas secas com antibióticos são medidas que têm reduzido a ocorrência da doença, mas não o suficiente para diminuir o seu impacto econômico (Politis et al., 1996). Assim, medidas higiênico-sanitárias conduzidas de maneira não adequada ou satisfatória podem facilitar a contaminação do leite por microrganismos indesejáveis e esses podem causar alterações físico-químicas no leite, limitando sua durabilidade e de seus derivados, além de determinar problemas econômicos e de saúde pública.

Mesmo em rebanhos bem manejados, poder-se-iam esperar, de acordo com Weiss et al. (1998), 50 casos de mastite clínica por 100 vacas durante o período de um ano. O custo de um caso de mastite clínica gira em torno de US\$ 100 a US\$ 140 dólares. Este custo inclui gastos com veterinário, medicamentos, queda na produção e descarte de leite. Para um rebanho bem manejado de 100

vacas, o custo anual com mastite clínica gira em torno de 6.000 dólares. O custo com mastite subclínica é mais difícil de quantificar, mas acredita-se ser maior do que a da clínica, elevando o total anual para 17.500 dólares.

Nos levantamentos feitos em rebanhos leiteiros de São Paulo e Minas Gerais, 72% das vacas apresentaram mastite subclínica em, pelo menos, um quarto e a taxa de quartos afetados foi de 46%. A porcentagem de animais com mastite clínica foi de 17,45% (Costa et al., 1995b). Considerando que a mastite subclínica reduz de 3% a 46% a produção de leite no quarto afetado, pode-se perceber que estes rebanhos estão perdendo, em média, cerca de 12% da produção de leite em decorrência da mastite. Os prejuízos por mastite subclínica em propriedades, nestas mesmas regiões, corresponderam em média a US\$ 317,00 por vaca/ano e US\$ 21000,00 por propriedade/ano (Costa et al., 1999).

O diagnóstico da mastite clínica pode ser feito por meio da sintomatologia, como inflamação do úbere, secreção láctea com grumos, sangue, pus, entre outras secreções patológicas. Entretanto, para diagnosticar a mastite subclínica, é necessária a utilização de exames complementares baseados no conteúdo celular do leite. Além disso, existe a necessidade da cultura e isolamento dos agentes etiológicos envolvidos, para a implantação de métodos de tratamento e estratégias de controle e profilaxia adequados (Brito & Brito, 1999; Fonseca & Santos, 2000).

O emprego do CMT constitui-se numa prova de triagem para detecção de mastite subclínica de fácil execução, sendo indicado para monitorar rebanhos a campo onde Fagliari et al. (1983) observaram que amostras reagentes ao CMT nos graus 1+, 2+ e 3+ concordaram com o exame bacteriológico em 22,4%, 74,4% e 85,6%, respectivamente.

Segundo Sears et al. (1993), os principais microrganismos causadores de mastite bovina podem ser divididos em cinco grupos: cocos gram-positivos, bactérias gram-negativas, corinebactérias e *Actinomyces*, *Mycoplasma* e outros

como *Nocardia* sp., *Prototheca* sp. e leveduras. Entretanto, os cocos gram-positivos constituem o principal grupo, responsáveis por mais de 90% das ocorrências (Bier, 1990; Silva et al., 2000 a, b), sendo o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* as espécies mais freqüentes (Langenegger et al., 1986, Sicho et al., 1993, Vargas et al., 1996. Barbalho & Mota, 2001). Segundo Ferreira et al. (1981) e Riedner et al. (1987) o *Staphylococcus aureus* ocupa o primeiro lugar na freqüência de isolamentos, ficando o *Streptococcus* sp. em posição secundária, certamente devido à suscetibilidade que apresentam aos antibióticos.

Os coliformes constituem os patógenos ambientais, dos quais os mais freqüentemente isolados deste grupo incluem *Escherichia coli* (Nemeth et al., 1994; Correa et al., 2000), *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae*. Estes microrganismos procedem do meio ambiente e das fezes de todos os animais sadios alojados no estábulo, uma vez que são habitantes normais da microbiota do trato gastrointestinal, tal que a glândula mamária está quase constantemente exposta a estes agentes. Entretanto, comparando isolados de *E. coli* proveniente de vacas mastíticas com isolados de fezes bovinas, Nemeth et al. (1994) não observaram diferenças significativas para os biotipos estudados concluindo que este agente é simplesmente um patógeno oportunista.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococaceae; são cocos gram-positivos, imóveis, arrumados em massas irregulares ou em cachos de uva, anaeróbios facultativos ou aeróbios, catalase positivos e apresentam diversas espécies (Carter, 1988; Bier, 1990). Dentre as espécies que são positivas ao teste de coagulase, o *Staphylococcus aureus* é a principal (Watts, 1988; Fernandes, 1992; Bramley et al., 1996). Fox & Gay (1993) estimaram que cerca de 19% a 40,7% das vacas são infectadas por este microrganismo.

Em 1939, atribuía-se aos estafilococos a responsabilidade por 5% dos casos de infecção mamária, 80% aos estreptococos, 5% a *Corynebacterium*

pyogenes e 3,5% a *E. coli* (Lerche, 1969). Desde então, a participação dos estafilococos na mastite aumentou significativamente (Costa et al., 1994, 1996, Langoni & Domingues, 1998; Brabes, 1999; Silva et al., 2000a, b; Barbalho & Mota, 2001).

As espécies coagulase negativa, comumente isoladas de leite bovino, são consideradas patógenos secundários e, em geral, causam reação inflamatória moderada na glândula mamária (Harmon & Langlois, 1989; Bramley et al., 1996) representadas principalmente por *S. epidermidis*, *S. chromogenes* e *S. simulans* encontrados com alta frequência em amostras de leite. A prevalência de *S. epidermidis* foi de 11,3% a 23,19% (Nader Filho et al., 1985; Langoni et al., 1991).

Almeida et al. (1996) observaram que o *Staphylococcus aureus* é capaz de invadir e se replicar dentro das células epiteliais da glândula mamária bovina. Esse mecanismo pode ser um pré-requisito para a infecção, além de levar a resultado falso negativos nos exames bacteriológicos e influenciar na eficácia dos antibióticos usados no tratamento das mastites causadas por esse microrganismo.

Os estreptococos pertencem à família Streptococaceae, gênero *Streptococcus* e são cocos gram-positivos, geralmente dispostos aos pares ou em cadeias, anaeróbios facultativos ou estritos, catalase negativos (Bier, 1990). Três espécies são mais frequentemente identificadas como causadoras de mastite, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e o *Streptococcus uberis*, sendo o *Streptococcus agalactiae* o mais prevalente (Watts, 1988; Fernandes, 1992; Almeida & Oliver, 1995).

Longo et al. (1994), estudando a mastite subclínica em quatro rebanhos compostos por 118 vacas leiteiras e 468 quartos mamários, verificaram que o *Staphylococcus aureus* foi isolado de 44,7% dos casos, *Staphylococcus coagulase negativa* de 31,6% e *Streptococcus sp.* de 11,4%.

Na região de Ribeirão Preto, São Paulo, Nader Filho et al. (1985), verificando a prevalência da mastite bovina, encontraram 11,9% das vacas reagentes ao CMT e 11,1% foram confirmadas pelo isolamento do agente etiológico. O *Staphylococcus aureus* foi isolado de 52,1% dos casos, *S. epidermidis* de 11,3%, *Streptococcus* sp. de 26,8% e outros agentes de 9,8%.

Em um estudo realizado nos estados de Nova York e Pensilvânia, nos EUA, durante a década de 1990, no qual foram avaliadas culturas microbiológicas de leite de 108.312 amostras, identificou-se cerca da metade das amostras (48,5%) como sendo positivas para algum agente patogênico da mastite (Wilson et al., 1997). Os resultados deste estudo demonstram que os agentes causadores mais freqüentemente encontrados foram *Staphylococcus* sp. (11,3%), *Streptococcus agalactiae* (10,1%), *Staphylococcus aureus* (9,1%), *Streptococcus* sp. (7,3%) e *Corynebacterium bovis* (7,2%). Os quatro principais grupos de agentes mais comuns deste estudo representaram cerca de 75% dos isolamentos. É interessante notar que os coliformes foram identificados em menos de 1% das amostras, mas que ainda assim podem determinar perdas de produção de leite/lactação (Barrow et al., 1989).

No município de Itaguaí, Rio de Janeiro, 198 vacas mestiças, com úbere aparentemente sadio foram submetidas ao CMT. Dessas, 80 (40,4%) apresentaram reação ao teste, sendo então colhidas 180 amostras de leite, das quais o *Staphylococcus aureus* foi isolado em 52,2% e *Staphylococcus* coagulase negativa em 16,6% (Vianni et al., 1992).

Por meio do estudo etiológico da mastite clínica em bovinos, Costa et al. (1995a) examinaram 3.574 vacas em diferentes estágios de lactação. Do total de amostras analisadas, os autores verificaram que 22,23% foram negativas ao exame microbiológico e nas amostras positivas (77,77%), observaram que os principais agentes isolados foram *Staphylococcus* sp. (34,09%), *Streptococcus* sp. (28,05%) e *Corynebacterium* sp. (21,77%).

O controle da mastite nos rebanhos leiteiros constitui um importante passo para a elaboração de produtos de boa qualidade e diminuição dos riscos à população. Diante disso, este estudo teve como objetivo isolar e identificar os agentes etiológicos da mastite em leite proveniente de animais com reação positiva ao California Mastitis Test (CMT), em propriedades produtoras de leite que utilizam ordenha manual ou mecânica, na região de Lavras, MG, por meio de testes bioquímicos e fisiológicos.

4 Material e Métodos

4.1 Obtenção das amostras

Foram avaliadas seis propriedades de exploração leiteira da região de Lavras, sul de Minas Gerais. Os rebanhos constituíam-se, na grande maioria, de animais da raça Holandesa, variedade preta e branca, primíparas e pluríparas de diferentes idades, em diferentes estágios de lactação com e sem a participação do bezerro, fazendo repasse ao final da ordenha. A coleta das amostras foi baseada na primeira ordenha do dia. Foram submetidos ao “California Mastitis Test” CMT (Schalm & Noorlander, 1957), utilizando-se como reagente a solução CMT-FATEC, 94 animais em lactação, ordenhados manualmente ou por meio de ordenhadeiras mecânicas. Na maioria dos estabelecimentos, a ordenha era realizada em currais de alvenaria, com condições higiênicas inadequadas. Das propriedades visitadas, apenas uma adotava a lavagem e desinfecção do úbere antes e após a ordenha.

Para a realização desta prova, o úbere de cada animal foi submetido à higienização com água e sabão, secagem com papel toalha e desinfecção com álcool iodado 10%. Após desprezar os primeiros jatos de leite, foram coletadas em frascos estéreis de 16x160mm com tampa de rosca de baquelite, aproximadamente 50 ml de leite dos tetos que apresentaram resultado positivo à prova do CMT com escores de 1+, 2+ e 3+, perfazendo um total de 45 amostras. Após a coleta, foram identificados os dados de cada animal, bem como o quarto, sendo fechados imediatamente e acondicionados em caixa isotérmica com gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, MG, onde foram realizadas as análises microbiológicas.

4.2 Análises realizadas

4.2.1 Análises microbiológicas

4.2.1.1 Preparo e diluições das amostras

Após homogeneização das amostras de leite, transferiu-se com auxílio de pipeta, 1 mL da amostra para tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% de modo a obter uma diluição de 10^{-1} . Em seguida, retirou-se 1 mL desta diluição 10^{-1} , transferindo-o para outro tubo contendo 9 mL do mesmo diluente, obtendo-se assim a diluição de 10^{-2} . Repetiu-se o mesmo procedimento até obter-se a diluição de 10^{-4} .

4.2.1.2 Plaqueamento e contagem

Foram feitas inoculações em ABP (ágar Baird-Parker) e ágar sangue contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Diariamente, durante três dias, observou-se o tipo de crescimento bacteriano, assim como características da colônia.

O plaqueamento foi feito em superfície, utilizando-se 0,1 mL das diluições e espalhando-se com alça de Drigalski, sendo as placas inoculadas sempre em duplicata. Após a inoculação, as placas foram incubadas aerobicamente a 37°C, por 24-48 horas. Após o período de incubação, realizaram-se as contagens e a retirada das colônias.

As colônias foram retiradas sempre da placa com maior diluição, mantendo-se sempre a proporção de 10% do número total de colônias presentes por diluição. Estas colônias foram inoculadas em caldos de composição idêntica à do meio de origem e à inoculação, seguindo as mesmas condições de temperatura anteriormente utilizadas.

4.2.1.3 Para o isolamento e identificação de coliformes totais e a 45°C

As amostras de leite foram diluídas para inoculação e cálculo do Número Mais Provável de coliformes (NMP). As diluições previamente preparadas foram inoculadas em caldo lauryl sulfato triptose contendo tubo de durhan invertido, incubadas a 30°-35°C por 24-48 horas. Após a incubação, os tubos positivos foram repicados para caldo EC e incubados a 45°C por 24-48 horas. Todos os tubos que apresentaram turvação e gás no tubo de durhan foram considerados positivos e utilizados para o cálculo de NMP de coliformes.

A partir dos tubos positivos para coliformes a 45°C, foram feitas estrias em placas de petri contendo ágar eosina azul de metileno (EMB), incubado a 35°C-37°C por 24 horas. Todas as colônias que se desenvolveram com características diferentes foram retiradas e repicadas para Plate Count Agar em tubo inclinado para posterior purificação e identificação.

Após a seleção de todas as colônias das amostras, as mesmas foram purificadas. Após a identificação de bastonetes gram-negativos pelo método de gram, os seguintes testes foram realizados: oxidase, comportamento dos açúcares em tríplice açúcar (TSI), produção de urease, de indol, prova de vermelho de metila, prova de motilidade, utilização de citrato de Simmons, de fenilalanina desaminase, de Voges-Proskauer, da glicose, lactose e malonato, com o objetivo de classificar os bastonetes isolados.

4.2.1.4 Para o isolamento e identificação de *Staphylococcus*

De cada diluição inicial retirou-se, com o auxílio de uma pipeta, uma alíquota de 0,1 mL que foi distribuída nas placas pelo método *spread plate*, usando a alça de drigalski, em duas placas contendo o meio seletivo indicador ágar Baird-Parker (ABP-MERCK), incubadas a 37°C por 24/48h após a absorção da amostra pelo meio. Duas ou mais colônias típicas, isto é, de no máximo 1,5 mm, cor negra ou cinza escuro, lisas, convexas, podendo apresentar

zona opacas e/ou claro em torno e atípicas para estafilococos, foram selecionadas de placas com ABP, contendo entre 25 e 300 UFC. A UFC do *S. aureus* apresenta-se com estas características, pois, ao crescer, reduz o telurito de potássio a telurito metálico e hidrolisa a lipovitelina, que é uma lipoproteína encontrada na gema do ovo.

