UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SARAH HWA IN LEE

**Identificação molecular de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilmes em
ambiente de ordenha**

Pirassununga

2012

SARAH HWA IN LEE

Identificação molecular de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilmes em ambiente de ordenha

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

L481i Lee, Sarah Hwa In
Identificação molecular de *Staphylococcus aureus*
formadores de biofilmes em ambiente de ordenha / Sarah
Hwa In Lee. -- Pirassununga, 2012.
71 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de
Oliveira.

1. Biofilme 2. Mastite 3. PFGE 4. *S aureus*.
I. Título.

Aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira pela orientação e ensinamentos.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo.

Ao meu amigo Carlos Henrique Camargo, também ao Danilo pelo ensinamento do protocolo da PFGE.

À profa Maria de Lourdes por permitir acompanhar a técnica de PFGE com seu aluno de mestrado Danilo Flavio.

Aos estagiários, Beatriz, Bruna, Esteban, Monique, Marluci e Rafaela pela ajuda e dedicação durante o experimento.

Às colegas e amigas de laboratório Alessandra, Carolina, Diane, Estela, Fernanda, Giovana, Keliane e Natali. Ao Juliano pelo companheirismo e paciência.

Ao Rafael e sua família pela ajuda no ingresso no mestrado na FZEA/USP.

À Roice e Márcia, técnicas de laboratório, pela amizade e disponibilidade em ajudar

Ao Professor Maia do Laboratório de Parasitologia e professora Cláudia do Laboratório de Histologia, ambos do ZAB-FZEA/USP pela atenção e disponibilidade de utilização dos equipamentos de ELISA e microscópio de epifluorescência.

À professora Vera que sempre me ajudou desde a graduação.

Ao prof. Eduardo e ao pesquisador Assis pela atenção, disposição e disponibilidade de utilização do microscópio de epifluorescência do Laboratório de Biologia de Fungos, IB-UNESP/Botucatu.

À Maisa, técnica e companheira das coletas da região de Franca.

Ao Carlos Corassin pela lista de contato dos proprietários para a realização das coletas.

Aos proprietários por nos receber durante os seis meses de coleta.

Ao Girlei da biblioteca da FZEA pelo auxílio com as referências.

Ao professor Gelson pela convivência e ensinamento durante o estágio PAE.

E todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

Muito obrigada.

RESUMO

Lee, S. H. I. **Identificação molecular de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilmes em ambiente de ordenha.** 2012.71 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de cepas de *Staphylococcus aureus* no ambiente de ordenha, analisar seu perfil genético e a produção de biofilme, provenientes de 10 propriedades localizadas nas regiões de Franca e Ribeirão Preto, estado de São Paulo, Brasil. Foram analisadas 220 amostras de leite individual de vacas positivas no teste CMT (*California Mastitis Test*), 120 amostras de leite de tanque de expansão, 389 *swabs* de utensílios e equipamento relacionados com ordenha e 120 *swabs* de mãos de manipuladores. As coletas de amostras foram realizadas mensalmente durante o período de agosto/2010 a janeiro/2011. Das 849 amostras analisadas, 56 cepas de *S. aureus* (6,6%) foram isoladas, sendo 12 (5,4%) de leite individual de vacas, 26 (21,6%) de leite de tanque de expansão, 14 (3,6%) de utensílios e equipamentos e 4 (6,9%) de mãos de manipuladores. Os resultados indicam uma baixa prevalência de *S. aureus* nas propriedades analisadas, não havendo diferença significativa entre as frequências encontradas nas duas regiões analisadas. A técnica de PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) permitiu identificar 31 perfis genéticos (pulsotipos), utilizando-se a enzima de restrição *Sma*I. Nos ensaios de produção de biofilmes em microplaca, 19 (63,3%) de 30 pulsotipos avaliados foram considerados produtores de biofilme. Nos ensaios conduzidos em aço inox, 13 (43,3%, N=30) foram positivos e, para o silicone, não houve produção de biofilme. O elevado percentual de isolados no leite de tanque de expansão evidencia um problema de saúde pública, considerando que no Brasil muitas vezes o leite é consumido sem pasteurização. A ocorrência de pulsotipos de *S. aureus* formadores de biofilmes indica a persistência do patógeno em diversos pontos no ambiente de ordenha, bem como provável envolvimento dos mesmos com casos de mastite e sua eliminação no leite, ressaltando a necessidade de práticas higiênicas para prevenir a formação de biofilmes nas propriedades estudadas.

Palavras chave: biofilme, mastite, PFGE, *S. aureus*.

ABSTRACT

Lee, S. H. I. **Molecular identification of *Staphylococcus aureus* biofilm-producers in milking environment.** 2012. 71 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The objective of the present study was to evaluate the occurrence of biofilm-producing strains of *Staphylococcus aureus* in the milking environment from 10 farms located in the regions of Franca and Ribeirão Preto, state of São Paulo, Brazil. Two-hundred twenty samples of milk from individual cows previously tested for CMT (California Mastitis Test), 120 samples of bulk tank milk, 389 swabs of equipments and utensils related to milking and 120 swabs of milk's handlers hands were analyzed. A total of 56 (6.6%) *S. aureus* strains were isolated out of 849 samples analyzed, being 12 (5.4%) from milk samples from individual cows, 26 (21.6%) from bulk tank milk, 14 (3.6%) from swabs of equipments and utensils, and 4 (3.3%) from swabs hands of milk's handlers. Results indicated a low prevalence of *S. aureus* in the dairy farms analyzed, and there was no significant difference between the percentages found in the two regions evaluated. On the basis of PFGE results (using *Sma*I enzyme), 31 profiles (pulsotypes) were found. In the biofilm-production assay using microplates, 19 (63.3%) of 30 pulsotypes tested were considered positive (biofilm producers). For assays conducted in stainless steel, 13 (43.3%) of pulsotypes were biofilm producers, although no pulsotype was able to produce biofilms on the surface of silicon. Results of this trial showed a high percentage of bulk tank milk samples contaminated with *S. aureus*, hence indicating a public health problem especially in Brazil where milk is often consumed without pasteurization. The occurrence of *S. aureus* pulsotypes which were also biofilm-producers suggests the persistence of the pathogen in several sites at the milking environment, as well the probable involvement of *S. aureus* biofilms with mastitis and its excretion in the milk. The need for adoption of hygienic practices to prevent the formation of biofilms of *S. aureus* in the dairy farms evaluated is stressed.

Keywords: biofilm, mastitis, PFGE, *S. aureus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	9
2.2. PRODUÇÃO DE BIOFILME POR <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	10
2.3. INFECÇÃO INTRAMAMÁRIA	13
2.4. VIAS DE TRANSMISSÃO DO <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	15
2.5. MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICAÇÃO DE <i>S. AUREUS</i>	16
3. OBJETIVO	19
3.1. OBJETIVO GERAL:	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO UNIVERSO AMOSTRAL	20
4.2. AMOSTRAGEM	20
4.3. ANÁLISES LABORATORIAIS.....	21
4.3.1. Isolamento do <i>Staphylococcus aureus</i>	21
4.3.2. Análise do DNA cromossômico por PFGE.....	22
4.4. ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE BIOFILME POR <i>S. AUREUS</i>	23
4.4.1. Microplaca de poliestireno.....	23
4.4.2. Microscopia de epifluorescência	24
4.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. CARACTERÍSTICAS DAS PROPRIEDADES AVALIADAS	26
5.2. OCORRÊNCIA DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> NO LEITE E AMBIENTE DE ORDENHA.....	30
5.3. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS ISOLADAS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	33
5.4. PRODUÇÃO DE BIOFILMES EM SUPERFÍCIES INERTES	36
6. CONCLUSÕES	46
7 REFERENCIAS.....	47
ANEXOS.....	70

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um coco Gram positivo pertencente à família Staphylococcaceae que consiste em mais de 45 espécies e 24 subespécies de acordo com Euzéby (2011). Reinosa (2008) afirma que o *S. aureus* é reconhecido como um patógeno de importância mundial. Possui grande importância por se tratar de uma das espécies comumente responsáveis por doenças de origem alimentar (ARAGON-ALEGRO et al., 2007), além de ser mundialmente conhecido como um dos maiores causadores da mastite clínica ou subclínica, recorrente ou crônica do gado. A mastite causada por *S. aureus*, tanto clínica quanto a subclínica, são reconhecidas como uma das principais doenças que afetam a indústria leiteira (BRAMLEY, 1992).

A cápsula do *S. aureus* constitui um fator de virulência associado a infecções intramamárias (MAMO et al., 1991), pois confere proteção contra fagocitose e deste modo proteger o patógeno do sistema imune do hospedeiro. Assim como a cápsula, a produção de biofilme aumenta a habilidade de iniciar (BASELGA et al., 1993) e causar infecções persistentes intramamárias (CUCARELLA et al., 2004). O biofilme é, portanto, reconhecido como um importante fator de virulência para as bactérias do gênero *Staphylococcus*. (CUCARELLA et al., 2001, 2002; VASUDEVAN et al., 2003; ARRIZUBIETA et al., 2004; FOX et al., 2005; KARAOLIS et al., 2005; MELCHIOR et al., 2006).

A mastite bovina é responsável pela redução da produção de leite, o que resulta em perdas econômicas em todo o mundo. (BECK et al., 1992). Além de ser difícil de erradicar, a mastite requer terapia antimicrobiana (BRADLEY, 2002; VASUDEVAN et al., 2003; BROUILLETTE et al., 2005; KARAOLIS et al., 2005).

Existe relação entre superfícies contaminadas e transmissão de patógenos para os alimentos (KUSUMANINGRUM et al., 2003). Quando há contaminação de produtos lácteos, evidências sugerem que a fonte está nos equipamentos usados no processamento do leite (FLINT et al., 1997), o que ressalta a importância das práticas higiênico-sanitárias para manipulação dos animais e de seus produtos.

A eletroforese em campo pulsátil (PFGE) é considerada a técnica *gold standard* para a tipagem de diversas bactérias e leveduras, inclusive o *S. aureus* (MAGALHÃES et al., 2005). A PFGE apresenta grande sensibilidade e poder discriminatório para isolados de *S. aureus* e é comumente empregada para estudos microepidemiológicos (locais ou de curta duração) ou macroepidemiológicos (nacionais, continentais ou de longa duração)

Tendo em vista o exposto, delineou-se o presente estudo com a finalidade de avaliar a habilidade da espécie *Staphylococcus aureus* isolados de leite e de ambiente de ordenha em produzir biofilme, sua relação com a mastite e a transmissão via manipuladores e superfícies de equipamentos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria esférica, não esporulada, sem motilidade, e ao ser observada ao microscópio, ocorre em pares, pequenas correntes e principalmente com o formato de cacho de uva. Essa bactéria é anaeróbia facultativa e catalase positiva (HENNEKINNE; De BUYSER; DRAGACCI, 2011). Trata-se de uma bactéria Gram positiva que pertence à microbiota comensal dos seres humanos e de várias espécies de animais (VANDERHAEGHEN et al., 2010b). Além disso, é uma bactéria adaptável, considerada como patógeno oportunista com habilidade de persistir e se multiplicar em diferentes ambientes causando um grande espectro de doenças, em seres humanos e animais. Em seres humanos, o *S. aureus* é o principal agente causador de infecções, que variam desde lesões superficiais na pele até infecções invasivas como sepse e osteomielite (CUCARELLA et al., 2003), usualmente de difícil tratamento (ARCHER, 1998; COSGROVE et al., 2003).