As UFC selecionadas foram inoculadas em tubos correspondentes, contendo cerca de 2 mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) e, após homogeneização cuidadosa, foi alçada uma alíquota para o ágar tripticase de soja (TSA) inclinado, incubando a 37°C/18-24h.

Estas cepas foram purificadas e confirmadas por meio da coloração de gram e testes bioquímicos de oxidase, crescimento em NaCl 15%, catalase, coagulase livre e termonuclease conforme citado por Sabioni et al. (1994), produção de acetoína, hemólise, urease, pigmentação e fermentação aeróbica e anaeróbica de manitol e glicose. As cepas que se mostraram como cocos gram-positivas, catalase e coagulase positivos foram separadas e submetidas aos testes para identificação de *Staphylococcus aureus*. A confirmação foi feita por meio do API STAPH utilizando-se 24 cepas selecionadas ao acaso.

4.2.1.5 Para o isolamento e identificação de *Streptococcus*

Microrganismos que se apresentaram como cocos gram-positivos e catalase negativa, isolados dos meios ágar sangue e Baird-Parker, foram classificados, agrupados e identificados por gênero, de acordo com tabelas e chaves citadas por Holt et al. (1994). Os principais testes são: crescimento a 10°C e 45°C, crescimento em pH 9,5, crescimento em NaCl 6,5%, crescimento em bile 40%, crescimento em ágar KF e SF, verificação de hemólise em ágar sangue a 5%, fermentação de carboidratos (lactose, sacarose, manitol, sorbitol e arabinose), hidrólise de hipurato, esculina e redução de nitrato.

4.2.1.6 Para o isolamento e identificação de *Listeria monocytogenes*

Na detecção da presença de *Listeria monocytogenes*, as amostras de leite foram submetidas à análise microbiológica, segundo o método do FDA (1995) em que 25ml das amostras foram homogeneizados em 225 ml de caldo enriquecimento de *Listeria* (LEB-MERCK) e incubados por 4 h/30°C, quando foram então adicionados os agentes seletivos seguindo-se de incubação à 30°C/24h, 48h e sete dias. Após cada um destes períodos de incubação foi realizado plaqueamento seletivo diferencial utilizando placas de ágar Oxford (OXA-MERCK) e placas de ágar PALCAN (OXOID) e incubadas a 35°C/24-48h.

Caso ocorresse crescimento de *Listeria monocytogenes*, seriam selecionadas cinco UFC típicas e transferidas de cada meio para purificação e confirmação em placas de ágar Trypticase de Soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) e incubadas à 30°C/24-48h. Observadas as colônias sob luz oblíqua, seriam selecionadas as colônias azuladas típicas, bem isoladas, para realizar as provas de confirmação bioquímica.

A biotipagem seria realizada por meio dos seguintes testes confirmativos: coloração de gram, teste de catalase, teste de motilidade, nitrato, TSI, testes de verificação de hemólise, fermentação da dextrose, xilose, ramnose, manitol, maltose e esculina.

Todas as cepas que se mostrassem como cocobacilos ou bastonetes curtos, gram-positivas, móveis com crescimento característico a 22°C-25°C lembrando um guarda-chuva, catalase positivas, nitrato negativas, TSI característico, hemolíticas, não fermentadoras de xilose e manitol, e fermentadoras de ramnose, dextrose, maltose e esculina, seriam consideradas suspeitas de serem *Listeria* sp.

4.2.1.7 Para o isolamento e identificação de bacilos gram-positivos

4.2.1.7.1 Catalase positiva, motilidade positiva

Foram identificados, segundo tabelas e chaves diferenciais propostas por Slepecky & Hemphill (1991). As principais provas diferenciais utilizadas foram: motilidade a 37°C, redução do nitrato, O-F glicose, indol, liquefação de gelatina a 22°C, citrato de Simmons, Voges-Proskauers (VP), uréia, fenilalanina desaminase, fermentação de carboidratos (glicose, manitol, arabinose e xilose), crescimento em NaCl 7,5% e hidrólise de amido. Também foi verificada a presença ou formação de esporos por meio da técnica de coloração de esporos (Ribeiro & Soares, 1993).

4.2.1.7.2 Bastonetes gram-positivos curtos (Cocobacilos), catalase positiva, motilidade negativa

Após verificação da ausência de esporos, foram realizados os seguintes testes propostos por MacFaddin (1980): redução do nitrato, produção de enzimas (pirazinamidase, pirrolidonil arilamidase, fosfatase alcalina, beta-glucuronidase, beta-galactosidase, alfa-glucosidase, N-acetil-beta glucosaminidase), esculina, urease, hidrólise de gelatina, fermentação de açúcares (glicose, ribose, xilose, manitol, maltose, lactose, sacarose) e catalase.

4.2.1.7.3 Catalase negativa, motilidade negativa, sem produção de gás a partir da glicose.

Para a sua caracterização, estes microrganismos foram agrupados de acordo com características fisiológicas (homofermentativos ou heterofermentativos facultativos), segundo tabelas e chaves diferenciais. As principais provas utilizadas foram: crescimento a 15°C, produção de NH₃ a partir da arginina, fermentação de carboidratos (amigdalina, celobiose, galactose,

lactose, maltose, manitol, manose, melibiose, rafinose, salicina, sacarose, trealose, arabinose, esculina, melezitose, ribose, sorbitol e xilose) e catalase.

4.2.2 Preservação das colônias isoladas

Após a confirmação da pureza, as cepas foram mantidas viáveis em PCA inclinado, cobertas com óleo mineral estéril (Nujol) e mantidas sob refrigeração, de onde, periodicamente, foram retiradas para reativação e aplicação de testes utilizados na identificação das mesmas.

5 Resultados e Discussão

5.1 Número de animais reagentes ao CMT

A Tabela 1 mostra a distribuição de animais testados e reagentes ao CMT, assim como a média dos tetos afetados por vaca, em 6 propriedades leiteiras que utilizam ordenha manual e mecânica na obtenção do leite. Observa-se que a prevalência de mastite subclínica nas diferentes propriedades situou-se numa faixa de 27,7% a 58,8%, independente do tamanho do rebanho. Nota-se, ainda, que, das 94 fêmeas submetidas ao CMT, 45 foram reagentes, obtendo-se, portanto, uma prevalência de 47,9% de fêmeas reagentes.

Os resultados encontrados, relativos à ocorrência de mastite subclínica nos rebanhos leiteiros estudados, são semelhantes aos reportados por Centorbi et al. (1992) na Argentina, Aarestrup et al. (1995) na Dinamarca e Silva (1998) no Rio Grande do Sul que encontraram, respectivamente, 46,6%, 47% e 44,7% de vacas com mastite subclínica. No Rio de Janeiro, Freitas & Magalhães (1990), também observaram uma prevalência de 48%. Entretanto, Furlanetto et al. (1987), em Barretos, SP e Nader Filho et al. (1988), em Ribeirão Preto, SP, encontraram uma ocorrência bem mais baixa, da ordem de 11,9% de mastite subclínica, indicando que esta freqüência pode ser bastante variável.

Nas propriedades com ordenha mecânica, encontrou-se uma variação muito grande nos procedimentos de lavagem e de desinfecção dos utensílios e das ordenhadeiras. Enquanto em algumas propriedades observou-se que os procedimentos corretos de limpeza das ordenhadeiras e dos utensílios que entram em contato com o leite eram realizados de maneira adequada, em outras, a limpeza das máquinas era feita simplesmente com água, muitas vezes não clorada.

TABELA 1 Distribuição dos dados relativos a animais e tetos submetidos ao CMT em seis propriedades leiteiras na região de Lavras que empregavam ordenha manual e mecânica, no período de agosto de 2000 a janeiro de 2001

Propriedades	Animais			Tetos reagentes	
	Testados	Reagentes	%	n	média
	n	n			
1	12	07	58,3	10	2,8
2	17	08	47,0	21	1,5
3	17	10	58,8	15	2,7
4	18	10	55,5	22	1,8
5	12	05	41,6	07	2,9
6	18	05	27,7	10	2,0
Total	94	45	47,9	85	2,2

Depreende-se, ainda, da análise da Tabela 1, que a frequência média de quartos afetados por vaca variou entre os rebanhos estudados, mas o índice foi de 2,2 tetos por vaca reagente. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Nader Filho et al. (1985), que obtiveram um índice de 2,56 por vaca; no entanto, estão acima dos dados obtidos por Harrop et al. (1975), de 1,58. Acredita-se que a diferença dos dados deste trabalho e o do último autor citado deve-se, principalmente, à constituição do rebanho, em que, neste último caso, predominava a raça zebuína mais rústica.

5.2 Microbiota presente em leite mastítico

As técnicas microbiológicas utilizadas na pesquisa permitiram avaliar diferentes características associadas à microbiota bacteriana presente no leite mastítico.

5.2.1 Total de microrganismos aeróbios mesófilos

A Figura 1 representa as variações médias de contagens globais de microrganismos aeróbios mesófilos (\log_{10} UFC/mL) obtidas de leites provenientes de vacas mastíticas em fazendas que empregam ordenhas manuais ou mecânicas, realizadas em meio ágar sangue com 5% de sangue de carneiro desfibrinado nas seis propriedades estudadas.

Do total das propriedades analisadas, duas adotavam ordenha manual e quatro ordenha mecânica. Conforme pode ser observado, a contagem média (\log_{10} UFC/mL) encontrada nas fazendas com ordenha manual foi de 6,23 e 5,50 e, nas fazendas com ordenha mecânica, 6,04, 4,86, 5,30 e 5,76. Esta oscilação na contagem entre as diferentes propriedades pode ter ocorrido devido às condições higiênicas inadequadas da ordenha, as quais foram observadas durante a coleta das amostras. O isolamento e identificação dos patógenos do úbere pela cultura de amostras coletadas assepticamente são os procedimentos mais utilizados para diagnóstico das infecções intramamárias. Entretanto, de acordo com Brito & Brito (1999) problemas com contaminação da amostra podem ocorrer, podendo ser por microrganismos do ambiente e muitos destes podem ser agentes da mastite.

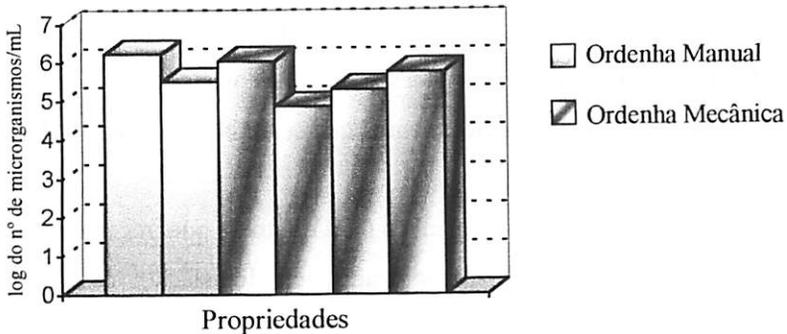


FIGURA 1 Contagem total do número de aeróbios mesófilos em ágar sangue nas seis propriedades leiteiras acometidas de mastite subclínica.

Os resultados obtidos sugerem que a ocorrência de mastite subclínica independe do sistema de ordenha utilizado. Aparentemente, o manejo, o layout da propriedade, as práticas de higiene e o nível cultural dos ordenhadores têm um papel mais importante que o tipo de ordenha.

Em propriedades com ordenha manual, observou-se que a média da contagem de microrganismos mesófilos foi de $5,86 \log_{10}\text{UFC/mL}$ sendo superior à média obtida em propriedades com ordenha mecanizada, onde constatou-se um valor de $5,49 \log_{10}\text{UFC/mL}$. Estes resultados demonstram que a produção higiênica do leite não exige necessariamente grandes investimentos em tecnologia, mas visa principalmente adequados hábitos higiênico-sanitários na produção. Essas propriedades apresentaram-se, embora com uma maior média de contagem total, eficientes, estando esses dados em perfeito acordo com os achados descritos por Silva et al. (2000a).

Verifica-se que a contagem média de mesófilos de $5,67 \log_{10}\text{UFC/mL}$ assemelha-se parcialmente com as observações de Picinin et al. (2001) e Silva et al. (2000a), os quais verificaram contagem média de $5,59$ e $6,52 \log_{10}\text{UFC/mL}$, respectivamente, o que significa riscos de perda de qualidade deste leite.

Considerando a legislação vigente (Brasil, 2002) verificou-se que 66,7% das propriedades (4/6) atenderiam ao padrão proposto para contagem de microrganismos mesófilos aeróbios ($1,0 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$). Para 2005, os resultados encontrados nas citadas propriedades continuariam atendendo aos padrões da legislação para aqueles estabelecimentos que se anteciparam aos termos da atual legislação.

É importante chamar a atenção para o fato de que, mesmo diante de uma contagem padrão dentro do preconizado pela legislação, os animais foram positivos para o teste de CMT. Este resultado indica a ocorrência de mastite nas propriedades estudadas e, possivelmente, o uso indiscriminado de antibióticos, o que irá interferir na qualidade do leite.

5.2.2 Caracterização de coliformes totais e a 45°C

Os coliformes são citados pela legislação como indicadores de qualidade higiênico-sanitária que podem ser utilizados para averiguar a qualidade microbiológica de um produto ou prever o tempo de prateleira deste. Considerando os padrões microbiológicos especificados na RDC N° 12 (Brasil, 2001) para leite pasteurizado, são considerados inoportunos quando presentes em quantidade superiores a 2/mL para um número máximo aceitável de uma amostra quando coletadas cinco unidades para análise.

As contagens médias obtidas nas análises de leites mastícticos reportadas na Figura 2, para coliformes totais e a 45°C, mostram uma estreita relação de *E. coli* nos leites estudados.

As análises do Número Mais Provável (NMP) para coliformes totais apresentaram resultados diversificados (dados não mostrados), incluindo, desde ausência de microrganismos do grupo, a estimativas de $1,1 \times 10^2$ NMP/mL. As provas confirmativas para coliformes à 45°C, de modo similar, também variaram, incluindo desde ausência até valores da ordem de $4,6 \times 10^1$ NMP/mL.

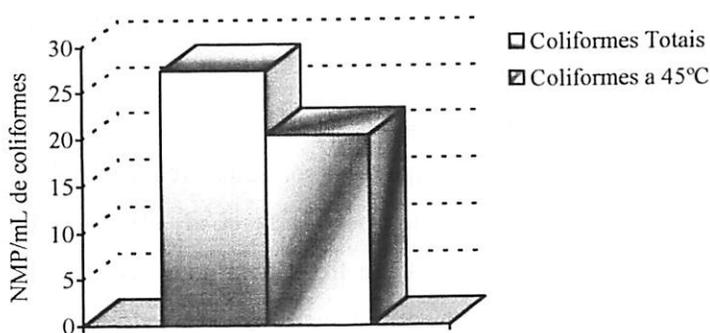


FIGURA 2 Média das contagens de coliformes totais e a 45°C para as seis propriedades estudadas.

Considerando que bactérias coliformes e patógenos entéricos associados, geralmente estão presentes no hábitat da vaca, os resultados obtidos caracterizaram uma situação de risco potencial, tendo em vista a interrelação entre bactérias do grupo coliforme e a possível ocorrência de patógenos intestinais, tais como *Salmonella*. Estas observações conduziram à evidência de condições sanitárias deficientes empregadas nas distintas propriedades analisadas.

De acordo com a Tabela 2, de um total de 65 cepas características isoladas em Agar EMB-Levine, 56,92% foram positivas para *Escherichia coli*, 20,0% para *Klebsiella* sp., 9,23% para *Enterobacter* sp., 6,15% para *Proteus* sp., 1,54% para *Acinetobacter* sp. e 6,16% para *Pseudomonas* sp.. Estes resultados assemelham-se aos de Leal (1999) (58,3%) e Bradley & Green (2001) (34,7%) para *E. coli*.

Shigel et al. (1998a), estudando sete rebanhos em Israel, encontraram maior frequência de coliformes (60,2%), dos quais 51,2% foram identificados como *Escherichia coli*. Estes mesmos autores (1998b), estudando animais com mastite por coliformes, encontraram *E. coli* em 95,17% das amostras, 3,07% de *Klebsiella* sp., 1,32% de *Enterobacter* sp. e 0,44% de *Proteus*. Barker et al. (1998) também verificaram maior ocorrência de *E. coli*: 38% das 102 amostras de leite de vacas com mastite clínica.

Dentre os bastonetes gram-negativos, como pode ser observado na Tabela 2, a *Pseudomonas* sp. apareceu com uma frequência de 0,96% (4/414), resultado inferior aos detectados por Costa et al. (1986) (1,06%) e aos de Langoni et al. (1991) (2,37%). Essa frequência pode ser atribuída, em parte, à exposição dos animais a esses bastonetes gram-negativos, pois podem estar presentes na água e no solo (Kirk, 1992) e por procedimentos insatisfatórios na higiene.

TABELA 2 Porcentagem de coliformes isolados em ágar EMB-Levine

Microorganismo	Quantidade	Porcentagem
<i>Escherichia coli</i>	37	56,92
<i>Klebsiella</i> sp.	13	20,0
<i>Enterobacter</i> sp.	6	9,23
<i>Proteus</i> sp.	4	6,15
<i>Pseudomonas</i> sp.	4	6,16
<i>Acinetobacter</i>	1	1,54
Total	65	100

Sabe-se que a presença de coliformes totais (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, etc.) no leite, água e em outros alimentos não tem relação direta com a ocorrência de contaminação fecal e nem a presença de microrganismos patogênicos. Estes se encontram, na maior parte, em ambiente não entérico, como superfícies que têm contato direto com a água, biofilmes, etc. Já a presença de coliformes a 45°C pode indicar a presença de microrganismos patogênicos de origem entérica como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella*, entre outros (Pourcher et al., 1991).

Costa et al. (1998), estudando 736 casos de mastite ambiental (clínica e subclínica) de 5.216 animais, detectaram baixa incidência de *E. coli*, sendo o organismo mais freqüente a *Prototheca zopfii*, em 304 dos casos. Por outro lado, Moreti et al. (1998) isolaram, dentre os agentes ambientais, *E. coli* com maior freqüência das amostras de leite de animais com mastite subclínica.

Cepas de *E. coli* causando mastite clínica periódica deve ter um meio de persistência, tal como a aderência ou a capacidade para sobreviver intracelularmente. Döpfer et al. (2000) demonstraram a capacidade de um número limitado de *E. coli* para aderir e invadir as células epiteliais da glândula mamária *in vitro*. Alguns casos são severos o bastante para levar à morte, mas, usualmente, o movimento maciço de leucócitos para o leite oprime a bactéria invasora, embora esta capacidade seja menos efetiva na primeira lactação devido

a deficiências no número e funções dos neutrófilos (Shuster et al., 1996). Neste caso de mastite, é muito difícil isolar o patógeno do leite e usá-lo para um diagnóstico definitivo, visto que o organismo pode ter sido eliminado no curso da infecção (Brito & Brito, 1999).

Avaliando o nível de quartos com infecções intramamárias durante a secagem e após a lactação, Green et al. (2002) verificaram que a probabilidade de um quarto ceder a mastite clínica aumentou quando patógenos ambientais, entre eles a *Escherichia coli*, foram cultivados antes e após a secagem.

As amostras de leite analisadas sugerem uma grande contaminação fecal, refletindo a necessidade de um maior controle na higienização de equipamentos destinados à ordenha e higiene pessoal para que se obtenha um produto final com qualidade.

5.2.3 Contagem e caracterização de *Staphylococcus* sp.

A Figura 3 mostra os resultados médios das contagens totais de colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus* sp. em ágar Baird-Parker isolados de vacas mastíticas nas seis propriedades estudadas.

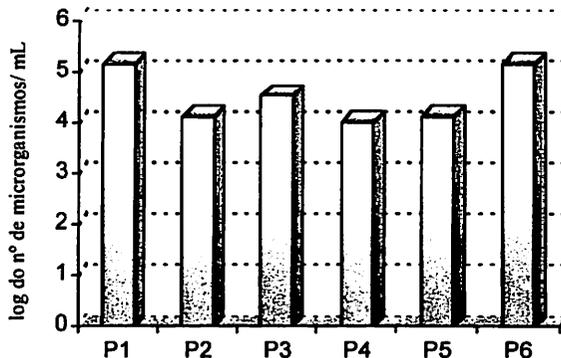


FIGURA 3 Contagem total do número de colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus* em ágar Baird-Parker presentes nas seis propriedades leiteiras acometidas de mastite.

A contagem total média de microrganismos (\log_{10} UFC/mL) quando isolados no meio Baird-Parker foi de 5,17; 4,11; 4,53; 4,0; 4,11 e 5,17, nas propriedades leiteiras 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. É importante esclarecer que, embora as portarias do Ministério da Agricultura não estabeleçam um padrão para contagem de *Staphylococcus* em leite, sabe-se que o crescimento deste agente em altos níveis ($\geq 10^6$) em alimentos é perigoso, pois cerca de metade das cepas de *S. aureus* produz enterotoxinas termoestáveis quando presente neste nível (Bergdoll, 1991). É considerado internacionalmente que níveis de 10^5 ou mais por g/mL de alimento pode ter significado epidemiológico em relação à ocorrência de toxinose, constituindo, assim, em um alerta. Porém, 10^3 a 10^4 UFC/g ou mL já significam risco à saúde pública (ICMSF, 1998).

A contagem total de microrganismos em meio Baird-Parker assemelha-se à contagem total de aeróbios mesófilos em ágar sangue, confirmando a precária condição higiênica a que os produtores submetem a ordenha.

Foram isoladas 185 cepas a partir dos cultivos em ágar Baird-Parker (BPA) e 86 cepas a partir dos cultivos em ágar sangue, suspeitas de serem estafilococos para identificação bioquímica. Destas, 259 (95,75%) eram cocos Gram positivos, 231 (85,2%) eram gram-positivos e catalase positivas e 165 (60,8%) eram positivas para gram, catalase e coagulase. É importante mencionar que muitas colônias isoladas do ágar Baird-Parker não apresentaram morfologia típica, ou seja, com halo, concordando com os achados de Silva et al. (2000b) e Miwa et al. (2001).

Os resultados obtidos da identificação de todas as propriedades estudadas estão apresentados na Tabela 3. Dentre os 226 isolados dos meios Ágar Sangue e ABP estudados, 111 (49,1%) foram identificados como *Staphylococcus aureus*; 51 (22,6%) como *Staphylococcus hyicus*; 22 (9,73%) como *S. epidermidis*; 17 (7,52 %) como *S. hominis*; 10 (4,42%) como *Staphylococcus* sp.; 9 (3,98%) como *S. hyicus*; 2 (0,88%) como *S. warneri*; 2

TABELA 3 Porcentagem de espécies de amostras bacterianas obtidas de leite mastítico, coletadas em seis propriedades na região de Lavras

<i>Staphylococcus</i>	nº	%
<i>aureus</i>	111	49,1
<i>hyicus</i>	51	22,6
<i>epidermidis</i>	22	9,73
<i>hominis</i>	17	7,52
sp.	10	4,42
<i>xylosus</i>	9	3,98
<i>warneri</i>	2	0,88
<i>simulans</i>	2	0,88
<i>chromogenes</i>	1	0,44
<i>sacharolyticus</i>	1	0,44
TOTAL	226	100

(0,88%) como *S. simulans*; 1 (0,44%) como *S. chromogenes* e 1 (0,44%) como *S. sacharolyticus*.

Dentre as espécies isoladas, o *Staphylococcus aureus* foi o mais prevalente dentro do gênero (49,1%), concordando com os achados de Costa et al. (1994, 1996), Langoni & Domingues (1998), Brabes (1999), Sá et al. (2000), Silva et al. (2000a, b) e Barbalho & Mota (2001) ressaltando-se a importância deste agente nas mastites, como responsável pela elevada contagem de células somáticas (CCS), redução na produção de leite e taxas de cura extremamente baixas. Embora existam algumas divergências com relação à frequência de bactérias isoladas no leite de vacas com mastite clínica e subclínica relatada na literatura (Ferreiro et al., 1981; Nader Filho et al., 1985; Langenegger et al., 1986; Vianni et al., 1992; Longo et al., 1994; Costa et al., 1995b; Silva, 1998), os *Staphylococcus* continuam sendo os agentes mais frequentemente isolados neste tipo de infecção, representando grande importância epidemiológica e clínica nas mastites bovinas.

A elevada freqüência de *S. aureus* observada tanto em propriedades com ordenha mecânica quanto em propriedades com ordenha manual, pode ser conseqüência da significativa ocorrência de *S. aureus* nas mãos dos ordenhadores e também nas ordenhadeiras mecânicas.

Além disso, é um microrganismo capaz de invadir e replicar-se no interior das células epiteliais da glândula mamária bovina, podendo este mecanismo levar a resultados falso-negativos nos exames bacteriológicos e influenciar na eficácia dos antibióticos utilizados no tratamento (Almeida et al., 1996). Sua presença no leite, além de levar ao aparecimento de mastites, indica um risco em potencial à saúde pública, principalmente quanto à formação de enterotoxinas termorresistentes que, se ingeridas, podem levar a toxinoses.

Os *Staphylococcus* coagulase negativa apresentaram freqüência de 28,3% (64/226), valor considerado superior entre os obtidos pelos seguintes autores: Nicolau (1994) (5,02%), Vargas et al. (1996) (11,65%), Vianni et al. (1992) (16,67%) e Langoni et al. (1991) (23,19%). Observa-se que a freqüência dos *Staphylococcus* coagulase negativa nos trabalhos pesquisados é bastante variável (5,02% a 23,19%), o que talvez possa ser explicado pelos critérios adotados na coleta das amostras. Pois, para alguns pesquisadores, é um organismo oportunista, habitante natural da pele do úbere, do canal do teto e também da glândula mamária, uma vez que esse agente foi isolado de leite proveniente de glândulas aparentemente saudáveis (Baba et al., 1980, citados por Watts, 1988) e casos novos de mastite por este agente surgem predominantemente no período seco (Oliver & Jayarao, 1995). Ressalta-se, entretanto, que Harmon & Langlois (1989) e Contreras et al. (1999) reconheceram a atividade mastitogênica deste patógeno “menor”.

Harmon & Langlois (1995) informaram que 48% das infecções por *Staphylococcus* coagulase negativa encontram-se em vacas cuja CCS estão

abaixo de 100.000 e somente 10% são encontradas em vacas com CCS acima de 500.000.

Chang & Huang (1995) testaram 338 cepas estafilocócicas e observaram que ao utilizar o protocolo da AOAC para interpretar os resultados, a sensibilidade e a especificidade do teste de coagulase para identificação de *S. aureus* foram 97,7% (204/213) e 95,2% (119/125), respectivamente. Quando as recomendações da APHA (1992) foram utilizadas, a sensibilidade foi levemente menor (95,8%). Entretanto, quando as recomendações de Bennett & Lancette (1995) foram usadas como referência, a sensibilidade reduziu para 96,7%, mas a especificidade aumentou para 96,8%.

A Figura 4 mostra a porcentagem de *Staphylococcus* plasma coagulase positivo e plasma coagulase negativo isolados das seis propriedades analisadas.

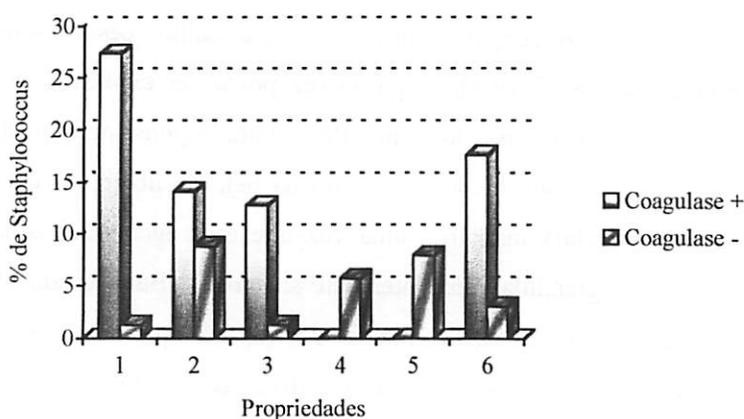


FIGURA 4 Porcentagem de *Staphylococcus* plasma coagulase positivo e plasma coagulase negativo isolados das amostras de leite por propriedades.

A Tabela 4 apresenta os resultados para testes de coagulase de *S. aureus* segundo recomendações da AOAC (1990). Se as recomendações pela APHA fossem adotadas neste estudo, ou seja, se somente os resultados coagulase 4+ fossem considerados para classificar uma colônia como *S. aureus*, 15,3% das colônias seriam interpretadas erroneamente, induzindo um grande número de resultados falso-negativos. A inclusão de testes adicionais, como o TNase, é reforçada, visto que muitos outros estafilococos podem ser coagulase positivo. Além disso, a tipagem de colônias atípicas em ágar Baird-Parker é obrigatória para a correta identificação de *S. aureus* em leite mastítico (Silva et al., 2000b).

Dentre os 226 isolados, 71,7% expressaram-se como estafilococos coagulase positiva e 28,3% como estafilococos coagulase negativa (Figura 5). Brito & Brito (1999), avaliando a microbiota isolada de amostras de leite obtidas de todos os quartos mamários em quatro rebanhos, verificaram que dos 136 isolados identificados como *Staphylococcus*, 65% foram coagulase positiva e 35% como coagulase negativa.