S. aureus é a terceira bactéria mais comum causadora de intoxicação alimentar (ZHANG et al., 1998, ACCO et al., 2003). Pela rápida progressão do quadro de intoxicação alimentar à cura, na maioria dos indivíduos, estima-se que a maior parte dos casos não seja reportada (PINTO; CHENOLLI; AZNAR, 2005). As enterotoxinas envolvidas com surtos de intoxicação alimentar são produzidas por aproximadamente um terço das cepas de *S. aureus* (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989). Apesar de o calor de cocção eliminar o *S. aureus* dos alimentos, as enterotoxinas produzidas podem permanecer, uma vez que são mais resistentes ao calor do que o microorganismo (BANWART, 1998). As enterotoxinas, quando ingeridas podem causar náusea, vômito e diarreia (JABLONSKY; BOHACH, 1997; BALABAN; RASOOLY, 2000, DINGES, 2000; NORMMANNO et al. 2007).

No Brasil, apesar da incidência de intoxicações alimentares causadas por *S. aureus* ser desconhecida, estudos anteriores indicam que o leite cru, assim como produtos lácteos, possui grande importância nos surtos em humanos (TONDO et al., 2000). Analogamente, *Staphylococcus* spp. é o principal gênero de bactérias causadoras de mastite nos rebanhos do Brasil e do mundo (SOUTO et al., 2008; WHIST et al., 2009).

Staphylococcus spp. são encontrados naturalmente na pele e na mucosa de animais de sangue quente, como também, em carne, leite, queijo, além de solo, areia,

poeira, ar ou água (KLOOS; SCHLEIFER, 1986; HEIKENS et al., 2005). Essas bactérias possuem alta capacidade de disseminação, o que requer cuidado na ordenha (SILVA et al., 2000), já que os tetos podem constituir locais onde a bactéria pode estar presente. Akineden et al. (2001) afirmam que a transmissão da bactéria pode ocorrer entre vacas durante a lactação.

A ocorrência de altas contagens de *S. aureus* no leite cru está ligada à falta de higiene no ambiente de ordenha (KIRK, 1994), mas também pode ser atribuída à alta prevalência do micro-organismo nos tetos das vacas (MAKAYA, 1996) ou pela contaminação cruzada entre os ordenhadores (LUES; VAN TONDER 2007). No leite processado, a ocorrência de *S. aureus* geralmente está associada à contaminação pós-processamento (ABDEL; DARDIR, 2009).

As enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus* spp. são relevantes para a saúde humana devido às intoxicações alimentares e à síndrome do choque tóxico, mas elas não são essenciais para a patogênese da mastite bovina (LARSEN et al., 2000; LARSEN et al., 2002). Em ruminantes, as infecções intramamárias causadas por *S. aureus* manifestam-se nas formas clínica e sub-clínicas no rebanho (ANNEMÜLLER; LAMMÉLER; ZSCHÖCKS, 1999; VASUDEVAN et al., 2002;). Cerca de um terço dos casos de mastite clínica ou subclínica é causado pelo patógeno (BRADLEY et al., 2007; BOTREL et al., 2010). A virulência do *S. aureus* está associada com a habilidade de produzir toxinas, e outros fatores extracelulares, a habilidade de formar biofilme e a evasão à fagocitose (TAKEUCHI et al., 2001). A maioria das cepas de *S. aureus* isoladas de seres humanos e de casos de mastite em ruminantes possui cápsula (KARAKAWA; VANN, 1982; KARAKAWA et al., 1985; POUTREL et al., 1988) que se trata de um fator de virulência da bactéria. O biofilme também é um fator de virulência importante na patogenicidade do *S. aureus*.

2.2. PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *Staphylococcus aureus*

Biofilmes são definidos como comunidades bacterianas estruturadas envoltas de matriz extracelular polimérica própria, aderida a superfícies bióticas ou abióticas (COSTERTON et al., 1999), conforme apresentado na Figura 1. A formação do biofilme ocorre em duas etapas sequenciais que são agregação bacteriana por proteínas de superfície e consequente proliferação em multicamadas, nas quais as bactérias envolvem-se em uma matriz exopolissacarídica (BASELGA et al., 1993; CUCARELLA et al.,

2001; FOX et al., 2005; LASA; PENADES, 2006; LATASA et al., 2006; MELCHIOR et al., 2006b; CLUTTERBUCK et al., 2007; ROHDE et al., 2007).

Figura 1: Representação esquemática das etapas de formação do biofilme (adaptada de MELCHIOR et al., 2006).

Zobell reportou a existência do biofilme bacteriano pela primeira vez em 1943, e desde então o mesmo é uma preocupação em várias áreas principalmente de alimentos, meio ambiente e médica (FLINT; BREMER; BROOKS, 1997; MAUKONEN et al., 2003; SIHORKAR; VYAS, 2001; VERAN, 2002). Na indústria alimentícia, biofilmes bacterianos podem ser vistos como problema principalmente na área de laticínio, produtos frescos e processamento de aves e carnes vermelhas (FRANK; EHLERS; WICKER, 2003; JESSEN; LAMMERT, 2003; SOMERS; WONG, 2004; CHEN; ROSSMAN; PAWAR, 2007). A produção de biofilme pode ainda aumentar a resistência dos microorganismos aos antimicrobianos (LANGSRUD et al., 2003; SIMÕES; VIEIRA, 2010). Diversas espécies bacterianas, como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* O157:H7 já foram relacionadas com surtos alimentares associados à produção de biofilmes (SOMERS; SCHOENI; WONG, 1994; KUMAR; ANAND, 1998; WONG, 1998; SHARMA; ANAND, 2002a; DYKES, WAAK; THAM; DANIELSSON-THAM, 2002; SAMPATHKUMAR; KORBER, 2003; LAPIDOT; ROMLING; YARON, 2006; AARNELA et al., 2007).

A habilidade de formar biofilme confere ao *S. aureus* um importante fator de virulência (CUCARELLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003; FOX et al., 2005;

MELCHIOR et al., 2006b; CLUTTERBUCK et al., 2007), pois bactérias envoltas de biofilmes são mais difíceis de serem eliminadas do que aquelas na forma planctônica (WIRTANEN; MATTILA-SANDHOLM, 1992a,b; MOSTELLER; BISHOP, 1993), e uma vez estabelecido o biofilme, este pode ser fonte de contaminação de produtos e superfícies. Estudos *in vitro* revelaram que bactérias cujas cepas crescem em biofilmes podem se tornar de 10-1000 vezes mais resistentes aos efeitos de antimicrobianos, quando comparadas com a mesma cepa em crescimento planctônico. (AMORENA et al., 1999; CERI et al., 1999; MAH; O TOOLE, 2001; OLSON et al., 2002; CONLEY et al., 2003). O biofilme pode impedir a ação de células fagocitárias originadas do sistema imune do hospedeiro como também a ação de antimicrobianos. Além disso, o biofilme é capaz de liberar células planctônicas das camadas mais externas, permitindo a persistência da infecção bacteriana (BASELGA et al., 1993; CUCARELLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003; FOX et al., 2005; CERCA et al., 2006; CHAMBERS et al., 2006; FRANK; PATEL, 2006; MELCHIOR et al., 2006a,b; CLUTTERBUCK et al., 2007; HARRAGHY et al., 2006).

Microorganismos envoltos em biofilme podem catalisar reações químicas como também reações biológicas o que pode ocasionar a corrosão de metais em encanamentos e em tanques de expansão, além de interferir na eficiência da transferência de calor (VIEIRA; MELO; PINHEIRO, 1993; MITTELMAN, 1998). Portanto, a limpeza detalhada das superfícies é o primeiro e mais importante passo da sanitização de equipamentos. (FORSYTHE; HAYES, 1998). A mesma é importante para eliminar os detritos de alimentos e outros resíduos que podem eventualmente conter microorganismos ou contribuir para o crescimento dos mesmos. (SIMÕES et al. 2010).

Superfícies de aço inox, vidro, borracha e polipropileno podem ser contaminados por microorganismos patogênicos, os quais podem sofrer adesão e posteriormente se multiplicar e conseqüentemente formar biofilme (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; PARIZZI, 1999; POMPERMAYVER; GAYLARDE, 2000; ZACHEUS et al., 2000). O tempo necessário para a formação do biofilme depende da frequência de limpeza dos equipamentos (GIBSON et al., 1999). Superfícies que mantêm contato com produtos alimentícios devem ser limpos várias vezes ao dia, já superfícies ambientais como paredes podem ser limpos somente uma vez por semana (GIBSON et al., 1999). A superfície de produtos acabados pode ser contaminada pelo contato, já superfícies ambientais podem contaminar indiretamente pela transmissão via vetor, sistema de

ventilação e limpeza como também por funcionários (HOLAH; KEARNEY, 1992; HOLAH; TAYLOR; HOLDER, 1993).

A aderência de cepas isoladas de patógenos de mastite tem sido amplamente estudada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (AMORENA et al., 1990; ALMEIDA et al., 1999; HENSEN et al., 2000a,b; ALMEIDA; OLIVER, 2001; AGUILARAND ITURRALDE, 2001). Há uma associação entre a ocorrência de biofilme e a mastite bovina (MELCHIOR et al., 2006a,b). Baselga et al. (1993) sugerem que biofilme produzido por cepas de *S. aureus* mostram habilidade superior em aderir à superfície da mucosa da glândula mamária do que cepas não-produtoras de biofilme.

Baselga et al. (1993) sugerem que cepas de *S. aureus* com genes codificadores de componentes do biofilme fenotipicamente ativos podem ter a habilidade de iniciar a produção de biofilme, os quais podem causar infecções intramamárias persistentes (CUCARELLA et al., 2004). A produção e regulação do biofilme de *S. aureus* são relacionadas a vários genes e clusters como o *ica* (intercellular adhesion), *bap* (biofilm-associated protein), *agr* (accessory gene regulator) e *sar* (staphylococcal accessory regulator) (ARCIOLA et al., 2001; CUCARELLA et al., 2001, 2002, 2004; BEEKEN et al., 2003; VASUDEVAN et al., 2003; ARRIZUBIETA et al., 2004; BROUILLETTE et al., 2005; FOX et al., 2005; KARAOLIS et al., 2005; LASA; PENADES, 2006; MELCHIOR et al., 2006).