Segundo Pereira et al. (2000), estafilococos enterotoxigênicos são aqueles, na grande maioria produtores de coagulase e representados por *Staphylococcus aureus* que, quando presentes no alimento em número suficiente, sintetizam enterotoxinas que, ao serem ingeridas, após incubação de 1-4 horas, ocasionam sintomas de gastroenterites.

TABELA 4 Resultados para teste de coagulase de *Staphylococcus aureus* segundo recomendações da AOAC

Coagulase		
4+ ou 3+	2+ ou 1+	Total
94	17	111

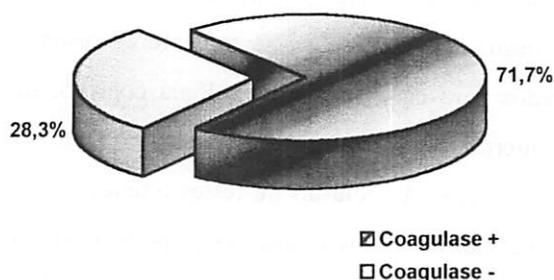


FIGURA 5 Porcentagem total de *Staphylococcus* sp. plasma coagulase positivo e plasma coagulase negativo isolados das amostras de leite estudadas

As infecções causadas por estafilococos coagulase negativa podem ser mais prevalentes do que aquelas causadas por *Staphylococcus aureus* ou patógenos ambientais, mas a severidade da inflamação é muito menor. Sears et al. (1993) informaram que, para propósitos de prevenção e controle em veterinária, os *Staphylococcus* coagulase positiva: *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* podem ser rotineiramente identificados como *S. aureus*. Se tal critério fosse adotado neste trabalho o percentual desta espécie passaria a ser de 71,7%, e não de 49,1%, conforme encontrado.

As provas mais freqüentes para diferenciar as espécies de estafilococos patogênicos são além de coagulase a prova de termonuclease (TNase). O método clássico para diferenciação de *S. aureus* utilizando primariamente o teste de coagulase é recomendado por vários autores (APHA, 1992; Chang & Huang, 1995; Su & Wong, 1995; ICMSF, 1998; Gay & Fox, 2001).

A Tabela 5 mostra os resultados para o teste da coagulase e termonuclease das 226 cepas identificadas como *Staphylococcus* isoladas em meio ágar sangue e Baird-Parker produzindo três diferentes perfis bioquímicos. Entre as colônias identificadas como *S. aureus* (111), 100% foram TNase

TABELA 5 Diferenças nas atividades bioquímicas quanto à coagulase e termonuclease dos isolados de *Staphylococcus* sp.

Coagulase/TNase	Propriedades					
	1	2	3	4	5	6
+/+	62	31	28	0	0	41
+/-	0	0	0	0	0	0
-/+	2	11	0	0	0	2
-/-	1	7	3	14	18	3

positiva, concordando com os achados de Langlois et al. (1990), os quais informaram que todas as cepas isoladas de leite foram coagulase e termonuclease positivas. Resultados inferiores foram obtidos por Bennet et al. (1986). Trabalhando com cepas isoladas de alimentos e ingredientes alimentares, estes autores informaram que 93% foram TNase positiva. Entretanto, Chang & Huang (1995) relataram que 99,5% das cepas produziram esta enzima. Harvey & Gilmour (1985) não isolaram cepas de *S. aureus*, a partir de leite cru, que apresentasse reação negativa no teste da TNase, mas positiva no teste de coagulase.

A análise da Tabela 5 mostra que, nas propriedades 4 e 5, predominaram espécies de estafilococos coagulase e termonuclease negativas. Estes microrganismos não são classificados como agentes ambientais ou contagiosos, sendo designados como “microbiota oportunista da pele do teto” de baixa patogenicidade (Fonseca & Santos, 2000). Nenhuma cepa identificada como *S. aureus* apresentou-se coagulase negativa, o que também foi observado por Langlois et al. (1990).

Um ponto que merece atenção é que o isolamento de estafilococos coagulase negativa em amostras de leite não significa, necessariamente, que haja

infecção da glândula mamária, mas sim que uma contaminação pode ocorrer no momento da coleta do leite (Brito & Brito, 1999).

5.1.5 Isolamento de *Streptococcus* sp.

Dentre as 414 bactérias isoladas e identificadas, 28 (6,76%) corresponderam ao gênero *Streptococcus* sp. Este valor encontra-se bem abaixo do citado pela literatura.

Os *Streptococcus* sp. são bastante prevalentes em levantamentos realizados no Brasil, com percentuais variando de 11,4% a 46,5% (Langnegger et al., 1970; Harrop et al., 1975; Ferreiro et al., 1981). Entretanto, identificando práticas de manejo associado com a contagem de células somáticas em vacas mastíticas, Khaitsa et al. (2000) não isolaram *Streptococcus agalactiae* de amostras do tanque de expansão.

Por anos, os estreptococos foram a causa bacteriológica mais prevalente da mastite. Ante o uso disseminado de antibióticos, especialmente na terapia da vaca seca, *Streptococcus agalactiae* foi a maior causa de mastite. A provável explicação para uma baixa contagem deste agente no presente trabalho pode ser a sua erradicação de muitos rebanhos leiteiros, uma vez que este microrganismo é suscetível aos antibióticos aplicados para controle desta infecção. Embora não tenha sido feito um levantamento do uso de antibióticos pelas propriedades analisadas depreende-se dos resultados que, provavelmente, os produtores de leite preocupavam-se com a situação e tentavam, de alguma forma, contornar o problema por meio do uso da antibioticoterapia.

Nocard & Mollereau em 1984 citam o isolamento deste agente etiológico da mastite bovina que mais tarde foi identificada como pertencente ao gênero *Streptococcus* sp. No Brasil, em 1931, *Streptococcus* sp. foi o primeiro gênero isolado em amostras de leite mastítico por Reis e Swenson (Costa et al., 1994).

Por ser encontrado principalmente no interior da glândula mamária, podendo ser isolado também de superfícies contaminadas com leite, sua transmissão ocorre principalmente durante o período da ordenha, cuja infecção manifesta-se, na grande maioria das vezes, na forma subclínica, desencadeando uma alta CCS (Fonseca & Santos, 2000).

5.1.6 Isolamento de *Listeria* sp.

Das 45 amostras de leite provenientes de vacas mastíticas, em nenhuma foi isolada *Listeria* sp., embora alguns testes bioquímicos efetuados fossem característicos, exceto para motilidade a 25°C.

A *Listeria* sp. tem despertado grande interesse no mundo científico e inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas para se verificar a presença deste patógeno em alimentos e, principalmente, de uma das fontes de contaminação, que pode ser o leite, proveniente de vacas mastíticas .

Langoni & Fonseca (1997), verificando o efeito do tempo de refrigeração e criopreservação concluíram que a maior frequência de isolamento de *L. monocytogenes* ocorreu na terceira semana de experimento com uma taxa de 0,88% quando as amostras de leite mastítico foram mantidas a -20°C; na quarta semana, foram isoladas somente 0,44%, para cada temperatura de conservação.

A não ocorrência deste agente nas amostras de leite analisadas não descarta a hipótese de sua presença nestas. Sabe-se, entretanto, que este microrganismo é considerado como um agente contaminante e não como um dos responsáveis pelo desenvolvimento de infecção intramamária. Isto poderia, talvez, explicar o fato de não ter sido isolada nas amostras analisadas.

Costa et al. (1986) obtiveram o isolamento de *Listeria* sp. em 0,09% de amostras de leite tipo B, provenientes de animais com infecção subclínica. Isto deve ser alarmante, pois o leite sem apresentar alterações de suas características,

o que já ocorre nas formas clínicas, pode ser consumido “in natura”, oferecendo sérios riscos ao consumidor.

Leal (1999), analisando 102 amostras de leite provenientes de 45 vacas mastíticas, verificou que somente em uma (0,98%) foi isolada *Listeria monocytogenes*. Este baixo índice de positividade assemelha-se aos resultados de Langoni & Fonseca (1997) que isolaram *L. monocytogenes* em 7,01% de 228 amostras de leite provenientes de mastite clínica e subclínica; destas somente 2,63% eram de leite de mastite subclínica. Jensen et al. (1996), na Dinamarca, também obtiveram um baixo índice deste microrganismo, que variou de 0,01 a 0,1% (média de 0,04%) em análises realizadas em vacas com mastite.

É importante esclarecer que, mesmo este patógeno sendo isolado em baixa incidência, a simples presença leva os pesquisadores e pessoas ligadas à saúde pública a se preocuparem ainda mais com esta espécie de microrganismo, pois o consumo de leite cru pode ser um veículo de transmissão da listeriose para o homem (Jay, 1992).

5.1.7 Isolamento de bacilos

Das cepas isoladas em meio ágar sangue e meio ABP e selecionadas para caracterização e identificação, 95 mostraram-se, no exame bacterioscópico, como bacilos gram-positivos.

5.1.7.2 Bacilos gram-positivos, catalase positiva, esporulados

Foram isoladas 51 cepas, representando 53,7% do total de bacilos isolados, todas caracterizadas e identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*. A Tabela 6 mostra a quantidade e porcentagem das diferentes espécies de *Bacillus* isoladas e identificadas nas amostras de leite coletadas.

TABELA 6 Espécies de *Bacillus* isoladas e identificadas nas amostras de leite provenientes de vacas mastíticas nas seis propriedades estudadas

Espécie	Quantidade	Porcentagem (%)
<i>Bacillus cereus</i>	3	5,9
<i>Bacillus</i> spp	31	60,8
<i>Bacillus subtilis</i>	17	33,3
Total	51	100

A porcentagem de *Bacillus* sp. encontrada neste trabalho é superior ao encontrado por Contreras et al. (1999), os quais isolaram somente 0,5% deste gênero em 538 amostras de leite.

Três espécies, *B. anthracis*, *B. cereus* e *B. subtilis*, foram isoladas de bovinos com infecções intramamárias (Jones & Turnbull, 1981). Entretanto, vários autores constataram que *Bacillus cereus* é considerado um agente incomum da mastite (Brown & Scherer, 1957; Schiefer et al., 1976; Jones & Turnbull, 1981).

O primeiro caso de ocorrência de mastite por *B. cereus* registrado (Brown & Scherer, 1957) foi atribuído à introdução do organismo durante o tratamento de uma infecção intramamária crônica quando uma seringa plástica foi usada pelo produtor para a infusão de uma solução de antibióticos. Posteriormente, foi observada a ocorrência de mastite por *B. cereus* em vários rebanhos na Califórnia quanto estes se encontravam envolvidos em programas de controle da mastite chamado terapia da vaca seca (Jasper et al., 1972). Em vários rebanhos ingleses leiteiros (Howell, 1972), a mastite ocasionada por *B. cereus* foi responsável pela morte de vacas com sintomas hemolíticos sistêmicos, sendo resíduos orgânicos utilizados na alimentação, como a fonte de um surto de mastite nos quais múltiplos casos ocorreram. Em um outro rebanho inglês, foi identificado como a causa de mastite gangrenosa, no qual três vacas morreram.

No Canadá, também foi isolado *B. cereus* como o responsável pela mastite aguda gangrenosa a qual foi diagnosticada em duas vacas leiteiras e em vários tecidos, levando à morte severa destes animais com sinais de toxemia (Schiefer et al., 1976).

Em um rebanho, cinco vacas foram tratadas para mastite usando um medicamento e, dentro de um dia, todas as vacas mostraram severo intumescimento do úbere. Quatro vacas foram infectadas por leveduras e *B. cereus* foi isolado do leite de uma vaca (González, 1996). Se *Bacillus* são encontrados no meio de cultura, recomenda-se que sejam cultivadas uma segunda vez se a vaca apresenta uma alta CCS ou um quadro de mastite clínica.

Barbalho & Mota (2001) obtiveram um percentual considerável nos isolamentos de *Bacillus* sp. (10,85%) e devem ser considerados, uma vez que podem estar envolvidos em casos de mastites fatais (Jones & Turnbull, 1981).

Bacillus sp. devem ser considerados como uma causa de infecção intramamária se o cultivo seqüencial de amostras é puro e com concomitante altas CCS ou sinais clínicos de doença do úbere. De acordo com González (1996), se colônias apresentam-se largas, achatadas, cinzas e com uma ampla zona de hemólise, *B. cereus* deve ser esperado.

5.1.7.3 Bacilos gram-positivos, catalase positiva, não esporulados

Foram identificados 39 bacilos (41% do total de bacilos isolados, 9,42% do total de microrganismos isolados) como pertencentes ao gênero *Corynebacterium*. As proporções obtidas são compatíveis com os resultados de Costa et al. (1995a), tanto em número, quanto em importância da presença do referido gênero.

A espécie lipolítica *Corynebacterium bovis* é freqüentemente isolada de amostras de leite em muitos rebanhos leiteiros, o qual está associado com formas brandas de inflamação mamária. Uma CCS levemente elevada é, usualmente, a

única manifestação desta infecção (Hommeiz et al., 1999). A transmissão desse patógeno ocorre, principalmente, no momento da ordenha e, portanto, uma alta incidência de *C. bovis* em um rebanho indica deficiência na desinfecção dos tetos após a ordenha (Fonseca & Santos, 2000).

Examinando 43 vacas em lactação totalizando 104 quartos mamários positivos ao CMT, Barbalho & Mota (2001) isolaram *Corynebacterium* sp. (27,91%), em uma frequência relativamente alta, no leite dos animais estudados. Ao estudarem a etiologia bacteriana da mastite bovina, por meio do exame microbiológico, Costa et al. (1986) observaram que, em 2.533 amostras de leite fizeram-se presentes 30,67% de *Corynebacterium* sp., além de outros microrganismos. Em um outro estudo também desenvolvido por Costa et al. (1994) a partir de 11.189 amostras, a porcentagem de *Corynebacterium* sp. foi de 24,46%. Essa variação talvez possa ser entendida, em parte, pela diferença existente na susceptibilidade genética dos animais e, ainda, pela ação do próprio homem que tem interferido combatendo os patógenos clássicos causadores de mastite, permitindo que outros organismos prevaleçam, se instalem e provoquem doenças. Por outro lado, deve-se considerar que essa bactéria encontra-se em animais aparentemente saudáveis (Costa et al., 1995a) e, de acordo com Blood & Radostidis (1991), as medidas higiênicas interferem na prevalência dessa agente, já que o mesmo é bastante sensível a desinfetantes.

Na caracterização deste grupo bacteriano, observou-se que o gênero *Corynebacterium* foi isolado somente do meio ágar sangue contendo 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Este fato provavelmente está associado à facilidade de crescimento em ágar rico em nutrientes apresentada por estas bactérias.