2.3. INFECÇÃO INTRAMAMÁRIA

A mastite é a doença mais importante da indústria leiteira, por refletir na saúde e bem estar do animal, que é acompanhada pela diminuição da produção de leite, aumento dos custos veterinários e até mesmo a morte do animal (JANZEN, 1970; GODDEN et al., 2002, SHIM; SHANKS; MORIN: 2004; MELCHIOR et al., 2006b). (KOSSAIBATI; ESSLEMONT, 1997; ØSTERGAARD et al., 2005; BARKEMA et al., 2006; HALASA et al., 2007). A mastite pode ser classificada em clínica e subclínica. A identificação da mastite clínica é realizada a partir da observação das alterações no leite e da presença de sinais da inflamação como dor, edema no úbere, rubor, calor e modificação das características da secreção do leite (presença de pus e grumos). Já a mastite subclínica pode ser mais bem caracterizada pelo aumento da contagem de células somáticas (CCS), devido ao influxo de leucócitos, apesar do úbere e leite estarem aparentemente normais (MELO, 2008).

Entre os microrganismos isolados em casos de mastite bovina se destacam os *Staphylococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium* spp e *Escherichia coli* (BRABES et al., 1999; BRITO et al., 1999, BRITO et al, 2001; RABELLO, 2003). Em particular, as infecções causadas por *S. aureus* podem ser refratárias ao tratamento (OWENS et al., 1988, 1997; PYÖRÄLÄ; PYÖRÄLÄ, 1998; DELUYKER et al., 1999; WILSON et al., 1999; SOL et al., 2000).

Para o diagnóstico da mastite subclínica no campo, utiliza-se o *California Mastitis Test* (CMT), descrito por Schalm; Noorlander (1957), que se caracteriza por ser um teste capaz de detectar o processo inflamatório na glândula mamária, sendo aceito internacionalmente para o diagnóstico da mastite subclínica. (COSTA et al., 1996). Campos (2000) acrescenta que esse é um bom teste preditivo positivo.

Outro teste empregado no campo é o teste da caneca telada ou de fundo escuro, o qual deve ser realizado a cada ordenha nos primeiros jatos de leite. A visualização de grumos no leite decorrentes de alterações por depósito de leucócitos permite o diagnóstico da forma clínicas da mastite. O contraste do fundo negro da caneca com os grumos facilita a visualização de alterações e o diagnóstico precoce (FURLONG; RIBEIRO, 2006).

Em vacas em lactação o *S. aureus* é comumente a causa de infecções intramamárias que freqüentemente levam a mastite crônica, principalmente devido à dificuldade de se erradicar a infecção com terapia antimicrobiana (SUTRA; POUTREL, 1994; SEARS; MCCARTHY, 2003). Muitas vezes, a única estratégia eficiente é o abate prematuro de animais (CUCARELLA et al., 2004).

No Brasil, *S. aureus* é comumente isolado de amostras de leite de vacas com mastite (COELHO et al., 2009). O úbere das vacas infectadas é o principal reservatório de *S. aureus*, que é transmitido para outras vacas no rebanho, sendo que a prevenção da transmissão de patógenos de vaca para vaca reduz a incidência de mastite (NEAVE et al., 1969).

S. aureus é capaz de colonizar diferentes locais nas propriedades leiteiras, além das glândulas mamárias (TRINIDAD et al., 1990a; FOX et al., 1991; MATOS et al., 1991; ROBERSON et al., 1994), sendo provável que esses locais atuem como fômites na epidemiologia das infecções intramamárias (FOX; GAY, 1993). Porém, evidências sugerem que isolados que colonizam locais extramamários não são os mesmos isolados de *S. aureus* que causam infecção intramamária (ZADOKS et al., 2002).

2.4. VIAS DE TRANSMISSÃO DO *Staphylococcus aureus*

A importância de superfícies contaminadas em relação ao potencial de transmissão de patógenos para o alimento é evidente em locais de processamento de alimentos, no uso de cateter e no ambiente doméstico. A exposição de patógenos em superfícies pode ocorrer tanto por contato direto com objetos contaminados ou indiretamente através de partículas em suspensão. Algumas bactérias fixam em superfícies como forma predominante de sobrevivência na natureza (LINDSAY; HON HOLY, 1999).

Vários estudos indicam que diversas bactérias, incluindo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp., sobrevivem em mãos, esponjas, panos, utensílios e moeda por horas ou dias após o contato inicial dos mesmos com os micro-organismos (SCOTT; BLOOMFIELD, 1990; JIANG; DOYLE, 1999; KUSUMANINGRUM et al., 2002). Outros estudos quantificaram a extensão da sobrevivência de bactérias e contaminação cruzada entre as mãos e superfícies da cozinha ou alimentos diversos (ZHAO et al, 1998; WIRTAMEN; SAARELA; MATTILLA-SANDHOLM, 2000; CHEN et al, 2001; MONTVILLE et al, 2001).

Existem possíveis fontes de *S. aureus* no ambiente de ordenha, incluindo materiais de construção e equipamento de forragem, ar, pele bovina, outros animais e os seres humanos (BRAMLEY, 1992; VIANN; NADER FILHO; LANGENEGGER, 1992; ROBERSON et al., 1994; LANGONI et al., 1998; ZADOKS et al., 2002; BERGONIER et al., 2003; JØRGENSEN; MORK; RORVIK, 2005c; CAPURRO et al., 2010). O teto das vacas foi sugerido como um importante reservatório para a infecção intramamária (ROBERSON et al., 2004, CAPURRO et al., 2010), também a transmissão entre seres humano para bovinos também já foi proposto (DEVRIESE ; HOMMEZ, 1975; SWARTZ; JOOSTE; NOVELLO. 1985).

As superfícies dos equipamentos utilizados para manipulação de alimentos ou no seu processamento são reconhecidas como um possível apoio para o crescimento microbiano, e biofilmes existentes em tais superfícies são reconhecidos hoje como fontes potenciais de contaminação (ZOTTOLA; SASHARA, 1994; HOOD; ZOTTOLA, 1997; SOMERS et al., 2001).

O revestimento interno das máquinas de ordenha são fômites importantes para a transmissão de *S. aureus* em rebanhos leiteiros, e a limpeza regular do mesmo reduz a contaminação com bactérias (FOX et al., 1991). Durante a ordenha, a contaminação ocorre frequentemente a partir de micro-organismos presentes no úbere ou contaminando

o equipamento de ordenha (FLINT; BREMER; BROOKS, 1997), uma vez que as vacas são a principal fonte de contaminação do leite cru com cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* (DA SILVA et al., 2005, ROSENGREN et al., 2010). Em particular, as vacas com mastite subclínica por *S. aureus* podem eliminar um grande número de *S. aureus* no leite. Zeconi; Hahn, (2000) afirmam que leite e derivados são considerados veículos de infecção de *S. aureus* em humanos. Portanto, medidas de controle são principalmente destinadas a melhorar a higiene na ordenha e rotinas de ordenha como a ordem das vacas a serem ordenhadas, realização do pré e pós *dipping*. A terapia da vaca seca e abate de animais infectados são outras medidas tomadas em programas de controle (CAPURRO et al., 2010).

A medida exata do impacto, as fontes, os mecanismos de transmissão para as espécies de estafilococos também são importantes na cadeia alimentar, uma vez que estratégias de controle para estafilococos são desconhecidas (ZADOKS; WATTS, 2008).

2.5. MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICAÇÃO DE *S. aureus*

Existe uma considerável heterogeneidade genética em populações de *S. aureus* (KAPUR et al., 1995), que pode ser identificada para investigar a disseminação dos isolados de origem humana e animal. A diferenciação dos isolados constitui a base do estudo epidemiológico de doenças infecciosas, assim é possível discriminar isolados não relacionados, bem como classificar os isolados epidemiologicamente relacionados (FRENAY et al., 1996). Portanto, epidemiologicamente é de grande importância a determinação da origem dos organismos envolvidos na etiologia da mastite como também determinar alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DVAs).

As técnicas empregadas na identificação genotípica de micro-organismos, incluindo a diferenciação de isolados em uma mesma espécie obtiveram grande avanço nos últimos anos. As técnicas moleculares de tipagem de micro-organismo abriram novas possibilidades para a identificação e diagnóstico.

Embora o sequenciamento do DNA seja o método mais preciso para avaliar relações genéticas entre microrganismos, é uma técnica limitada a laboratórios especializados e, portanto, inviável de ser aplicado em análises de rotina (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005). O *Multilocus sequence typing* (MLST) é um exemplo de

método que utiliza o sequenciamento do DNA de múltiplos genes ou fragmentos de genes para diferenciar subtipos bacterianos (WIEDMANN, 2002).

Como alternativa ao sequenciamento, existem métodos que fornecem uma precisão relativa da variabilidade genética, em uma amostragem elevada, em curto tempo. Dentre eles estão a ribotipagem, a PFGE, a análise dos fragmentos de restrição de tamanhos polimórficos de DNA (RFLP) e a análise do polimorfismo do DNA amplificado ao acaso 32 (RAPD), todos já bem estabelecidos e usados rotineiramente (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005).

A técnica da PFGE foi descrita pela primeira vez em 1984 como uma ferramenta para a análise do DNA cromossômico de organismos eucariotos. Subsequentemente, essa técnica se mostrou eficiente para a tipagem molecular de bactérias (TENOVER; ARBEIT; GOERING, 1997).

A PFGE envolve a incorporação do organismo em agarose, lise dos mesmo *in situ* com posterior digestão do DNA cromossômico com enzimas de restrição específicas para cada gênero. *Plugs* de agarose contendo os fragmentos de DNA são inseridos nos poços de gel de agarose, que posteriormente é submetido à eletroforese em campo pulsátil. Para comparação, um marcador de peso molecular conhecido é adicionado ao gel de eletroforese. Os padrões das bandas de DNA dos isolados são comparadas entre si para determinação de sua origem (TENOVER et al., 1995).

A PFGE é capaz de separar os isolados em padrões eletroforéticos (pulsotipos) e é atualmente considerado o método *gold standard* para tipagem de *S. aureus*, de origem humana e animal (BANNERMAN et al., 1995; OLIVE; BEAN, 1999; ZADOKS et al., 2002). Como padrão para *S. aureus*, a enzima *SmaI* é comumente escolhida (TENOVER et al., 1995; CHUNG et al., 2000; MURCHAN et al., 2003).

Porém, apesar de PFGE ser o método mais discriminativo para determinar os pulsotipos, o método é difícil de ser padronizado e a análise dos resultados é relativamente subjetiva (TÜRKYLMAZ et al., 2010).

Técnicas moleculares já foram utilizadas para analisar a patogenecidade e a distribuição de genes patogênicos em cepas de *S. aureus* (FITZGERALD et al., 2001; PEACOCK et al., 2002; LØVSETH et al., 2004). Inúmeros estudos apontam para uma grande variedade de subtipos de *S. aureus* causadores de mastite bovina (SMITH, et al., 2005; MELLES et al., 2007; DASTMALCHI et al., 2009). Como existem muitas cepas de *S. aureus*, os isolados devem ser tipados para que a rota de transmissão e as fontes sejam conhecidas (STRUELENS et al., 1992, BOEREMA et al., 2006). A identificação

de clones de *S. aureus* envolvidos na mastite bovina é importante, pois pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de prevenção, baseado no uso de vacinas ou outras medidas profiláticas (COSTA et al., 2011).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral:

- Avaliar a habilidade da espécie *Staphylococcus aureus* em produzir biofilme e verificar sua relação com a transmissão desse agente no ambiente de ordenha via manipuladores e superfície de equipamentos e utensílios.