5.1.7.4 Bacilos gram-positivos, catalase negativa, não esporulados, produtores de ácido sem gás.

Das 95 cepas de bacilos isolados, 5,26% foram caracterizadas como sendo bacilos gram-positivos catalase negativa. Neste grupo foram caracterizados os lactobacilos, sendo 4 (80%) provenientes do ágar sangue e 1 (20%) do meio ABP. Esta pequena porcentagem concorda com os achados de Costa et al. (1986), os quais verificaram que 5,64% (142/2.533) das amostras de leite de vacas mastíticas correspondiam a vários microrganismos isolados, entre eles o gênero *Lactobacillus* sp.

Nas diversas literaturas consultadas, a ocorrência de mastite em rebanhos leiteiros ocasionada por *Lactobacillus* sp. não é preocupante, sendo a sua presença como parte da microbiota epífita do leite.

6 Conclusões

Diante das condições nas quais este estudo foi realizado, e da técnica utilizada, os resultados obtidos permitem concluir que:

- as contagens de microrganismos mesófilos encontrados nesse estudo foram elevadas em muitas propriedades, independente da ordenha empregada por cada produtor, podendo comprometer a qualidade dos derivados lácteos;
- os resultados bacteriológicos mostraram o *Staphylococcus* sp., (54,6%), como o gênero predominante isolado das mastites subclínicas, sendo o *S. aureus*, (26,8%), a espécie mais identificada. Na segunda posição apareceram os bacilos gram-positivos (22,9%). Os *Staphylococcus* coagulase negativa (15,5%) apareceram na seqüência em terceiro lugar, obtendo-se para a espécie *S. epidermidis*, 5,3%. Os *Streptococcus* sp., (6,76%), e os coliformes, (13,5%), apresentaram também uma participação efetiva nos processos infecciosos da glândula mamária; o isolamento de *Corynebacterium* sp., (9,42%) constituiu um aspecto relevante;
- tanto os agentes contagiosos quanto os ambientais estão contribuindo para as infecções intramamárias;
- a freqüência relativamente alta de *E. coli* (8,9%) indica uma pobre condição higiênico-sanitária executada pelos produtores durante a obtenção do produto;
- embora não tenha sido isolado *Listeria monocytogenes*, não se pode afirmar a sua ausência nas amostras estudadas.

7 Referências Bibliográficas

AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C.; ROSDAHL, V. T.; JENSEN, N. E. Staphylococcal and other bacterial species associated with intramammary infections in Danish dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Copenhagen, v. 36, n. 4, p. 475-487, 1995.

ALMEIDA, R. A.; MATTHEWS, E. C.; GUIDRY, A. J.; OLIVER, S. P. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 79, n. 6, p. 1021-1026, June 1996.

ALMEIDA, R. A.; OLIVER, S. P. Invasion of bovine mammary epithelial cells by *Streptococcus dysgalactiae*. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 78, n. 6, p. 1310-1317, June 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: Marvin L. Speck Editor, 1992.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). *Staphylococcus aureus* in foods. In: HELRICH, K. (Ed.). *Official Methods of Analysis of the Association of Official analytical Chemistry*. 15. ed. Arlington, 1990.

BARBALHO, T. C. F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Rio de Janeiro, n. 2, p. 31-36, 2001.

BARKER, A. R.; SCHRICK, F. N.; LEWIS, M. J; DOWLEN, H. H.; OLIVER, S. P. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of jersey cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 81, n. 5, p. 1285-1290, May 1998.

BARROW, P. A.; HILL, A. W. The virulence characteristics of strains of *Escherichia coli* isolated from cases of bovine mastitis in England and Wales. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 35-48, May 1989.

BENNETT, R. W.; LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: *Bacteriological analytical manual*. 8. ed. Gaithersburg. 1995. p. 12. 01-12. 05.

BENNET, R. W.; YETERIAN, M.; SMITH, W.; COLES, C. M.; SASSAMAN, M.; McCLURE, F. D. *Staphylococcus aureus* identification characteristics and toxicogenicity. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 51, n. 5, p. 1337-1339, Sept./Oct. 1986.

BERGDOLL, H. S. *Staphylococcus aureus*. **Journal of the Association of Official Analytical Chemistry**, Gainesville, v. 74, n. 4, p. 706-710, July/Aug. 1991.

BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1990. 1324 p.

BLOOD, D. C.; RADOSTITIS, O. M. **Clínica veterinária**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 15, p. 424-463.

BRABES, K. C. S. **Deteção de *Staphylococcus* sp. e suas enterotoxinas em leite proveniente de bovinos leiteiros com mastite**. 1999. Dissertação (Mestrado em Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BRADLEY, A. J.; GREEN, M. J. Adaptation of *Escherichia coli* to the bovine mammary gland. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 5, p. 1845-1849, May 2001.

BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J.; FOX, L. K.; HARMON, R. J.; HOGAN, J. S. S.; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P.; SMITH, K. L.; SORDILLO, L. M. **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison: National Mastitis Council, 1996. 64 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1. p. 13-22.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC ANVISA/MS n.º 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. **Diagnóstico microbiológico da mastite.** Juiz de Fora: EMBRAPA, 1999. 26 p. (EMBRAPA. Circular Técnico, 55)

BROWN, R. W.; SCHERER, R. K. Report of two cases of acute mastitis caused by *Bacillus cereus*. **Cornell Veterinary**, Ithaca, v. 47, p. 226, 1957.

CARTER, G. R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária.** São Paulo: Roca, 1988.

CENTORBI, O. N. P.; CUADRADO, A. M. A.; ALCARAZ, L. E.; LACIAR, A. L.; MILAN, M. C. Prevalência de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis subclínica bovina en tambos de la cuenca lechera de la ciudad de San Luis. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 24, p. 73-80, 1992.

CHANG, T. C.; HUANG, S. H. Evaluation of coagulase activity and protein A production for the identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 8, p. 858-862, Aug. 1995.

CONTRERAS, A.; PAAPE, M. J.; MILLER, R. H. Prevalence of subclinical intramammary infection caused by *Staphylococcus epidermidis* in a commercial dairy goat herd. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 203-208, Feb. 1999.

CORREA, M. G. P.; CORRÊA, I.; MARTIN, J. M.; LEMOS, A. M. Análise de linhagens de *Escherichia coli* isoladas do "leite bovino mastítico". **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v. 54, n. 316, p. 41-46, set./out. 2000.

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

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; CARCIOFI, A. C.; MELVILLE, P. A.; PRADA, M. S.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. Survey on the etiology of intramammary infections in dairy cattle. In: CONGRESSO MUNDIAL DE BUIATRIA, 18., 1994, Bolonha. **Proceedings... Bolonha**, 1994. p. 60.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A.; PARDO, R. B.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. Estudo epidemiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 4, p. 156-158, jul./ago. 1995a.

COSTA, E. O.; COUTINHO, S. D. A.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C. M. Etiologia bacteriana da mastite bovina no Estado de São Paulo. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 107-112, abr./jun. 1986.

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; VIANI, F. C.; WHITE, C. R. Prevalence of intramammary infection in primigravid Brazilian dairy heifers. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 151-155, Dec. 1996.

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A. A.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; WHITE, C. R.; PARDO, R. B. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 5, p. 215-217, set./out. 1995b.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; MELVILLE, P. A. Infection bovine mastitis caused by environmental organisms. **Journal of Veterinary Medicine B**, Berlin, v. 45, n. 2, p. 65-71, Mar. 1998.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; SILVA, L. A. B.; GARINO Jr, F.; BENITES, N. R.; HORIUTI, A. M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira**, ano II, n. 2, mar./abr. 1999.

DÖPFER, D.; ALMEIDA, R. A.; LAM, T. J. G. M.; NEDERBRAGT, H.; OLIVER, S. P.; GAASTRA, W. Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 4, p. 331-343, June 2000.

FAGLIARI, J. J.; ET AL. Mastite bovina: comparacao entre os resultados obtidos pelo "California Mastitis Test" e o exame bacteriológico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 35, n. 3, p. 310-315, maio/jun. 1983.

FERNANDES, J. C. T. Agentes etiológicos de mastite bovina no RS no período de 1972-1989. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 20, p. 151-163, 1992.

FERREIRO, L.; SANTOS, E. C. dos; SILVA, N. da Ocorrência e etiologia da mastite bovina na "Zona da Mata" do estado de Minas Gerais. **Arquivo da Escola de Veterinária UFMG**, Belo Horizonte, v. 33, n. 1, p. 31-37, jan./fev. 1981.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA **Bacteriological aAnalytical manual for foods**. 7. eEd. Washington: Association of Official and Analytical Chemistry, 1995.

FOX, L. K.; GAY, J. M. Contagious mastitis. **The Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 257-295, 1993.

FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus*, isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 315-319, out./dez. 1990.

FURLANNETO, S. M. P.; NADER FILHO, A.; WILSON, D. et al. *Staphylococcus aureus* enterotoxigêncios isolados a partir de leite de vacas mastíticas. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 138-143, abr./jun. 1987.

GAY, J. M.; FOX, L. K. *Staphylococcus aureus* detection: does the STAPH-AB test fit? Disponível em: <<http://www.edu.biotech/worksnop/activity/act16/annexd3.htm>>. Acesso em: jan. 2001.

GONZALEZ, R. N. *Prototheca*, Yeast, and *Bacillus* as a cause of mastitis. In: ANNUAL MEETING OF NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 35., 1996, Madison. **Proceedings...** Madison, 1996. p. 82.

GREEN, M. J.; GREEN, L. E.; MEDLAEY, G. F.; SCHULKLEN, Y. H.; BRADLEY, A. L. Influence of dry period bacterial intramammary infection on clinical mastitis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 10, p. 2589-2599, Oct. 2002.

HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. **Agri-Practice**, Santa Barbara, v. 10, p. 29, 1989.

HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. In: ANNUAL MEETING OF NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 34., 1995, Arlington. **Proceedings....** Arlington: National Mastitis Council, 1995. p. 56-67.

HARROP, M. H. V.; PAREIRA, L. J. G.; BRITO, J. R. F. ET AL. Incidência de mastite bovina na bacia leiteira da zona do agreste meridional de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira Serie Veterinária**, Brasília, v. 10, p. 65-67, 1975.

HARVEY, J.; GILMOUR, A. Application of current methods for isolation and identification of Staphylococci in raw bovine milk. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 207-221, 1985.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, O. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams and Wikins, 1994. 787 p.

HOWELL, D. Survey of mastitis caused by environmental bacteria. **Veterinary Record**, London, v. 90, n. 23, p. 654, Dec. 1972.

HOMMEZ, J.; DEVRIESE, L. A.; VANNCHOUTTE, M.; RIEGEL, P.; BUTAYE, P.; HAESBROUCK, F. Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 6, p. 954-957, Apr. 1999.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOLOGICAL SOCIETIES - ICMSF. **Microbiologia de los alimentos: características de los patógenos microbianos**. Zaragoza, Espanha: Acribia, 1998. 606 p.

JASPER, D. E.; BUSHNELL, R. B.; DELLINGER, J. D.; STANG, A. M. Bovine mastitis due to *Bacillus-cereus*. **Journal American Veterinary Medicine Association**, Shaumburg, v. 160, n. 5, p. 750, 1972

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. ITP, 5. ed. 1992. 661 p.

JENSEN, N. E.; AARESTRUP, F. M.; JENSEN, J.; WEGENER, H. C. *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis. Possible implication for human health. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 32, n. 1-2, p. 209-216, Sept. 1996.

JONES, T. O.; TURNBULL, P. C. B. Bovine mastitis caused by *Bacillus cereus*. **Veterinary Record**, London, v. 108, n. 13, p. 272-274, 1981.

KHAITSA, M. L.; WITTUM, T. E.; SMITH, K. L.; HENDERSON, J. L.; HOBLET, K. H. Herd characteristics and management practices associated with bulk-tank somatic cell counts in association programs in Ohio. **American Journal of Veterinary Research**, Shaumburg, v. 61, n. 9, p. 1092-1098. Sept. 2000.

KIRK, J. H. Diagnosis and treatment of difficult mastitis cases. In: ANNUAL MEETING OF NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 31., 1992, Madison. **Proceedings...** Madison: National Mastitis Council, 1992. p. 26-38.

LANGENEGGER, J. et al. Eficácia terapêutica do cefacetile frente aos microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* isolados de mastites clínicas. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 5, n. 30, p. 24-27, mar./abr. 1986.

LANGENEGGER, J.; COELHO, N. M. C.; LANGENEGGER, C. H. ET AL. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira - Serie Veterinária**, Brasília, v. 5, p. 437-440, 1970.

LANGLOIS, B. E.; PARLIDUNGAN, A. K.; HARMON, R. J.; AKRES, K. Biochemical characteristics of *Staphylococcus* species of human and bovine origin. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 2, p. 119-126, Feb. 1990.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F. Prevalência da mastite bovina e sua distribuição por quartos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 85-87, jan./fev. 1998.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P. F.; PINTO, M. P.; LISTONI, F. J. P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 43, n. 6, p. 507-515, nov./dez. 1991.

LANGONI, H.; LARANJA DA FONSECA, T. H. P. Participação da *Listeria monocytogenes* na mastite bovina. Importância para a saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 50, p. 36-38, jul./ago. 1997.

LEAL, D. D. M. Caracterização e identificação de *Listeria monocytogenes* e bactérias gram negativas em mastite clínica e subclínica. 1999. Dissertação (Mestrado em Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

- LERCHE, M. **Inspeccion veterinária de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1969. p. 129-132.
- LONGO, F. et al. Quelques données épidémiologiques sur les mammites subcliniques de la vache laitière. **Revue de Médecine Veterinaire**, Toulouse, v. 145, n. 1, p. 43-47, Jan. 1994.
- MacFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. 527 p.
- MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F. C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 9, p. 2812-2823, Sept. 1993.
- MIWA, N.; KAWAMURA, A.; MASUDA, T.; AKIYAMA, M. An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction-negative *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 361-366, Mar. 2001.
- MORETI, A.; PASQUALI, P.; MENCARONI, G.; BONCIO, I.; PIERGILI FIORETTI, D. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria). **Journal of Veterinary Medicine, series B**, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 129-132, Apr. 1998.
- NADER FILHO, A.; ROSSI JR., O. D.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em leite de vacas com mastite subclínica. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 19, p. 369-373, 1988.
- NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; ROSSI JUNIOR, O. D.; ET AL. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Brasília, v. 5, n. 2, p. 53-56, abr./jun. 1985.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL **Current concepts of bovine mastitis**. 4 ed. Madison, 1996. 64 p.
- NEMETH, J.; MUCKLE, C. A.; GYLES, C. L. In vitro comparison of bovine mastitis and fecal *Escherichia coli* isolates. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 40, n. 3/4, p. 231-238, June 1994.

NICOLAU, E. S. **Influência da mastite subclínica bovina causada por *Staphylococcus coagulase positiva* e *Staphylococcus coagulase negativa* sobre a qualidade e a quantidade do leite secretado pelos quartos afetados.** 1994. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP.

NOCARD & MOLLEREAU, 1974. In: GIESECKE, W. H.; VAN DEN HEEVER, L. V. The diagnosis of bovine mastitis with particular reference to subclinical mastitis: a critical review of relevant literature. **Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 41, n. 8, p. 169-212, Aug. 1984.

OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M. Coagulase-negative *Staphylococcus* species intramammary infections in heifers and cows during the nonlactating and peripartum periods. In: ANNUAL MEETING OF NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 34., 1995, Madison. **Proceedings...** Madison: National Mastitis Council, 1995. p. 68-77.

PEREIRA, M. L.; PEREIRA, J. L.; SERRANO, A. M.; BERGDOLL, M. S. Estafilococos: até onde sua importância em alimentos? **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 44, n. 68/69, p. 32-41, jan./fev. 2000.

PICININ, L. C. A.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CAMARGOS, C. R. M. Qualidade microbiológica e pesquisa de inibidores em leite cru resfriado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, n. 321, jul./ago. 2001.

POLITIS, I.; HIDIROGLOU, N.; WHITE, J. H.; GILMORE, J. A.; WILLIAMS, S. N.; SCHERF, H.; FRIGG, M. Effects of vitamin E on mammary and blood leucocyte function, with emphasis on chemotaxis, in periparturient dairy cows. **Animal Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 4, p. 468-471, 1996.

POURCHER, A. M.; DEVRIESE, L. A.; HERNANDEZ, J. F. et al. Enumeration by a miniaturized method of *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis* and enterococci as indicators of the origin of faecal pollution of waters. **Journal of Applied Environmental Bacteriology**, Oxford, v. 70, n. 6, p. 525-530, June 1991.

RIEDNER, S. et al. Prevalência de mastite em dois tanques de Santa Maria-RS. **Revista do Centro de Ciência Rural**, Santa Maria, v. 17, n. 3, p. 261-273, 1987.

SÁ, M. E. P.; MOTA, R. A.; SOUZA, M. I.; OLIVEIRA, A. A. F. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 2, p. 100-103, maio/ago. 2000

SABIONI, J. G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J. L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo minas em Ouro Preto (MG), 1992. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 33, p. 22-23, set./out. 1994.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, B. S. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 130, n. 5, p. 199-207, May 1957.

SCHIEFER, B.; MACDONALD, K. R.; KLAVANO, G. G.; VAN DREUMEL, A. A. Pathology of *Bacillus cereus* mastitis in dairy cows. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 17, n. 9, p. 239, Sept. 1976

SEARS, P. M. et al. Procedures for mastitis diagnosis and control. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 445-468, 1993.

SHPIGEL, N. Y.; WINKLER, M.; ZIV, G.; SARAN, A. Clinical bacteriological and epidemiological aspects of clinical mastitis in israeli dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 1-9, Apr. 1998a.

SHPIGEL, N. Y.; WINKLER, M.; ZIV, G.; SARAN, A. Relationship between in vitro sensitivity of coliform pathogens in the udder and the outcome of treatment for clinical mastitis. **Veterinary Record**, London, v. 142, n. 6, p. 135-137, Feb. 1998b.

SHUSTER, D. E.; LEE, E. K.; KEHRLI JR, M. E. Bacterial growth, inflammatory cytokine production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in periparturient versus midlactation cows. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 57, n. 11, p. 1569-1575, Nov. 1996.

SISCHO, W. M; HEIDER, L. E.; MILLER, G. Y.; MOOREE, D. A. Prevalence of contagious pathogens of bovine mastitis and use of mastitis control practices. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 202, n. 4, p. 285-600, Feb. 1993.

SILVA, B. O.; ANDRADE FILHO, R.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. Avaliação microbiológica de leite submetido à coleta a granel e termização. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 55, n. 315, jul./ago. 2000a.

SILVA, M. C. D.; VILARDI, T. C. C.; TIBANA, A. Avaliação de métodos para a detecção de *Listeria* em queijos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 150-155, maio/jul. 1998.

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

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Identification and purification of new staphylococcal enterotoxin H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1438-1443, Apr. 1995.

VARGAS, A. C.; LAZZARI, A.; DUTRA, V.; WEISS, L. H. N.; FERREIRA, G. L.; FLORES, L. A. S. Agentes infecciosos mais prevalentes em mastite bovina na região de Santa Maria, RS – Perfil de sensibilidade *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24., 1996, Goiânia. **Anais. . .** Goiânia: Sociedade Goiana de Medicina Veterinária, 1996. p. 119.

VIANNI, M. C. E. et al. Frequência de isolamento de *Staphylococcus coagulase* positiva e coagulase negativa na mastite subclínica em bovinos e sua influência na produção láctea. **Arquivo da Universidade Federal Rural RJ**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 187-192, 1992.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 41-66, Jan. 1988.

WILSON, D. J.; DAS, H. H.; GONZALES, R. N. et al. Association between management practices dairy herd characteristics and somatic cell count of bulk tank milk. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 210, n. 10, p. 1499-1502, May 1997.

WEISS, M. P.; HOGAN, J. S.; SMITH, K. L. Here's the latest on vitamin E and selenium. **Hoards Dairyman**, Atkinson, v. 143, n. 8, p. 329, Apr. 1998.

CAPÍTULO 3

Avaliação da diversidade genética de *Staphylococcus aureus* isolados de leite proveniente de vacas mastíticas

1 Resumo

OLIVEIRA, Roberto Maciel de. **Avaliação da diversidade genética de *Staphylococcus aureus* isolados de leite proveniente de vacas mastíticas***. Lavras: UFLA, 2003. 143p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos).

Staphylococcus aureus é o microrganismo isolado com elevada freqüência em leite de animais mastíticos. O principal reservatório de *S. aureus* parece ser o quarto infectado e a transmissão entre vacas usualmente ocorre durante a ordenha, embora outras fontes de *S. aureus* no rebanho leiteiro têm sido informadas. O presente trabalho teve como objetivo estudar a diversidade genética de 20 isolados de *S. aureus* provenientes de leite bovino com mastite subclínica, escolhidos aleatoriamente. Os 20 isolados obtidos de seis diferentes propriedades leiteiras na Região de Lavras foram identificados bioquimicamente pelo sistema API-STAPH, sendo então submetidos à extração do DNA para realização da técnica de RAPD com a finalidade de identificação molecular. A análise do dendograma construído permitiu a divisão dos isolados em 10 grupos, de acordo com seus perfis de DNA. Observou-se que nenhum isolado se mostrou idêntico a outro, o que revelou uma variabilidade muito grande entre as cepas. Um grupo, constituído pelos isolados 4 e 9, provenientes de uma mesma propriedade leiteira, apresentou um coeficiente de similaridade de somente 23%, contrastando com os isolados 7 e 8, também provenientes de uma mesma propriedade, mas com índice de similaridade de 73%. Concluiu-se que os isolados de *S. aureus* revelaram alta variabilidade entre si por meio dos coeficientes de similaridade.

*Orientadora: Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

2 Abstracts

OLIVEIRA, Roberto Maciel de. **Evaluation of the genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolates of milk from mastitic cows**^{*}. Lavras: UFLA, 2003. 143p. (Thesis - Doctorate in Food Science).

Staphylococcus aureus is the microorganisms most often isolated in milks of mastitic animals. The main reservoir of *S. aureus* seems to be the infected quarter and the transmission between cows usually takes place during milking, although other sources of *S. aureus* in the dairy herd have been informed. The present work was designed to study the genetic diversity of 20 *S. aureus* isolates, chosen randomly, isolated from cattle wit subclinical mastitis. The 20 *S. aureus* isolates obtained from six different dairy farms in the region of Lavras, were biochemically identified by the API-STAPH system, then they were submitted to DNA extraction for the accomplishment of the RAPD technique for molecular identification. The analysis of the built dendrogram enabled the division of the isolates into ten groups according to the DNA profiles. It was found that no isolate proved identical to the other, which revealed a very great variability among the strains. One group, made up of isolates 4 and 9, from a same dairy farm, presented a similarity coefficient of only 23%, contrasting with isolates 7 and 8, also from a same farm, but with a similarity index of 73%. It follows that the *S. aureus* isolates revealed a high variability between each other though the similarity coefficients.

^{*}Adviser: Professor Ds. Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA

3 Introdução

A identificação de microrganismos patogênicos é importante para o estudo, prevenção e controle de doenças de origem alimentar. A busca de métodos confiáveis e rápidos para a identificação de grupos específicos de microrganismos em alimentos tem aumentado muito. Avanços científicos na tecnologia de diagnósticos e na instrumentação, na década passada, resultaram em uma grande variedade de testes enzimáticos e bioquímicos para a identificação de espécies de bactérias (Jayarao et al., 1996).

A identificação correta dos estafilococos de origem bovina é essencial para pesquisadores e clínicos. Esquemas bioquímicos simplificados têm sido desenvolvidos e estão disponíveis para uso laboratorial. Entretanto, a precisão destes sistemas para a identificação de estafilococos de origem bovina pode não ser adequada, principalmente para propósitos de pesquisa (Matthews & Oliver, 1994)

Aarestrup (1995) considerou que a identificação de patógenos de mastite em espécies é importante por várias razões: primeiro, porque os procedimentos de controle e de erradicação da mastite dependem do tipo de infecção prevalente no rebanho. Segundo, porque padrões de suscetibilidade antimicrobiana deveriam ser determinados para os agentes microbianos predominantes no rebanho e, terceiro, porque a validade das investigações epidemiológicas para determinação dos padrões de transmissão ou do impacto de fatores de manejo e ambientais depende do diagnóstico bacteriológico correto.

Os métodos clássicos de diagnóstico microbiológico são baseados em características fenotípicas, em que se observam a morfologia, as propriedades de coloração e a habilidade de espécies microbianas de crescer em um dado conjunto de condições ambientais definidas. Já os métodos moleculares

baseiam-se no princípio de que o genoma de cada indivíduo é único (van Belkum et al., 1995).

A diferenciação de cepas é de extrema relevância no estudo epidemiológico de doenças infecciosas e o advento da biologia molecular tem possibilitado a caracterização de pontos distintos da cadeia de transmissão dessas enfermidades. Nesse sentido, um marcador epidemiológico deve ser capaz de discriminar isolados não relacionados, bem como classificar cepas relacionadas em um mesmo grupo epidemiológico. Da mesma forma, há grande importância na identificação de cepas com propriedades especiais como aumento na virulência ou na habilidade de disseminação (Frenay et al., 1996, Lange et al., 1999). Além disso, deve ser relativamente barato e fácil de aplicar a um grande número de cepas (Aarestrup et al., 1995).

Alguns autores têm mostrado que em diferentes países somente uns poucos clones de *S. aureus* são responsáveis pela maioria dos casos de mastite bovina e que estes clones apresentam uma ampla distribuição geográfica (Matthews et al., 1994; Fitzgerald et al., 1997; Myllys et al., 1997; Lange et al., 1999; Annemüller et al., 1999; Akineden et al., 2001; Stephan et al., 2001).

Diversos trabalhos têm demonstrado a presença de um número limitado de cepas de *S. aureus*, diferentes geneticamente, dentro de um mesmo rebanho afetado por mastite (Matthews et al., 1994; Aarestrup et al., 1995; Lam et al., 1996).

Para Aarestrup et al. (1995) o fato de determinados genótipos de cepas de *S. aureus* predominarem nas infecções das glândulas mamárias de bovinos poderia indicar que estas cepas têm características que as tornam mais capazes de infectar as glândulas ou de causar mastite de longa duração. Ainda segundo estes autores, isto poderia refletir a presença de certos fatores de virulência destas cepas que as tornariam mais aptas para invadir a glândula mamária, resistindo, ou ainda, suprimindo os mecanismos de defesa do animal. Para Lam

et al. (1996), a presença destes fatores de virulência também poderia refletir diferenças na ecologia de *S. aureus* no reservatório extramamário e na glândula mamária.

Visto a existência de uma heterogeneidade genética considerável em populações naturais de *S. aureus* (Tenover et al., 1994; Kapur et al., 1995), esta pode ser explorada para investigar a disseminação de cepas de *S. aureus* de origens humana e animal. A avaliação desses traços heterogêneos tem incluído: as variações das características bioquímicas e de sensibilidade a antibióticos, a fagotipagem, o perfil da presença de plasmídeos, o estudo das regiões variáveis dos genes da coagulase, da região X da proteína A e do espaçador intergênico entre as regiões 16S e 23S do RNA ribossomal, a amplificação aleatória de segmentos genômicos (RAPD-PCR) e a macrorrestrição do DNA celular total detectada pela eletroforese de campo pulsado (Myllys et al., 1997; Fitzgerald et al., 1997; Annemüller et al., 1999; Pereira et al., 2002). No entanto, embora haja diferentes métodos para a tipagem de isolados de *S. aureus*, nem todos apresentam eficiência equivalente no que diz respeito às suas capacidades discriminatórias.

A aplicação de técnicas baseadas em PCR teve impacto revolucionário sobre o diagnóstico de doenças infecciosas. Estas técnicas permitem a detecção e a análise de quantidades muito pequenas de DNA ou de RNA sendo, portanto, altamente sensíveis e específicas (Lin et al., 1996; Joo et al., 2001).

Wilson et al. (1991) relataram que o PCR oferece a possibilidade de amplificação específica dos genes responsáveis pela produção das enterotoxinas estafilocócicas (SE). Esta técnica permite, portanto, a detecção do potencial de produção de enterotoxinas em células que não sintetizam a toxina em laboratório e em células mortas. Estas últimas são importantes em alimentos submetidos a um processamento térmico, em que as células de *S. aureus* podem estar mortas,

mas SE pode estar presente. Cepas produtoras lentas de enterotoxinas podem ser detectadas por este método.

Entre as técnicas baseadas na reação de polimerização em cadeia (PCR), o RAPD (random amplified polymorphic DNA) tem se tornado uma importante ferramenta para o diagnóstico em microbiologia devido à sua excelente capacidade discriminatória.

De acordo com van Belkum et al. (1995), RAPD tem se mostrado uma técnica rápida e que oferece resultados válidos epidemiologicamente. Entretanto, sua reprodutibilidade interlaboratorial é questionada e necessita ser melhorada, uma vez que pode ser afetada por fatores tais como a concentração de Mg^{2+} , métodos de extração de DNA, concentração de iniciadores, modelo do termociclador e concentração de *Taq* polimerase, embora a sensibilidade desta técnica seja maior do que outras técnicas de tipagem conhecidas (Wang et al., 1993; van Leeuwen et al., 1999).