3.2. Objetivos Específicos:

- Verificar a presença de *Staphylococcus aureus* no leite de vacas acometidas de mastite subclínica, clínica, no leite de conjunto e em superfícies de mãos de ordenhadores, equipamentos e utensílios de propriedades leiteiras localizadas na região de Ribeirão Preto, São Paulo;
- Caracterizar os isolados identificados de *S. aureus* pelo perfil genotípico, pela PFGE, e verificar a prevalência de linhagens em cada ponto do processo de ordenha;
- Identificar linhagens isoladas de *S. aureus* capazes de produzir biofilmes em microplacas de poliestireno, bem como em superfícies de aço inox e silicone, comumente utilizados em equipamentos e utensílios de ordenha.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO UNIVERSO AMOSTRAL

Foram utilizadas 10 propriedades localizadas em região de grande importância na captação de leite no estado de São Paulo, próximas aos municípios de Franca (Região I) e Ribeirão Preto (Região II). Foram cadastradas as propriedades pertencentes às cooperativas locais. As amostras de leite cru (50 mL) foram coletadas diretamente dos tanques, após homogeneização do leite, com auxílio de concha esterilizada, em frascos esterilizados. As amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo até o Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos da FZEA/USP. Os fatores selecionados como de risco para a contaminação por *S. aureus* no leite cru, foram avaliados previamente com auxílio de um questionário (Anexo A), baseado nos regulamentos vigentes (BRASIL, 1997; BRASIL 2002).

Foram utilizados *swabs* estéreis para amostragem dos seguintes pontos:

- Utensílios da sala de ordenha: peneiras e baldes.
- Mãos de ordenhadores.
- Equipamentos: insufladores (2 por cada conjunto de ordenha) de todos os conjuntos de ordenhadeiras, antes e após a ordenha.

As propriedades foram subdivididas em 2 grupos contendo cinco propriedades cada, utilizando-se como critério de divisão a região pertencente de cada uma. Inicialmente, foram avaliados os seguintes itens de cada propriedade: higiene das instalações em geral, higiene da sala de ordenha, higiene dos equipamentos de armazenamento do leite, a higiene dos ordenhadores, as edificações onde os animais permanecem (estabulados e/ou a pasto), além das principais características de manejo, práticas de ordenha, medidas de prevenção de mastite, rotina de tratamentos e medicamentos habitualmente utilizados. Informações individuais dos animais foram cuidadosamente registradas para posterior análise dos resultados.

4.2. AMOSTRAGEM

As colheitas das amostras de leite (50 mL) foram realizadas em animais que apresentaram escore de CMT (*California Mastitis Test* – SCHALM; NOORLANDER, 1957), maior que um (escala de 1 a 5, sendo 1 o escore mínimo e 5 o máximo de inflamação). As amostras foram colhidas individualmente por animal, representando o leite ordenhado dos 4 tetos de cada vaca leiteira.

Foram também colhidas ao final de cada ordenha, em cada propriedade uma amostra (em duplicata) do tanque de resfriamento (50 mL/duplicata). As amostras foram acondicionadas em recipientes isotérmicos e conservadas com gelo reciclável até a chegada ao laboratório. As amostras não sofreram congelamento, sendo analisadas imediatamente após a chegada ao laboratório, para não haver interferência nos resultados das análises.

As colheitas ocorreram durante os meses de agosto de 2010 a janeiro de 2011, sendo que as amostras de leite foram colhidas mensalmente, totalizando seis amostragens em cada propriedade leiteira.

4.3. ANÁLISES LABORATORIAIS

4.3.1. Isolamento do *Staphylococcus aureus*

Para a identificação e enumeração foi utilizada a metodologia de Lancette; Bennett, (2001), onde placas de Petri contendo ágar Baird-Parker (BP, Merck, Alemanha) suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo receberam as amostras semeadas diretamente a partir do leite e também suas diluições (225mL de água peptonada esterilizada em 25mL da amostra). A partir de cada diluição, um volume de 0,1 mL foi colocado sobre o ágar e espalhado com auxílio de uma alça em L. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias características, que apresentaram cor negra e halo. Destas, até três colônias foram escolhidas para observação de sua morfologia pela coloração de Gram, e posteriormente repicadas para tubos com ágar tripticase soja (TSA, Merck, Alemanha) inclinado e incubadas por 24 horas a 35°C. No teste da produção de catalase, uma porção da colônia foi transferida para uma lâmina de vidro, com a adição uma gota de água oxigenada 30%. Como controle positivo, foi utilizada uma cepa de *S. aureus* (N315) e como controle negativo, uma de *Streptococcus* sp. O teste positivo foi revelado pela liberação de bolhas. A seguir, foi realizado o teste da coagulase em tubo, onde 0,5mL de plasma de coelho foi acrescido de um volume igual de uma cultura da cepa teste em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, Merck, Alemanha), incubada por 24 horas a 35°C. Os tubos foram incubados a 35°C por até 24 horas. O teste foi considerado positivo quando houve a coagulação da mistura.

As cepas identificadas como estafilococos coagulase positiva foram submetidas ao teste com o kit "Staphyclin" (Laborclin®). As cepas positivas formam grânulos devido à aglutinação, em até 6 segundos. Deve ser lembrado que procedimento igual foi repetido, usando-se o reagente não sensibilizado, que nunca aglutina, dado ser o controle negativo. A diferenciação entre as duas espécies *clumping* positivo (*S. aureus* e *S. intermedius*), foi realizada pela prova de VP – Voges-Proskauer, produção de acetoina (*S. aureus* positivo).

Para o cálculo de número de UFC/g, o número de colônias confirmadas foi multiplicado por 10 e pelo fator inverso de diluição da placa de contagem. Os isolados de *S. aureus* (duas de cada amostra) foram transferidos para criotubos contendo 1,5mL de BHI com 15% de glicerol, os quais foram armazenados em ultra-freezer a -80°C para análises posteriores.

4.3.2. Análise do DNA cromossômico por PFGE

A tipagem por PFGE foi realizada em todos os isolados de *S. aureus* obtidos nas amostragens, utilizando a enzima de restrição *SmaI* (New England, BioLabs, EUA) , conforme protocolo descrito por McDougal et al. (2003). Após 18-24 horas de incubação da amostra bacteriana em 4mL de caldo BHI, alíquota de 200µL foi transferida para um microtubo de centrífuga de 1,5mL e centrifugada por 2 minutos a 12.000g. A seguir, o sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuspensas em 150µL de solução tampão de Tris-EDTA (TE) (USB, USA) e 2,5µL de lisostafina (100µg/mL) (Sigma Aldrich, USA). Após homogeneização, 150µL de agarose *low melting* (SeaKem Gold Agarose, Cambrex) 1,8% em solução de Tris-Borato-EDTA (TBE) (Serva, Alemanha) 0,5X foram acrescentados ao tubo e o homogeneizado foi distribuído em moldes para preparação dos plugues (Bio-Rad, EUA). Após solidificação, os plugues foram incubados em solução Tris HCl 1M (USB, EUA); NaCl 2M (USB, EUA); EDTA tetrassódico 1M (USB, EUA); desoxicolato de sódio 2% (Sigma Aldrich, USA); sarcosil 5% (USB, EUA), Brij 5% (USB, USA) (EC) por 18 horas, a 37°C e lavados por quatro vezes com solução TE 1X. Após, um pedaço do plugue foi cortado, digerido com a enzima de restrição *SmaI* (New England, BioLabs, EUA) e submetido à eletroforese em campo pulsado, por 19 horas, a 14°C, a 6V/cm, com pulso inicial de 5s e pulso final de 40s, em gel de agarose a 1%. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução com 50 µL de brometo de etídio (Sigma Aldrich, USA) (10 mg/mL) em 500 mL de água destilada,

descolorado em água destilada e a imagem capturada, sob luz UV, em equipamento fotodocumentador modelo Gel Doc XR (Bio-Rad, EUA). O marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (New England, BioLabs, EUA) foi utilizado em todas as análises.

Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando-se o software de bioinformática BioNumerics (Versão 6.0, Applied Maths, Bélgica). Foram considerados os agrupamentos realizados pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) com amostras que apresentaram coeficiente de similaridade de $Dice \geq 80\%$, com otimização de 0,5% e tolerância de 1,25%. A capacidade discriminatória de PFGE foi calculada de acordo com o índice de diversidade de Simpson (HUNTER; GASTON, 1988), com a seguinte fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

Onde N é o número de isolados da população teste, s é o número total de tipos diferentes e n_j é o número de isolados representativos de cada tipo. O valor de D indica a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso em uma população teste serem alocados em diferentes grupos.

4.4. ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE BIOFILME POR *S. aureus*

4.4.1. Microplaca de poliestireno

A verificação da capacidade de produção de biofilme dos pulsotipos isolados de *S. aureus*, identificados pela técnica de PFGE, foi realizada de acordo o protocolo descrito por Stepanović et al. (2003). Cada isolado foi semeado em caldo TSB (caldo tripticase soja) (Merck, Alemanha) e incubado a 37°C/24h, sendo, a seguir, diluído até 10^8 UFC (escala 0,5 de MacFarland), utilizando-se TSB como branco. Uma alíquota de 200µl foi pipetada, em triplicata, nos poços de uma microplaca de 96 poços, com fundo chato (TPP, Suíça). Os isolados de *S. aureus* foram incubados por 48 horas sem agitação. Após o período de incubação, a placa foi lavada três vezes, com solução salina tamponada (PBS, pH 7,4, Laborclin®), secada à temperatura ambiente e corada com violeta cristal

1%, por 15 minutos. Após três lavagens com água destilada, a placa foi deixada para secar em temperatura ambiente. Em seguida, as bactérias coradas que aderiram na microplaca foram re-solubilizadas adicionando-se 200µL ácido acético glacial (30%) e deixado em repouso por 15 minutos. Posteriormente, o conteúdo foi transferido para uma outra microplaca e a mesma foi colocada em um leitor de ELISA (Labsystems, MultiSkan, software Genesis), com leitura a 570 nm. De acordo com Stepanović et al. (2003) o controle negativo (OD) é usado com base para os cálculos para a determinação dos parâmetros para considerar um isolado produtor ou não de biofilme (OD_c). Deste modo, os isolados foram classificados de acordo com a seguinte regra: $OD \leq OD_c$ = não produtor, $OD_c < OD \leq (2 \times OD_c)$ = fraco produtor, $(2 \times OD_c) < OD \leq (4 \times OD_c)$ = moderado produtor, $(4 \times OD_c) < OD$ = forte produtor. Em todas as análises, foram utilizados controles positivo (*S. epidermidis* ATCC 35.983) e negativo (*S. epidermidis* ATCC 12.228).

4.4.2. Microscopia de epifluorescência

O protocolo utilizado foi uma adaptação e compilação de dois protocolos: Shanks et al. (2003) e Chandra; Mukherjee; Ghannoum, (2008). Para a verificação da produção de biofilme em aço inox, a cepa guardada a -80°C ou em tubo contendo TSA inclinado foi semeada em BHI e posteriormente replaqueada para evitar qualquer contaminação em Ágar-Sangue (Merck, Alemanha) ou em Baird Parker. Depois do tempo de incubação respectivo de cada meio de cultura, uma colônia característica foi semeada em 2mL de caldo BHI dentro de um poço de uma microplaca de poliestireno de 24 poços (TPP, Suíça) contendo no fundo o cupom de aço inox (1x1cm), e outra com disco de silicone. As microplacas foram colocadas em estufa de 35°C por 48h sem agitação. Para o preparo do aço inox e do silicone, o protocolo de Marques (2005) foi seguido. Os cupons de aço e os discos de silicone foram limpos com acetona 100%, deixados por 1 hora em água destilada autoclavada com sabão neutro e enxaguados com água destilada autoclavada. Em seguida, realizou-se a limpeza com álcool 70° GL, secagem na estufa por pelo menos 15 minutos e autoclavagem por 15 minutos a 121°C.

Depois de 48h de incubação, os cupons de aço e discos de silicone foram retirados dos poços com pinças esterilizadas, lavados com água Mili-Q destilada, colocados em lâmina de vidro e deixados em temperatura ambiente para secagem. Acrescentou-se uma gota de solução de calcofluor (concentração final 0,05% Sigma Aldrich, EUA; *fluorescent brighter* 28) em cada uma das superfícies inertes, a luz ambiente foi

diminuída e esperou-se 5-10 minutos. A visualização dos biofilmes foi realizada em um microscópio óptico de epifluorescência Olympus BX60 (para cupons de aço inox), com câmera Olympus DP72 e software Olympus DP2-BSW 2.2, e também um microscópio MC 80 DX (para discos de silicone), com câmera Axioplan 2 e software Axio Vision 4. O comprimento de onda utilizado foi de 430nm. *S. epidermidis* 35.983 e *S. epidermidis* 12.228 foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente, e serviram como base para a análise das imagens. Após a visualização, os materiais foram autoclavados e descartados.

4.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

O peso molecular dos fragmentos obtidos nas análises por PFGE foi determinado pela comparação com marcador de peso molecular. A análise do padrão de bandas foi feita com auxílio de software BioNumerics (Versão 6.0, Applied Math, Bélgica). Os perfis encontrados foram demonstrados graficamente, por dendrogramas, construídos pelo mesmo programa.

Utilizou-se o teste qui-quadrado para comparar as frequências de amostras positivas para *S. aureus* obtidas nas duas regiões estudadas (Franca e Ribeirão Preto), adotando-se $\alpha=0,05$. Os procedimentos estatísticos foram efetuados de acordo com BERQUÓ et al., (1981).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERÍSTICAS DAS PROPRIEDADES AVALIADAS

A Tabela 1 apresenta as principais características das 10 propriedades visitadas. Foram visitadas 5 propriedades pertencentes à Região I (Franca), das quais todas são 5 produtoras de leite tipo cru resfriado. Na Região II (Ribeirão Preto), foram também visitadas 5 propriedades, sendo uma delas classificada como produtora de leite tipo A, uma como produtora de leite tipo B e 3 como produtoras de leite tipo cru resfriado.

As condições de higiene das propriedades foram avaliadas em linhas gerais considerando os seguintes itens: sala de ordenha, equipamento de ordenha, tanque de armazenamento do leite e condições dos ordenhadores. A avaliação dos itens foi realizada com base em questionário previamente preparado conforme a lista de verificação de Boas Práticas de Fabricação contidas na Resolução ANVISA nº 275 (BRASIL, 2002a). Foram consideradas como grupo 1 (boas condições) as propriedades que atenderam mais de oito dos seguintes itens: (1) mão de obra qualificada (com treinamento), (2) uso de luvas descartáveis durante a ordenha, (3) realização de *pré-dipping*, (4) realização de *pós-dipping*, (5) realização de algum teste para mastite clínica, (6) limpeza diária das instalações de ordenha com água corrente, (7) ambiente de ordenha calmo sem a presença de outros animais, (8) registro de dados, (9) acompanhamento veterinário e, (10) sala de ordenha com estrutura adequada. As propriedades classificadas como grupo 2 (condições regulares) foram aquelas que atenderam de cinco a oito dos quesitos descritos acima, e as propriedades classificadas como grupo 3 (condições ruins) foram aquelas que atenderam menos de cinco quesitos. No total, das 10 propriedades, apenas uma foi classificada como grupo 1, quatro propriedades foram classificadas como grupo 2 e cinco como grupo 3.

Quanto ao sistema de ordenha utilizado, das 10 propriedades avaliadas, 3 possuíam sistema de ordenha canalizada em sala de ordenha com fosso, 4 possuíam sistema de ordenha tipo balde ao pé em estabulação coberta, e 3 ordenha manual. Somente 3 propriedades (G, H e J) realizavam regularmente o teste CMT, enquanto que nas demais propriedades (A, B, C, D, E, F e I) os responsáveis desconheciam o teste. Muitas vezes o teste de caneca de fundo preto também não era realizado (propriedades A, B, C, D e I).

Tabela 1. Características gerais das propriedades leiteiras avaliadas nas Regiões de Franca (I) e Ribeirão Preto (II), São Paulo.

	Propriedade									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Tipo de leite	Cru resfriado	Cru resfriado	Cru resfriado	Cru resfriado	Cru resfriado	Cru resfriado	B	Cru resfriado	Cru resfriado	A
Localização	Região I	Região I	Região I	Região I	Região I	Região II	Região II	Região II	Região II	Região II
Produção total/dia (L)	30	150	30	300	110	300	425	250	300	38.000
Grupo de produção*	1	1	1	2	1	2	2	1	2	2
Faz teste CMT/CCS	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim
Tipo de ordenha	Manual	Balde ao pé	Manual	Manual	Balde ao pé	Balde ao pé	Canalizada	Canalizada	Balde ao pé	Canalizada
Condições de higiene	3	3	3	3	2	3	1	2	3	1
Faz teste mastite clínica	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
<i>Pré-dipping</i>	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
<i>Pós-dipping</i>	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Desinfecção teteiras entre ordenhas	-	Não	-	-	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
Resfriamento do leite	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Tipo de resfriador	Expansão	Expansão	Expansão	Expansão	Expansão	Expansão	Expansão	Expansão	Expansão	Expansão

*Grupo 1: produção diária menor do que 250 L/dia e Grupo 2: produção diária maior que 250 L/dia.

Com as informações obtidas observou-se que todas as propriedades da Região I (Franca) forneciam leite do tipo cru refrigerado, enquanto que as da Região II (Ribeirão Preto) forneciam leite do tipo cru refrigerado, tipo A e B. Quanto à produção diária de leite, as propriedades da Região I produziam de 30 a 300L, sendo que nenhuma delas realizava o teste de CMT ou fazia controle de mastite subclínica ou clínica, com exceção da propriedade E, que realizava o teste da caneca de fundo preto para detectar mastite clínica no momento da ordenha. De acordo com o Conselho Nacional de Mastite dos EUA, rebanhos leiteiros que não adotam medidas de controle para mastite apresentam cerca de 50% das vacas infectadas, em média, em dois quartos (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1996). As mesmas propriedades da Região I também não possuíam ordenha canalizada, sendo que três delas realizavam ordenha manual e duas pelo sistema balde ao pé. Para essa região, em relação ao aspecto condições de higiene de ordenha a propriedade A foi classificada como a de pior condição, pois não realizava as etapas básicas de higiene dos tetos das vacas antes e após a ordenha, denominados pré e pós-*dipping*, respectivamente. A propriedade E foi classificada como a melhor dessa região, pois realizava as etapas de higiene antes e após a ordenha, e também, o teste da caneca de fundo preto frequentemente. A Figura 1 exemplifica as condições gerais das instalações de ordenha de algumas propriedades da Região I.

Figura 1. Condições das instalações de ordenha em propriedades da Região I.

As propriedades localizadas na Região II (Ribeirão Preto) apresentaram características heterogêneas entre si. A faixa de produção de leite diária dessa região foi de 250 a 38.000L. As propriedades G, H e J realizavam o CMT ou acompanhavam a mastite subclínica pela CCS. Em relação ao sistema de ordenha, duas propriedades dessa região apresentavam sistema balde ao pé e três possuíam sistema de ordenha mecânica. A propriedade I apresentou a pior condição de Boas Práticas de Fabricação no ambiente de ordenha deste grupo, pois foi a única que não praticava nenhum método de detecção para mastite subclínica e clínica, e também, não realizava a higienização correta dos tetos das vacas. É de fundamental importância a conscientização dos produtores de leite sobre o prejuízo representado pela mastite subclínica, não só em relação à qualidade do leite, mas, sobretudo pela acentuada redução da produção leiteira dos quartos afetados, sendo que os gastos com as medidas preventivas representam, em média, menos de 8,0% do prejuízo total representado principalmente pela redução na produção dos animais com mastite subclínica (COSTA et al., 1999). Já a propriedade J, apresentou Boas Práticas de Fabricação adequadas no ambiente de ordenha, sendo a única da Região II que realizava a desinfecção do conjunto de ordenhadeiras entre as ordenhas. A Figura 2 ilustra as instalações de ordenha da propriedade J.

Figura 2. Instalações de ordenha da propriedade J.

Em todas as propriedades havia tanques de expansão para armazenar o leite após a ordenha a uma temperatura em torno de 4°C, desta maneira atendeu-se a adequação das normas exigidas pela legislação, e também, observou-se a eficiência do processo de resfriamento, determinada pela manutenção da temperatura adequada do tanque. Segundo o MAPA (2002), o tanque comunitário deve ser instalado em local adequado, provido de paredes, cobertura, pavimentação, iluminação, ventilação e condição de acesso apropriada, e ainda possuir ponto de água corrente de boa qualidade e local próprio para higienização das mãos, latões e demais utensílios. A única propriedade que

possuía tanque de expansão comunitário era a propriedade A, pertencente à região I. As outras propriedades não compartilhavam seus tanques de resfriamento.

Em síntese, observou-se que as propriedades analisadas apresentaram heterogeneidade em suas características, abrangendo diversos sistemas de produção e de ordenha, diferentes métodos de detecção de mastite, diferenças significantes quanto às práticas de higiene no ambiente de ordenha e de produção leiteira diária.

5.2. OCORRÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* NO LEITE E AMBIENTE DE ORDENHA

Durante os seis meses de amostragem, foram coletadas 220 amostras de leite individual de vacas, 120 amostras (*swabs*) de mãos de manipuladores, 389 amostras (*swabs*) de equipamentos e utensílios e 120 amostras de leite de tanque de expansão, totalizando 849 amostras. A ocorrência de *S. aureus* nas referidas amostras pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2 Ocorrência de *S. aureus* em propriedades leiteiras das Regiões I (Franca) e II (Ribeirão Preto), Estado de São Paulo, no período de agosto de 2010 a janeiro de 2011.