Embora o RAPD tenha sido utilizado com sucesso para a subtipagem de várias espécies de bactérias, Jayarao et al. (1996) citam que o uso de diferentes “primers”, protocolos de amplificação modificados, variadas condições de eletroforese e, o mais importante, a falta de um sistema simplificado para interpretar os padrões formados, tem dificultado a comparação dos resultados de diferentes laboratórios e retardado a adoção desta técnica para a subtipagem de bactérias. A falta de consenso sobre qual o “primer” a ser utilizado levou à proliferação incontrolada de “primers” arbitrários, tornando difícil para os pesquisadores determinarem o “primer” ideal.

Matthews et al. (1997) estudaram a diferenciação entre *S. aureus* coagulase positivos e coagulase negativos, isolados de glândulas de vacas com mastite, por meio de RAPD, utilizando o “primer” OPA-7. Estes autores concluíram que a tipagem através do DNA apresentou bom poder

discriminatório e que esta é uma técnica rápida e precisa, eliminando a variabilidade associada com as técnicas convencionais.

A importância da espécie *S. aureus* na incidência de infecções intramamárias justifica o desenvolvimento e aplicação de técnicas de caracterização de suas diferentes linhagens. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o grau de diversidade genética de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas e previamente identificadas por métodos fenotípicos, de leite de vacas mastíticas provenientes de seis propriedades leiteiras da região de Lavras, MG, utilizando o método RAPD (random amplified polymorphic DNA, ou amplificação aleatória de DNA polimórfico).

4 Material e Métodos

4.1 Obtenção dos isolados

Foram selecionados, aleatoriamente, 20 isolados de *Staphylococcus aureus* provenientes das seis propriedades leiteiras avaliadas. Os isolados 1 e 2 originados da propriedade A; 3, 6, 7 e 8 da propriedade B; 4 e 9 da propriedade C; 5 e 10 da propriedade D; 11 e 13 da propriedade E e o isolado 12 da propriedade F. Todos os isolados utilizados neste trabalho já haviam sido caracterizados quanto ao seu comportamento morfológico (Gram), bioquímico (catalase, coagulase e TNase) e fenotípico, com o auxílio do sistema de identificação API-STAPH (BioMérieux).

4.2 Caracterização genotípica

4.2.1 Extração e purificação do DNA cromossômico

A extração do DNA seguiu a metodologia descrita por Coutinho (1995) com algumas modificações. Os isolados de *S. aureus* foram inoculados em tubos de ensaio contendo 40 mL de BHI (brain heart infusion broth). A incubação foi feita a 37°C por 24 horas, sendo então as culturas transferidas para tubos e centrifugadas por 3 minutos a 12.000 rpm em uma centrífuga, e o sobrenadante descartado. As células foram suspensas em 4,0 mL de solução TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e EDTA 1mM) e 800 µL lisostafina (20 mg/mL - Sigma). A lise das células foi feita primeiramente a 37°C por 45 minutos e centrifugadas por 3 minutos a 12.000 rpm, tendo o sobrenadante sido descartado. Posteriormente, adicionaram-se 200µL de Tris-HCl (100 mM, pH 8,0), 400 µL de EDTA (0,5 M, pH 8,0), 120µL de NaCl 5M, 80µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% e 36µL de proteinase K (20 mg/mL) e incubadas a 50°C até o clareamento da suspensão (aproximadamente uma hora).

A purificação do DNA foi realizada em duas extrações com fenol:clorofórmio (1:1) na suspensão de células lisadas, acrescentando-se 4 mL da mistura de fenol:clorofórmio e centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos a 25°C. Nesta etapa observou-se uma fase orgânica, que são as proteínas e em cima dessa fase orgânica aparece uma fase mais líquida. Esta fase líquida (aquosa) foi retirada com micropipeta, aspirando bem devagar sem levar a fase orgânica e transferida para um tubo tipo eppendorf levando à centrifugação acrescentando mais 500 µL de fenol:clorofórmio e 5 µL de ribonuclease (10 mg/mL) para degradar o RNA, repetindo novamente todo o processo (centrifuga, aspira a fase aquosa e transfere para um novo tubo). Ao volume obtido acrescentou-se o clorofórmio (na mesma quantidade do volume da fase aquosa que foi aspirado) e novamente centrifugado, aspirada a fase aquosa e transferido para um novo tubo. Ao novo volume obtido dessa extração com clorofórmio acrescentaram-se 2 volumes de etanol (P.A.) gelado para precipitar o DNA. O DNA foi lavado com álcool a 70% e ressuspenso com 100 µL de TE. A solução foi armazenada a -20°C.

4.2.2 Quantificação e qualificação do DNA cromossômico

A qualidade do DNA foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1% e a quantificação por fluorimetria (fluorímetro Hoefer - DyNA Quant 200).

4.2.3 RAPD por reação em cadeia da polimerase (PCR)

A metodologia foi a descrita por Matthews et al. (1994) com algumas modificações.

A amplificação do DNA foi feita num volume total de 13µl, contendo 3µl da amostra, 1,25µl de tampão PCR, 0,5 µL de dNTP, 1,09µl de diluente da enzima Taq e 0,142 µl da enzima *Taq* polimerase, sendo o volume completado com água ultrapura. Foram utilizados 2,5 µL de “primer” (Operon

Technologies) escolhidos aleatoriamente. Os “primers” utilizados basearam-se no polimorfismo que apresentarem com relação aos locos moleculares para estudos da similaridade genética. As amostras foram submetidas a um ciclo inicial de 94° por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação de 2 minutos a 94°C, 1 minuto a 34°C e 2 minutos a 72°C e um ciclo final de alongamento de 2 minutos a 72°C, em um termociclador (Gene Amp PCR System 9700), para amplificação do DNA. Após o término de cada reação, os produtos da amplificação foram armazenados a -20°C até que fosse realizada a eletroforese deste material.

4.2.4 Eletroforese do DNA amplificado

Finalizada a amplificação, 3 µL de tampão de corrida foram adicionados em cada tubo e amostras de 10 µL foram depositadas em gel de agarose 1,0%. A eletroforese foi realizada a 70V durante aproximadamente duas horas em tampão TBE 10X (Tris-base: 54g; ácido bórico: 27,5g; EDTA 0,2M pH 8,0: 50 mL). Posteriormente, o gel foi imerso em tampão TBE contendo brometo de etídio (5 µg/mL) por 40 minutos, sendo o excesso removido por lavagem do gel em água destilada. Em seguida, o DNA foi visualizado através de um transiluminador (luz U.V.) e fotografado com filme Polaroid tipo 667.

4.2.5 Análise dos dados moleculares e obtenção das similaridades genéticas

Na avaliação dos géis, cada banda polimórfica foi considerada como um caráter único. Foi elaborada uma matriz de 0 e 1, a partir da codificação da presença (1) e ausência (0) de 36 bandas polimórficas, presentes nos isolados. A estimativa da similaridade genética (S_{gij}) entre cada par de isolados foi efetuada pelo coeficiente de Nei e Li, por meio da seguinte expressão (Rohlf, 1992):

$$S_{gij} = \frac{2a}{2a+b+c}, \text{ onde:}$$

a = presença da bandas nos isolados *i* e *j*;

b = presença da banda no isolado *i* e ausência no *j*;

c = ausência da banda em *i* e presença em *j*

As análises de similaridade genética foram realizadas por meio do programa NTSYS-PC 2.0 (Rohlf, 1992).

Os erros associados dentro de cada similaridade (*s_{gs}*) foram estimados usando-se a expressão (Skroch et al., 1992): $s_{gs} = [g_{sij} (1 - g_{sij}) / (n - 1)]^{1/2}$, em que *n* é o total de números de padrões de bandas a, b e c entre cada par de isolados.

A análise de agrupamento das similaridades foi feita pelo método da média das similaridades (UPGMA), gerando um dendograma, por meio do programa NTSYS-PC 2.0 (Rohlf, 1992). Estas distâncias genéticas possibilitaram agrupar os isolados de *S. aureus* com relação às fazendas onde foram amostrados.

Os isolados geneticamente diferentes foram identificados no dendograma a partir da estimativa do valor mínimo de similaridade, acima do qual os isolados são semelhantes, ou o valor máximo significativo de similaridade (*S_{gm}*). O *S_{gm}* foi estimado por meio do teste de t, a 1% de probabilidade, utilizando a expressão:

$$S_{gm} = 1 - (t \times S_{sg}), \text{ onde:}$$

t é o valor tabelado de t com *n*-2 graus de liberdade e *S_{sg}* o erro médio das comparações consideradas no dendograma.

5 Resultados e Discussão

5.1 Análise de RAPD

Dentre os 20 isolados selecionados aleatoriamente, somente 13 apresentaram uma concentração de DNA apropriada para que fosse capaz de fornecer resultados confiáveis.

Um dos problemas relacionados à utilização do RAPD está ligado à seleção dos “primers” que serão empregados. Neste trabalho, foram utilizados 20 “primers” diferentes para a detecção do polimorfismo entre os 13 isolados. Deste total, 6 “primers” resultaram em ausência total de produtos de amplificação e 9 apresentaram apenas algumas bandas para poucos isolados, sendo, portanto, esses 15 “primers” excluídos da análise. Os 5 “primers” escolhidos foram aqueles que apresentaram padrão de bandas em todos os isolados e compreendem: OPQ-1, OPQ-4, OPQ-5, OPQ-9 e OPO-10

Investigando a diversidade genética entre *S. aureus* enterotoxigênicos, Bonetti (1996) também verificou que 5 “primers” do grupo Q e R apresentaram melhores produtos de amplificação. Dos 16 “primers” utilizados por Pereira et al. (2002), 3 foram os mais apropriados, gerando um total de 22 padrões de bandas polimórficas.

Todos os isolados estudados apresentaram diferenças no perfil dos produtos de RAPD, indicando a existência de uma grande variabilidade entre os isolados.

A Tabela 1 mostra os iniciadores utilizados, suas seqüências de nucleotídeos e número de bandas polimórficas em cada um. A literatura consultada mostrou uma grande variação em relação ao número de oligonucleotídeos a serem utilizados como “primers” para gerar fragmentos de DNA.

TABELA 1 Oligonucleotídeos que detectaram polimorfismo para os isolados de *Staphylococcus aureus*, com suas respectivas seqüências de bases e número de bandas polimórficas

<i>Oligonucleotídeos</i>	<i>Seqüência (5'→3')</i>	<i>Número de bandas polimórficas</i>
OPO-10	TCAGAGCGCC	5
OPQ-01	GGGACGATGG	7
OPQ-04	AGTGCGCTGA	8
OPQ-05	CCGCGTCTTG	5
OPQ-09	GGCTAACCGA	11
Total		36

O número médio de bandas polimórficas por iniciador foi de 7,2; não foram encontrados na literatura dados a respeito deste número. No entanto, Silva (1998), analisando a diversidade genética de *S. aureus* em amostras de leite mastítico, verificou que o emprego de 2 primers, OPA-7 e OPE-20 gerou de 17 e 19 perfis de DNA, com variação de 4 a 13 bandas, respectivamente. Segundo Niederhauser et al. (1992), os iniciadores devem ser selecionados com base no número de bandas produzidas, visto que, o maior número de bandas aumenta o poder discriminatório entre as linhagens em estudo.

Myllys et al. (1997) utilizaram RAPD para estudar a persistência de clones de *S. aureus* em mastite bovina, empregando 4 “primers” : OPJ 5, OPJ 6, ERIC 7 e ERIC 8. Estes autores também observaram que o poder discriminatório foi dependente do “primer” utilizado.

Quanto ao número de bandas necessárias para a avaliação genética, acredita-se que o número encontrado (36 bandas) foi suficiente para a análise de variabilidade genética, visto que o genoma de *Staphylococcus aureus* apresenta aproximadamente 2,8 Mbp (*Staphylococcus ...*, 2002) o que é 100 a 1000 vezes menor do que o DNA de espécies vegetais (10^8 a 10^9 pb). Portanto, o tamanho da amostra (número de bandas usadas) foi muito mais representativo do que vem sendo usado em plantas (50 - 150 bandas).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

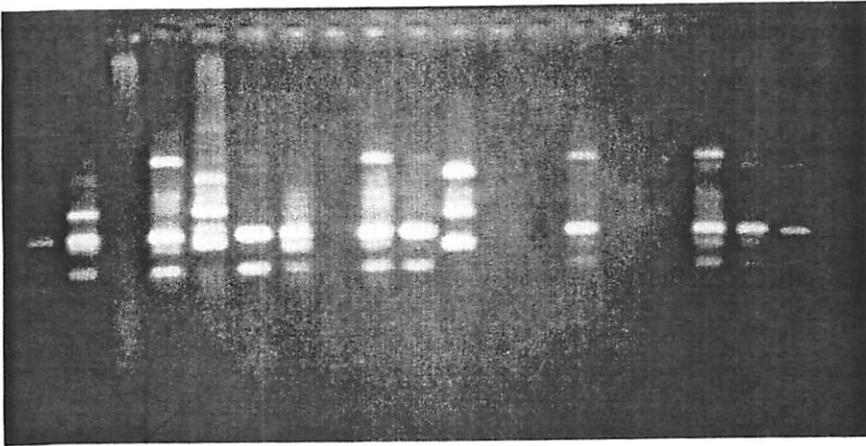


FIGURA 1 Fragmentos de DNA amplificados com o uso do “primer” OPQ-01 de 20 isolados de *Staphylococcus aureus*

O número de fragmentos de DNA analisados para cada oligonucleotídeo variou de 5 a 11. Os fragmentos de DNA amplificados para o oligonucleotídeo OPQ-1 podem ser visualizados na Figura 1.

Observou-se que nenhum isolado se mostrou idêntico a outro, o que revelou uma variabilidade muito grande entre estes. Alguns isolados apresentaram perfil de fragmentos igual quando um determinado “primer” foi utilizado; entretanto, com a utilização de um novo “primer”, estas foram facilmente diferenciadas.

5.2 Avaliação da similaridade genética

Com base nas 36 bandas polimórficas obtidas, foi construída uma matriz de similaridades genéticas por meio do coeficiente de similaridade de Nei e Li. Para avaliar a diversidade genética entre os 13 isolados de *S. aureus*, foram

levados em consideração os diferentes biotipos isolados nas seis propriedades leiteiras estudadas.

Para uma melhor visualização da divergência genética entre os isolados, foi construído um dendograma, apresentado na Figura 2. Este dendograma gerado a partir da análise da matriz de similaridade apresenta agrupamento de vários isolados. As barras verticais à direita indicam os agrupamentos e a barra inferior indica o coeficiente de similaridade entre o isolados.