Propriedade/ Região	Leite individual de vacas (n/N) (%)	Mãos de manipuladores (n/N) (%)	Ordenhadeira e utensílios (n/N) (%)	Leite de tanque de expansão (n/N) (%)	Total (n/N) (%)
A/I	2/25 (8,0%)	0/12(0,0%)	1/24 (4,1%)	3/12 (25,0%)	6/73 (8,2%)
B/I	0/11 (0,0%)	0/12(0,0%)	1/39 (2,5%)	0/12 (0,0%)	1/74 (1,3%)
C/I	0/0 (0,0%)	0/12(0,0%)	1/29 (3,4%)	2/12 (0,0%)	3/53 (5,6%)
D/I	1/15 (6,6%)	0/12(0,0%)	3/43 (6,9%)	3/12 (25,0%)	7/82 (8,5%)
E/I	0/1 (0,0%)	0/12(0,0%)	0/34 (0,0%)	1/12(8,3%)	1/59 (1,7%)
F/II	4/32 (12,5%)	0/12(0,0%)	0/48 (0,0%)	5/12 (25,0%)	9/104 (8,6%)
G/II	0/33 (0,0%)	0/12(0,0%)	0/48 (0,0%)	0/12(0,0%)	0/105 (0,0%)
H/II	0/37(0,0%)	1/12 (8,3%)	0/36 (0,0%)	2/12(8,3%)	3/97 (3,1%)
I/II	5/33 (15,5%)	3/12 (25,0%)	7/40 (17,5%)	7/12 (58,3%)	22/97 (22,6%)
J/II	0/33(0,0%)	0/12(0,0%)	1/48 (2,0%)	3/12 (25,0%)	4/105 (3,8%)
Total	12/220 (5,4%)	4/120 (3,3%)	14/389 (3,6%)	26/120 (21,6%)	56/849 (6,7%)

N = número total de amostras

N = número de amostras positivas para *S. aureus*

Do total de 849 amostras coletadas, 56 (6,6%) foram positivas para *S. aureus*. Não houve diferença significativa no percentual de positividade de *S. aureus* entre as duas regiões analisadas ($p=0,11$). Na Região I (Franca, propriedades A a E), foram identificadas 18 (5,3%) de amostras positivas, já na Região II (Ribeirão Preto, propriedade F a J), houve 38 (7,5%) amostras positivas. A propriedade I teve o maior número de isolados, 22 (22,7%), enquanto nenhuma amostra de *S. aureus* foi isolada da propriedade G. Doze (5,4%) amostras de leite individual de vacas, 26 (21,6%) de tanque de expansão e quatro (3,3%) de manipuladores foram positivas para *S. aureus*. Quatorze amostras (3,3%) foram positivas para equipamentos e utensílios.

Foram encontrados diferentes percentuais de amostras positivas para *S. aureus* em todas as dez propriedades analisadas. É possível observar que, em amostras de leite individual de vaca, a porcentagem variou de 0 a 15,5%. Os valores podem ter variado devido a vários fatores, tais como localização das propriedades, tipo de leite produzido e sistema de ordenha. Das quatro propriedades em que se encontraram amostras positivas para *S. aureus* em leite individual de vaca, todas são produtoras de leite cru resfriado. Esperava-se que em propriedades produtoras de leite tipo B, caracterizadas por possuírem normas e padrões mais rígidos de higiene e qualidade do leite, fosse possível que bactérias mais seletivas como o *S. aureus* encontrassem condições mais favoráveis de crescimento neste tipo de sistema.

No Brasil, vários estudos reportaram a ocorrência de *S. aureus* em leite de vacas com mastite (LANGE et al., 1999, REIS; SILVA; BRESCIA, 2003; ZAFALON et al., 2007). Em estudos epidemiológicos de *S. aureus* em amostras de leite os autores, Langenegger et al. (1970); Nader Filho et al. (1983); Costa, (1986); Vianni; Nader Filho, (1989); Langoni et al. (1990); Langoni et al. (1991); Castrejón e Perea, (1994); Obritzhauser; Deutz; Fuks, (1995) e Trindad et al. (1999a) obtiveram diferentes percentuais de amostras positivas que variavam de 27,3% a 85,0%. Estes percentuais são maiores do que os percentuais de amostras positivas de *S. aureus* isoladas a partir de leite de vacas do presente estudo.

No Estado do Paraná, foram registrados casos de mastite com o envolvimento deste patógeno em 17,97% das amostras coletadas (BELLOTI et al., 1997), sendo este percentual mais próximo dos percentuais de amostras de leite individual de vacas, encontrados no presente estudo. Similarmente, Wilson, Gonzales e Das, (1997) avaliaram rebanhos nos Estados Unidos da América, encontrando 9,1% de casos de mastites causados por *S. aureus*.

De acordo com Godkin & Leslie (1993) os microrganismos encontrados no leite total do rebanho originam-se dos úberes infectados, da superfície dos úberes e dos tetos, ou de uma variedade de outras fontes do ambiente da fazenda. No presente estudo, os percentuais encontrados de utensílios e equipamentos positivos para *S. aureus* variaram de 0,0% a 17,5%, enquanto que, para manipuladores, os valores foram de 0,0% a 25%. Os percentuais encontrados são relevantes, tendo em vista que os bocais da ordenhadeira e as mãos dos ordenhadores são considerados como as principais vias de transmissão para *S. aureus* (GRINDAL, 1988; MYLLYS et al., 1997).

O *S. aureus* pode ser transmitido entre vacas ou entre tetos durante a ordenha, e pode também ocorrer, por meio de mãos do ordenhador, do pano para secagem dos tetos e das ordenhadeiras. Com isso, ressalta-se a importância do pré e do *pós-dipping* e de cuidados com a higiene durante o procedimento de ordenha (FAGUNDES et al., 2010).

A presença de *S. aureus* nos tanques de expansão variou de 0 a 58,3%. Em estudo similar, Fagundes et al. (2010) encontraram 10,8% de amostras positivas para *S. aureus*. Embora o *S. aureus* possa ser isolado de diferentes locais em um rebanho, a principal fonte de eliminação deste patógeno no leite são as glândulas mamárias infectadas (ROBERSON et al., 1994). Assim, *S. aureus* isolado de amostras do leite do tanque é também considerado como originário de infecção intramamária (BARTLETT et al. 1993, GODKIN; LESLIE 1993), o que indica a importância da coleta do leite total das vacas no tanque de expansão.

A qualidade microbiológica do leite do tanque de expansão já foi estudada em diversos trabalhos. De acordo com estudos anteriores nos estados da região sul do país, a frequência de amostras positivas para contagem bacteriana total variou de 18,0% a 83,0% (NERO et al., 2005; ARCURI et al., 2006).

Leite cru e produtos lácteos produzidos a partir deste leite são frequentemente contaminados por *S. aureus*. Essa bactéria foi encontrada em 75% das amostras analisadas de leite bovino e 96% de leite de cabra de tanques de expansão de propriedades da Noruega (JØRGENSEN et al., 2005b). Guven et al. (2010) estudaram a presença de *S. aureus* em leite cru e produtos lácteos na Turquia e encontraram 23,2% de amostras positivas em leite cru.

A análise de amostras do leite total do rebanho representa uma alternativa interessante, em relação à coleta e análise do leite individual das vacas leiteiras (FARNSWORTH 1993, GODKIN; LESLIE 1993), para o isolamento de bactérias patogênicas específicas, especialmente os patógenos contagiosos da mastite,

Staphylococcus aureus e *Streptococcus agalactiae* (GONZÁLES et al., 1986, BARTLETT et al., 1999; GODKIN; LESLIE 1993). Essa alternativa é prática e menos dispendiosa, pois possibilita a avaliação do conjunto de animais. A coleta do leite pode ser realizada diretamente nos rebanhos ou na plataforma de recepção da indústria, o que oferece a vantagem de permitir a triagem de rebanhos com rapidez e sem custos com o transporte (BRITO et al., 1998).

Embora o exame microbiológico do leite do tanque ofereça vantagens, é importante salientar que ele não substitui o exame de animais ou quartos mamários individuais no diagnóstico das infecções intramamárias, por isso no presente estudo foram coletadas amostras de leite tanto de vacas quanto do tanque.

5.3. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS ISOLADAS DE *Staphylococcus aureus*

Os fragmentos de DNA foram digeridos pela enzima de restrição *Sma*I, obtendo-se 56 perfis determinados pela técnica de PFGE, conforme apresentado na Figura 3. Uma cepa conhecida de *S. aureus* (N 315) foi também tipada como uma linhagem de referência. Houve grande diversidade genética entre as cepas tipadas pela técnica. Dos 56 isolados de *S. aureus*, somente 3 foram agrupados com 100% de similaridade (D5O4, D5T1 e D5V1). De acordo com os critérios descritos por McDougal et al. (2003), trinta e um pulsotipos foram definidos. Com o uso do programa BioNumerics (Versão 6.0, Applied Math) um dendrograma foi determinado (Figura 3), e a partir da porcentagem de similaridade, 12 grandes *clusters* foram revelados. O índice de diversidade de Simpson foi de 99,6%, o que indica um alto valor de discriminação da enzima *Sma*I.

A importância de investigações epidemiológicas baseadas na técnica de PFGE para *S. aureus* já foram demonstradas em diversos estudos na área humana e veterinária (MIDDLETON et al., 2002; MONTESINOS et al., 2002; ZADOKS et al., 2002). De fato, a PFGE demonstrou ser uma boa opção para esse tipo de estudo, sendo que protocolos padronizados estão disponíveis (McDOUGAL et al., 2003).

Além de fazer um levantamento da presença de *S. aureus* no ambiente de ordenha, um dos propósitos deste estudo foi comparar os isolados. Para estudos epidemiológicos de *S. aureus*, o PFGE é considerado o padrão-ouro (MAGALHÃES et al., 2005). O isolamento de um mesmo pulsotipo na mesma propriedade pode indicar a

disseminação do patógeno no ambiente. Igualmente, a presença do mesmo pulsotipo em diferentes períodos de amostragem pode indicar a persistência da linhagem no ambiente.

Figura 3. Dendrograma criado a partir do padrão eletroforético por PFGE de amostras de *S. aureus* (coeficiente de similaridade de Dice, otimização de 0,5%, tolerância de 1,25%; método de clusterização: UPGMA).

Embora tenha sido constatada a presença de *clusters* (agrupamentos) com cepas altamente relacionadas, os resultados demonstraram alta diversidade entre os isolados de *S. aureus*. Os *clusters* D e E (Figura 3) evidenciam a persistência de uma cepa similar em leite do tanque de expansão. Também no *cluster* D é possível observar a disseminação de uma cepa similar em diferentes pontos de amostragem (leite de vaca individual e leite do tanque). Os *clusters* B, F e K indicam a disseminação de uma linhagem de *S. aureus* semelhante em diferentes pontos de amostragem durante a mesma visita. Além disso, a obtenção de linhagens semelhantes das duas regiões, em que não havia ligação direta entre eles, ilustra a possibilidade de uma ampla disseminação de algumas cepas sobre uma vasta área geográfica (*clusters* C e H).

Um estudo semelhante, mas em um universo amostral diferente, em laticínio do estado de Goiás, também encontrou grande diversidade entre as cepas, demonstrando uma falta de predominância de um clone endêmico do meio ambiente. André et al. (2008) afirmam que o leite cru parece ser a fonte mais provável de contaminação por *S. aureus* em queijo. Tondo et al. (2000) analisaram 19 cepas de *S. aureus* provenientes de leite cru de um laticínio no sul do Brasil, e verificaram que todas elas foram não relacionadas entre si. Cepas de *Staphylococcus* spp. podem variar consideravelmente em virulência e potencial epidemiológico (ZADOKS et al., 2002). Para controlar a propagação de infecções estafilocócicas, as fontes de contaminação e mecanismos de transmissão devem ser identificadas. Zadoks et al. (2002) encontraram relação entre as cepas isoladas de leite do tanque e individual de leite de vaca e também entre diferentes utensílios. Houve também relação das mãos dos manipuladores com os outros pontos amostrados. No presente estudo, um dos isolados de *S. aureus* (pulso tipo P07) proveniente das mãos de um manipulador de ordenha da propriedade I, na 2ª coleta, apresentou alta similaridade com os isolados de utensílios na mesma propriedade (presença em um mesmo *cluster*).

A presença de isolados com características genéticas únicas para cada rebanho indica que reservatórios nos rebanhos podem servir para manter a infecção nas vacas. Assim, o controle de mastite causada por *S. aureus* depende da identificação destes reservatórios (ROBERSON et al., 1994; ZADOKS et al., 2002). Estudos moleculares como o de Zadoks et al. (2002) confirmaram correlação entre isolados de ordenhadeiras e isolados de vacas com mastite causada por *S. aureus*. Também encontraram diferença entre isolados de leite de vaca com os tetos de vacas. Em outro estudo, Jørgensen et al.

(2005) encontraram semelhança entre isolados de mãos de ordenhadores e leite de vacas acometidas com mastite.

A grande diversidade genética entre os isolados do presente estudo vai ao encontro do que Lange et al. (1999) afirmaram, ou seja, diferentemente dos isolados de *S. aureus* em infecções nosocomiais, os isolados do presente trabalho mostraram um grande número de pulsotipos sugerindo uma considerável heterogeneidade entre os isolados. Deste modo, os dados obtidos indicam que *S. aureus* pode ser transmitido entre vacas em uma mesma fazenda, mas também disseminada entre as fazendas e regiões diferentes, o que corrobora com o que Cabral et al. (2004) afirma em estudo também realizado no Brasil.

5.4. PRODUÇÃO DE BIOFILMES EM SUPERFÍCIES INERTES

A capacidade da produção de biofilme foi avaliada por dois métodos fenotípicos. O ensaio em microplaca de poliestirenos de fundo chato e visualização da produção do biofilme com o uso do calcofluor e microscópio de epifluorescência. A Figura 4 indica o resultado de um ensaio de produção de biofilme em microplaca de poliestireno. O calcofluor é uma substância que torna fluorescente a matriz extracelular com composição polissacarídica ou de celulose. Para a visualização em microscópio de fluorescência foram escolhidos os materiais: aço inox e silicone. A escolha dos materiais aço inox e silicone foi feita por serem componentes de utensílios e equipamentos no ambiente de ordenha e laticínio. O silicone é utilizado nas juntas de equipamentos de ordenha e também para produção de cateter, que é um dispositivo importante na área médica e local de possível aderência bacteriana e produção de biofilme (DONLAN, 2001). De acordo com Maukonen et al. (2003) o aço inox é o material mais comum usado na indústria, sendo também o material utilizado no tanque de expansão. Os ensaios da produção de biofilme em peças de silicone e aço inox foram realizados também com o intuito de comparar esses dois tipos de material, hidrofóbico e hidrofílico respectivamente.

Figura 4. Ilustração de microplaca de fundo chato com o biofilme formado pelos pulsotipos, visualizados após coloração pelo corante violeta cristal (1%).

Os resultados obtidos nos ensaios em microplaca são considerados quantitativos, enquanto que a visualização dos biofilmes no microscópio foi somente considerada positiva (presença de biofilmes) ou negativa (ausência de biofilme visível). A Figura 5 apresenta as fotomicrografias do biofilme formado em aço inox (controle positivo) e do aço inox sem biofilme (controle negativo), observados ao microscópio ótico de epifluorescência, os quais serviram como padrões para a determinação da produção ou não de biofilme pelos pulsotipos em cupom de aço inox.

Figura 5. Fotomicrografias do cupom de aço inox sob microscopia de epifluorescência. A) Controle positivo contendo biofilme formado por *S. epidermidis* ATCC 35983. B) Controle negativo para crescimento de biofilme. Aumento: 20X.

A partir dos pulsotipos identificados pela técnica de PFGE, foram realizados os ensaios da produção de biofilme, com exceção do pulsotipo P07, o qual não pode ser avaliado no ensaio em microplaca, e do pulsotipo P10, que não foi avaliado nos ensaios em aço inox, devido a problemas técnicos. Nos ensaios de produção de biofilmes em microplaca, 19 (63,3%) dos 30 pulsotipos avaliados foram produtores de biofilme. Nos

ensaios conduzidos em aço inox, 13 (43,3%, N=30) pulsotipos foram positivos e, para o silicone, todos os pulsotipos foram negativos. Tanto amostras positivas para *S. aureus* em leite (individual de vaca ou de conjunto), quanto isolados ambientais e de manipuladores, foram produtoras de biofilme.

Os ensaios em microplaca foram realizados em três ensaios separados, ou seja utilizando-se três microplacas ao longo do experimento. Como o experimento foi conduzido em triplicata, os resultados foram expressos pela média dos valores encontrados em cada microplaca. A Figura 6 apresenta os resultados obtidos nas três microplacas para determinação da capacidade dos isolados de *S. aureus* em formar biofilmes.

Figura 6. Médias de densidade óptica (nm) obtidas nos ensaios de produção de biofilmes pelos pulsotipos isolados de *S. aureus*. (a), (b) e (c) representam as microplacas do primeiro, segundo e terceiro ensaio, respectivamente.

A Tabela 3 apresenta uma compilação dos pulsotipos e os pontos de coleta dos isolados de *S. aureus* que apresentaram resultados positivo e negativo para produção de biofilmes no ensaio em microplaca.

Tabela 3: Incidência de pulsotipos de *S. aureus* produtores e não produtores de biofilme no ensaio em microplaca, nos respectivos pontos de isolamento.

Ponto de isolamento	Código do pulsotipo	
	Produtores de biofilme	Não produtores de biofilme
Tanque de expansão	P01, P04, P06, P12, P13,	P18, P20, P27, P30
Leite individual de vaca	P14, P15, P23, P25	P03, P19
Mão de manipulador+Ordenhadeira e utensílios ¹	P05, P11, P16, P22	
Ordenhadeira e utensílios ¹	-	-
Ordenhadeira e utensílios ¹ +Leite de vaca+Mão de manipulador+Tanque de expansão	P02, P17, P24	P08, P28
Ordenhadeira e utensílios ¹ +Tanque de expansão	P09	-
Leite de vaca+Tanque de expansão	P21	P26
Mão de manipulador	-	P10, P29
Total de pulsotipos analisados	P31	-
	19	11

¹ Peneiras e baldes.

Observou-se uma grande quantidade (N=9) de pulsotipos formadores de biofilmes isolados somente do tanque de expansão das propriedades avaliadas. Este fato é preocupante sob o aspecto de Saúde Pública, pois representa um ponto permanente de contaminação por *S. aureus* no leite do rebanho a ser entregue no laticínio. O elevado número de isolados capazes de formar biofilmes no tanque de expansão pode indicar falhas na higienização deste equipamento. A presença de *S. aureus* isolados de ordenhadeiras e utensílios formadores de biofilme também pode indicar falha na higienização uma vez que é esperado que haja higienização dos equipamentos entre ordenhas e até mesmo mais do que uma vez ao dia. Durante as coletas foi possível observar falha no uso da temperatura ideal da água usada para a sanitização, como também a ausência de detergente específico para a limpeza. É importante observar que a pasteurização pode eliminar o *S. aureus*, porém se houver produção das enterotoxinas as mesmas não são inativadas pela pasteurização, cocção normal ou outros tratamentos térmicos usuais podendo levar a intoxicação alimentar dos consumidores do leite ou dos derivados (JAY, 1994).

O pulsotipo P09 foi encontrado em todos os pontos amostrados do ambiente de ordenha, incluindo amostras de leite, sendo também um pulsotipo produtor de biofilme. Sua existência pode indicar a persistência do patógeno no ambiente como também correlacionar com a mastite nos animais, sua eliminação através do leite e presença no tanque de expansão. Trabalhos com cepas de *S. aureus* produtores de biofilme isolados de vacas com mastite ou ambiente de laticínio já foram relatados. Sharma; Anand. (2002) obtiveram apenas 8,0% dos isolados de *S. aureus* em ambiente de laticínio produtor de biofilme, Já um estudo realizado por Fox et al. (2005) encontrou 41,0% dos isolados de *S. aureus* em leite de vaca, 24,7% dos isolados da pele do tetos e 14,7% de utensílios e equipamentos produtores de biofilme. Dos 16 isolados de *S. aureus*, Oliveira et al. (2006) encontraram 3 isolados (18,75%) produtores de biofilme.

A Tabela 4 indica os resultados dos pulsotipos positivos para a visualização da produção de biofilme em aço inox. É possível observar que não houve produção de biofilme em pulsotipo contendo somente isolados de mão de manipulador e também da combinação de isolados de utensílios e tanque de expansão. Novamente o pulsotipo P09 foi considerado produtor de biofilme. Os pulsotipos formadores de biofilmes isolados somente do tanque de expansão foram encontrados em maior quantidade (N=5)

Tabela 4. Incidência de pulsotipos de *S. aureus* produtores e não produtores de biofilme no ensaio em aço inox com visualização em microscopia de epifluorescência, nos respectivos pontos de isolamento.

Ponto de isolamento	Código do pulsotipo	
	Produtores de biofilme	Não produtores de biofilme
Tanque de expansão	P01, P12, P20, P23, P25	P04, P06, P13, P14, P15, P18, P27, P30
Leite individual de vaca	P03, P16, P24	P05, P11, P19, P22
Mão de manipulador+Ordenhadeira e utensílios ¹	P07	-
Ordenhadeira e utensílios ¹	P08, P28	P02, P17
Ordenhadeira e utensílios ¹ +Leite de vaca+Mão de manipulador+Tanque de expansão	P09	-
Ordenhadeira e utensílios ¹ +Tanque de expansão	-	P26
Leite de vaca+Tanque de expansão	P21	P29
Mão de Manipulador	-	P31
Total de pulsotipos analisados	13	17

¹ Peneiras e baldes.