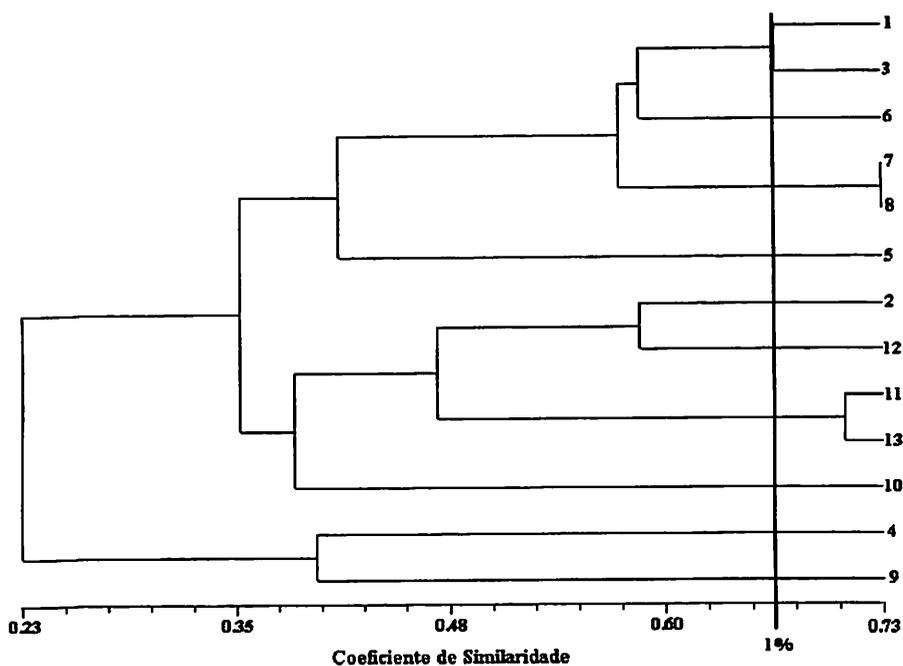


FIGURA 2 Dendograma das distâncias genéticas entre os isolados de *Staphylococcus aureus* indicando a porcentagem de similaridade entre os produtos de RAPD e os grupos formados, obtido por análise através do método UPGMA

Na análise pelo método UPGMA, foram somadas as bandas dos cinco géis para a construção da matriz de similaridade, que acabou sendo composta por 13 linhas e 34 colunas.

A análise do dendograma construído permitiu a separação dos isolados em estudo em 10 grupos. A linha de corte representa o valor máximo significativo de similaridade (sg_m) a 1% de probabilidade, acima do qual os isolados são considerados semelhantes. Os resultados de similaridade sugerem que os isolados 1 e 3 são geneticamente iguais, formando ramificação com 66% de similaridade, assim como os isolados 7 e 8 com similaridade de 73% e os isolados 11 e 13 com semelhanças genéticas de aproximadamente 71%. Ainda assim, quase a totalidade dos isolados é geneticamente diferente entre si. Entretanto, deve-se considerar que o parentesco avaliado pelo RAPD inclui regiões genômicas que não codificam, resultando em hibridizações imperfeitas entre o “primer” e o sítio alvo. Dessa forma, o processo de amplificação é extremamente sensível a mudanças na temperatura de anelamento, o que pode levar à variabilidade nos perfis gerados (Olive & Bean, 1999).

Com uma similaridade de 58%, constatou-se a formação de 2 agrupamentos. O primeiro correspondeu aos isolados 1, 3, e 6. Já o segundo agrupamento associou os isolados 2 e 12.

A aproximadamente 40%, verificou-se a formação de 2 grupos. O maior deles incluiu os isolados 1, 3, 6, 7, 8 e 5. O segundo agrupamento envolveu os isolados 2, 12, 11, 13 e 10. Os isolados 4 e 9 apresentaram baixa similaridade (23%) com os demais.

Um grande subgrupo foi formado, a 35% de similaridade, o qual reuniu os isolados 1, 3, 5, 6, 7, 8, 2, 10, 11, 12, 11 e 13. Dois isolados (4 e 9) não foram alocados nesse subgrupo. Bonetti (1996), com a finalidade de verificar a similaridade entre linhagens de referência e selvagens de *S. aureus* pelo RAPD, constatou uma variabilidade muito grande entre estas linhagens. O dendograma

construído nesse estudo revelou a formação de dois grandes subgrupos, a 30% de similaridade.

É interessante observar que estes dois últimos isolados, 4 e 9, diferentes de todos os outros, são provenientes da mesma fazenda. Dados semelhantes a esta diferença genética dentro do mesmo rebanho foram encontrados por Matthews et al. (1994), Aarestrup et al. (1995) e Lam et al. (1996).

Por meio dos perfis obtidos, foi possível verificar diversidade entre os isolados e ainda observar a formação de grupos distintos que possuíam características bioquímicas em comum. A formação de grupos distintos observados na análise sugere que existe uma importante mobilidade das cepas de determinados perfis entre propriedades, o que pode ser explicado, principalmente, pela comercialização do gado leiteiro.

Um outro fator a ser considerado na disseminação de cepas de diferentes perfis entre as propriedades é a pouca utilização de formas de diagnóstico de mastite subclínica. A comercialização destes animais infectados vai colaborar com a propagação destes clones.

Matthews et al. (1994), ao contrário do que foi obtido aqui, reportaram com sucesso o agrupamento de linhagens de *S. aureus*, causadores de mastite bovina, provenientes de mesma localização geográfica, utilizando a metodologia de *fingerprinting* com PCR. Da mesma forma, Lipman et al. (1996), na Holanda, utilizando RAPD para tipagem de 71 cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas mastíticas em um rebanho com mastite endêmica, observaram a presença de três perfis distintos. Entretanto, um perfil era predominante, agrupando 66 cepas.

O alto polimorfismo observado (36 bandas polimórficas) sugere uma ampla variação genética entre os isolados. Isso implica a necessidade de um maior tamanho de amostras para se avaliar com maior precisão o parentesco entre eles nas diferentes propriedades.

A técnica de RAPD tem sido utilizada para discriminar linhagens de muitos tipos de organismos (Czajka & Batt, 1994), bem como para determinar a similaridade entre diferentes isolados da mesma espécie bacteriana. A diversidade observada neste experimento, pelo coeficiente de similaridade, implica em maiores variações genéticas dentro da espécie de *S. aureus*.

O método de tipagem empregado neste trabalho visou distinguir diferentes tipos baseados em sua análise molecular do que comparar isolados com uma exaustiva lista de características fenotípicas. Além disso, a possibilidade de similaridades ou dissimilaridades de características indefinidas sempre existem. Entretanto, com a técnica RAPD, com a qual foi possível identificar tipos que foram comuns a múltiplos rebanhos, sugere que o procedimento de diferenciação foi suficiente para fornecer uma tipagem sobre *S. aureus*.

Outro ponto importante a ser ressaltado seria o uso desta técnica para a produção de padrões únicos ou *fingerprintings*, que poderiam ser úteis na investigação de surtos de intoxicação alimentar provocados por *S. aureus*.

6 Conclusão

- Os isolados de *Staphylococcus aureus* revelaram alta variabilidade entre si por meio do coeficiente de similaridade.
- Foi constatada uma variabilidade muito grande entre os isolados de *Staphylococcus aureus* com a utilização da técnica de RAPD. O dendograma construído revelou a formação de 10 grupos, alguns geneticamente diferentes e outros mais semelhantes.
- Os resultados das análises dos perfis RAPD mostraram a existência de subtipos nos isolados de *Staphylococcus aureus* estudados, o que pode ter acentuado a diversidade detectada nos grupos.

7 Referências Bibliográficas

AARESTRUP, F. M. Lack of Staphylococcal enterotoxin production among strains of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Denmark. **Acta Veterinaria Scandinavia**, Copenhagen, v. 36, n. 4, p. 273-275, 1995.

AARESTRUP, F. M.; DANGLER, C. A.; SORDILLO, L. M. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 59, n. 2, p. 124-128, Apr. 1995.

AKINEDEN, Ö.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A. A.; LÄMMLER, C.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 5, p. 959-964, Sept. 2001.

ANNEMÜLLER, C.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 217-224, Sept. 1999.

BONETTI, F. B. **Caracterização de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos utilizando as técnicas de RAPD e SDS-PAGE.** 1996. 79 p. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

COSTA, E. O.; PARDO, R. B.; VIANI, F. C.; WATANABE, E. T.; VENZON, P. Estimativas de prejuízos devido à mastite subclínica em propriedades leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1994, Olinda. **Anais...** Olinda, 1994. v. 23, p. 268-275.

COUTINHO, H. L. C. Noções básicas de sistemática molecular. In: **FISIOLOGIA microbiana aplicada a processos biotecnológicos: trabajos practicos.** [S1]: CARBIO/PROIMI/MIRCEN/UNESCO, 1995. v. 1, p. 48-58.

CZAJKA, J.; BATT, C. A. Verification of casual relationship between *Listeria monocytogenes* isolates implicated in foodborne outbreaks of listeriosis by randomly amplified polymorphic DNA patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 12, p. 1280-1287, Dec. 1994.

FITZGERALD, J. R.; MEANEY, W. J.; HARTIGAN, P. J.; SMYTH, C. J.; KAPUR, V. Fine structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Epidemiology and Infection**, New York, v. 119 n. 2, p. 261-269, Oct. 1997.

FRENAY, H.; BUNSCHOTEN, A.; SCHOOLS, L.; VAN LEEUWEN, W.; VANDERBROUCKE-GRAULS, C.; VERHOEF, J.; MOOI, F. Molecular typing of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 15, n. 1, p. 60-64, 1996.

JAYARAO, B. M.; GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P. Application of randomly amplified polymorphic DNA fingerprint for species identifications of bacteria isolated from bovine milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n. 6, p. 615-620, June 1996.

JOO, Y. S.; FOX, L. K.; DAVIS, W. C.; BOHACH, G. A.; PARK, Y. H. *Staphylococcus aureus* associated with mammary glands of cows: genotyping to distinguish different strains among herds. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 80, n. 2, p. 131-138. May 2001.

KAPUR, V.; SISCHO, W. M.; GREER, R. S.; WHITTAN, T. S.; MUSSER, J. M. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 2, p. 376-380, Feb. 1995.

LAM, T. J. G. M.; LIPMAN, L. J. A. A.; SCHUKKEN, Y. H.; GAASTRA, W.; BRAND, A. Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* studied by DNA fingerprinting. **American Journal of Veterinary Research**, Shaumburg, v. 57, n. 1, p. 39-42, 1996.

LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* from cases of mastitis bovine in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 2, p. 127-141, June 1999.

LIN, A. W.; USERA, M. A.; BARRET, T. J.; GOLDSBY, R. A. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 4, p. 870-876, Apr. 1996.

LIPMAN, L. J. A.; NIJS, A.; LAM, T. J. G. M.; ROST, J. A.; van DIJK, L.; SCHUKKEN, Y. H.; GAASTRA, W. Genotyping by PCR, of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary glands of cows. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 48, n. 1/2, p. 51-55, Mar. 1996.

MATTHEWS, K. R.; KUMAR, S. J.; O'CONNOR, S. A.; HARMON, R. J.; PANKEY, J.; FOX, L. K.; OLIVER, S. P. Genomic fingerprints of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **Epidemiology and Infectology**, New York, v. 112, n. 1, p. 177-186, Feb. 1994.

MATTHEWS, K. R.; OLIVER, S. P. Differentiation of *Staphylococcus* species by polymerase chain reaction-based DNA fingerprint. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 57, n. 6, p. 486-489, June 1994.

MATTHEWS, K. R.; ROBERSON, J.; GILLESPIE, B. E.; LUTHER, D. A.; OLIVER, P. Identification and differentiation of coagulase-negative *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n. 6, p. 686-688, June 1997.

MYLLYS, V.; RIDELL, J.; BJÖRKROTH, J.; BIESE, I.; PYÖRÄLÄ, S. Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 51, n. 3/4, p. 245-251, Aug. 1997.

NIEDERHAUSER, C.; CANDRIAN, U.; HOFLEIN, C.; JERMINI, M.; BUHLER, H. P.; LUTHY, J. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 5, p. 1564-1568, May 1992.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, June 1999.

PEREIRA, M. S. V.; LEAL, N. C.; SOBREIRA, M.; de ALMEIDA, A. M. P.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and ribotyping-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 35, n. 1, p. 32-36, July 2002.

RHOLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis sistem**. New York, 1992. 470 p.

SILVA, W. P. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite.** 1998. 88 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo.

SKROCH, P. W.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationship using RAPD marker data. In: INTERNATIONAL UNION OF FORESTRY RESEARCH ORGANIZATIONS, 1992, Cali. **Proceedings of IUFRO International Conference: Breeding Tropical Trees.** Cali, 1992. p. 26-30. (Section 202-208).

STAPHYLOCOCCUS aureus NCTC 8325 Genome Sequencing. Disponível em: <<http://www.genome.ou.edu/staph.html>>. Acesso em: 15 jan. 2002.

STEPHAN, R.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A.A.; LÄMMLER, C. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland . **Veterinary Microbiology**, v.78, n. , 373-382, 2001.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; ARCHER, G. L.; BIDDLE, G.; BYRNE, S.; GOERING, R.; HANCOCK, G.; HÉBERT, G. A. A.; HILL, B.; HOLLIS, R.; JARVIS, W.; KREISWIRTH, B.; EISNER, W.; MASLOW, J. McDUGAL, L. K.; MILLER, J. M.; MULLIGAN, M.; PFALLER, M. A. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 9, p. 407-415, Sept. 1994.

van BELKUM, A.; KLUYTMANS, J.; van LEEUWEN, W.; BAX, R.; QUINT, W.; PETERS, E.; FLUIT, A.; VANDERBROUCKE-GRAULS, C.; van den BRULE, A.; KOELEMAN, H.; MELCHERS, W.; MEIS, J.; ELAICHOUNI, A.; VANNECHOUTTE, M.; MOONENS, F.; MAES, N.; STRUELENS, M.; TENOVER, F.; VERBRUGH, H. Multicenter evaluations of arbitrary primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 6, p. 1537-1547, June 1995.

van LEEUWEN, W.; SIJMONS, M.; SLUIJS, J.; VERBRUGH, H.; VAN BELKUM, A. On the nature and use of randomly amplified DNA from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 11, p. 2770-2777, Nov. 1996.

van LEEUWEN, W.; VERBRUGH, H.; van der VELDEN, J.; van LEEUWEN, N.; HECK, M.; van BELKUM, A. Validation of binary typing for *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 3, p. 664-674, Mar. 1999.

WANG, G.; WHITTAN, T. S. S.; BERG, C. M.; BERG, D. E. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n. 25, p. 5930-5933, Dec. 1993.

WILSON, I. G.; COOPER, J. E.; GILMOUR, A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of the polymerase chain reaction for amplication and detection os staphylococcal enterotoxin genes *entB* and *entC1* and the thermonuclease gene *nuc*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 6, p. 1793-1798, June 1991.