A partir da realização das duas metodologias foi possível correlacionar os pulsotipos produtores de biofilme em ambas as metodologias, somente em um delas e em nenhuma metodologia. É possível observar que a maior parte dos pulsotipos produtores de biofilme para ambas as metodologias são isolados de tanque de expansão. O pulsotipo P09 continha um isolado de mão de manipulador que foi capaz de produzir biofilme, porém houve pulsotipos como P07, P21 e P28 são formados por isolados de *S. aureus* ambientais. Para melhor observação da produção de biofilme, as Tabelas 5, 6 e 7 indicam por propriedade, ponto isolado, número de coleta e pulsotipo quais isolados foram capazes de produzir biofilme somente em aço inox, em microplaca e em ambas as metodologias respectivamente.

Tabela 5. Pulsotipos de *S. aureus* positivos somente no ensaio de produção de biofilme em aço inox, nos respectivos pontos de isolamento.

Propriedade	Código do Isolado	Ponto de amostragem	Coleta	Pulsotipo
A	A2T2	Tanque de expansão	2	P23
C	C4O4	Peneira	4	P08
C	C2T2	Tanque de expansão	2	P09
D	D3T1	Tanque de expansão	3	P25
D	D5O4	Balde	5	P09
D	D5T1	Tanque de expansão	5	P09
D	D5V1	Leite de vaca	5	P09
D	D5O2	Balde	5	P09
D	D6T1	Tanque de expansão	6	P09
D	D6O4	Peneira	6	P09
F	F2T1	Tanque de expansão	2	P01
F	F3T1	Tanque de expansão	3	P12
F	F4T2	Tanque de expansão	4	P09
F	F5T2	Tanque de expansão	5	P01
F	F5V2	Leite de vaca	5	P03
H	H6M2	Mão de manipulador	6	P09
I	I1T1	Tanque de expansão	1	P25
I	I2M1	Mão de manipulador	2	P07
I	I2M2	Mão de manipulador	2	P09
I	I2O3	Ordenhadeira	2	P07
I	I2O2	Ordenhadeira	2	P28
I	I2O5	Ordenhadeira	2	P28
I	I4V1	Leite de vaca	4	P16
I	I4T1	Tanque de expansão	4	P20
I	I5O3	Ordenhadeira	5	P21
I	I5T2	Tanque de expansão	5	P21
I	I6T1	Tanque de expansão	6	P09
I	I6O5	Ordenhadeira	6	P24
I	I6V3	Leite de vaca	6	P09
J	J3T2	Tanque de expansão	3	P09

Tabela 6. Pulsotipos de *S. aureus* positivos somente no ensaio de produção de biofilme em microplaca, nos respectivos pontos de isolamento.

Propriedade	Código do Isolado	Ponto de amostragem	Coleta	Pulsotipo
A	A2T2	Tanque de expansão	2	P23
C	C2T2	Tanque de expansão	2	P09
D	D3T1	Tanque de expansão	3	P25
D	D5O4	Balde	5	P09
D	D5T1	Tanque de expansão	5	P09
D	D5V1	Leite de vaca	5	P09
D	D5O2	Balde	5	P09
D	D6T1	Tanque de expansão	6	P09
D	D6O4	Peneira	6	P09
E	E3T2	Tanque de expansão	3	P06
F	F2T1	Tanque de expansão	2	P01
F	F3T2	Tanque de expansão	3	P04
F	F3T1	Tanque de expansão	3	P12
F	F4V3	Leite de vaca	4	P05
F	F4T2	Tanque de expansão	4	P09
F	F5T2	Tanque de expansão	5	P01
F	F5V4	Leite de vaca	5	P22
H	H6T1	Tanque de expansão	6	P15
H	H6M2	Mão de manipulador	6	P09
I	I1M1	Mão de manipulador	1	P31
I	I1T1	Tanque de expansão	1	P25
I	I2V2	Leite de vaca	2	P11
I	I2V3	Leite de vaca	2	P22
I	I2M2	Mão de manipulador	2	P09
I	I4O6	Ordenhadeira	4	P02
I	I4T2	Tanque de expansão	4	P14
I	I4V1	Leite de vaca	4	P16
I	I5O3	Ordenhadeira	5	P21
I	I5T2	Tanque de expansão	5	P21
I	I6O5	Ordenhadeira	6	P24
I	I6T1	Tanque de expansão	6	P09
I	I6V3	Leite de vaca	6	P09
J	J3T2	Tanque de expansão	3	P09
J	J4T1	Tanque de expansão	4	P13
J	J4O1	Ordenhadeira	4	P17
J	J5T2	Tanque de expansão	5	P13

Tabela 7. Pulsotipos de *S. aureus* positivos nos ensaios de produção de biofilme em aço inox e microplaca, nos respectivos pontos de isolamento.

Propriedade	Código do Isolado	Ponto de amostragem	Coleta	Pulsotipo
A	A2T2	Tanque de expansão	2	P23
C	C2T2	Tanque de expansão	2	P09
D	D5O4	Balde	5	P09
D	D5T1	Tanque de expansão	5	P09
D	D5V1	Leite de vaca	5	P09
D	D5O2	Peneira	5	P09
D	D6T1	Tanque de expansão	6	P09
D	D6O4	Peneira	6	P09
D	D3T1	Tanque de expansão	3	P25
F	F2T1	Tanque de expansão	2	P01
F	F5T2	Tanque de expansão	5	P01
F	F4T2	Tanque de expansão	4	P09
F	F3T1	Tanque de expansão	3	P12
H	H6M2	Mão de manipulador	6	P09
I	I2M1	Mão de manipulador	2	P09
I	I6T1	Tanque de expansão	6	P09
I	I6V3	Leite de vaca	6	P09
I	I4V1	Leite de vaca	4	P16
I	I5O3	Ordenhadeira	5	P21
I	I6O5	Ordenhadeira	6	P24
I	I1T1	Tanque de expansão	1	P25
I	I5T2	Tanque de expansão	5	P21
J	J2T2	Tanque de expansão	2	P09

O método da microplaca de fundo chato permanece entre os ensaios mais utilizados para verificação da capacidade bacteriana em formar biofilmes, sendo também considerado *gold standard* entre as metodologias fenotípicas por possuir grande especificidade, sensibilidade e valores positivos preditivos (MATHUR et al., 2006). Porém, esse método investiga a quantidade de biofilme produzido espectrofotometricamente, mas não é capaz de afirmar que as bactérias em condições agregadas coincidem com a formação de biofilme. Para confirmar a produção de biofilme foi realizada a microscopia nos materiais inertes. Observa-se que, dos 19 pulsotipos produtores de biofilme em microplaca, somente 8 foram também produtores na superfície do aço inox, o que confirma que as bactérias podem aderir na placa de poliestireno sem a necessidade de estarem envolvidas em uma matriz exopolissacarídea. Os pulsotipos que foram considerados produtores de biofilme em ambos os ensaios foram P01, P09, P12, P16, P21, P23, P24 e P25, conforme apresentado na Tabela 7.

Isolados de *S. aureus* encontrados por Fox et al. (2005) a partir de *swabs* intramamários foram significativamente mais capazes de produzir biofilme do que isolados externos como exemplo equipamentos de ordenha o que sugere que a produção de biofilme é um fator de risco para infecções intramamárias. No presente estudo tanto amostras de leite (individual e de tanque) quanto amostras ambientais (utensílios e equipamentos) foram positivas para a produção de biofilme. Sabe-se que bactérias envolvidas em biofilme têm a capacidade de manter-se tanto em superfícies bióticas e abióticas. Essa persistência no ambiente pode ser sugerida como a fonte dos pulsotipos identificados em diferentes pontos de amostragem como o P01, P09 e P21.

A principal fonte de contaminação do leite e produtos lácteos está nos equipamentos que são limpos e sanitizados de forma imprópria (GIBSON et al., 1999; JESSEN; LAMMERT, 2003). A formação de biofilme em equipamentos de laticínios pode levar a sérios problemas de higiene e perda econômica pela deterioração de alimentos e comprometimento de equipamentos (BREMER; FILLERY; MCQUILLAN, 2006; GRAM et al., 2007). No presente estudo, entretanto, os isolados de utensílios foram fracos produtores de biofilmes, ao contrário de isolados provenientes de amostra de leite. Mesmo assim, ressalte-se a importância dos dados obtidos nos utensílios de ordenha, uma vez que micro-organismos envolvidos em biofilme pode ser uma fonte de contaminação.

Sugere-se que quando a mastite é ocasionada por *S. aureus* produtor de biofilme, a severidade da infecção diminui, mas a capacidade de colonização da bactéria aumenta (BASELGA et al 1993). No presente trabalho, não foi possível realizar o diagnóstico de mastite nos rebanhos avaliados, porém a amostragem do leite individual de vacas foi realizada em animais que apresentavam o teste positivo de CMT. Nestas amostras o percentual médio de isolamento de *S. aureus* foi 5,4% (Tabela 2), porém na propriedade I (região II), o percentual chegou a 15,5%. Nesta propriedade, foram isolados 8 pulsotipos capazes de produzir biofilmes em placas de poliestireno e no aço inox (Tabela 7), confirmando assim que a formação de biofilme pode ser uma importante vantagem seletiva para certos isolados de *S. aureus* (FOX et al., 2005), permitindo a persistência da bactéria no teto (BASELGA et al., 1993; CUCARELLA et al., 2001).

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados pode-se concluir que:

- *Staphylococcus aureus* foi isolado em diferentes pontos de amostragem no ambiente de ordenha de propriedades leiteiras nas duas regiões avaliadas (Franca e Ribeirão Preto), obtendo-se percentuais de positividade em amostras de leite individual de vacas e leite de tanque entre 0 a 15,5% e 0 a 58,3%, respectivamente.
- O elevado percentual de isolados em leite de tanque de expansão indica falhas na higienização do mesmo, evidenciando um problema de saúde pública ao se considerar que no Brasil muitas vezes o leite é consumido sem pasteurização.
- Para mãos de manipuladores, o percentual de amostras positivas para *S. aureus* variou entre 0 a 25,0%, enquanto que, para ordenhadeiras e utensílios, os valores foram de 0 a 17,5%.
- A partir do dendrograma gerado com a técnica de PFGE, obteve-se 31 diferentes pulsotipos que apresentaram similaridades entre isolados ambientais e de leite individual de vacas e de tanque de expansão.
- O pulsotipo P09 foi encontrado em diferentes coletas e em diferentes propriedades o que sugere persistência da linhagem nas propriedades e grande disseminação no ambiente.
- Dos pulsotipos de *Staphylococcus aureus* avaliados quanto à capacidade de produzir biofilme *in vitro*, 19 (63,3%) foram positivos no ensaio em microplaca, e 13 (43,3%) em aço inox, sendo que nenhum pulsotipo foi capaz de produzir biofilme em silicone.
- A ocorrência de pulsotipos de *S. aureus* capazes de formar biofilmes indica a persistência do patógeno em diversos pontos no ambiente de ordenha, bem como provável envolvimento dos mesmos com casos de mastite e sua eliminação através do leite, ressaltando a necessidade de práticas de higiene para prevenir a formação de biofilmes nas propriedades estudadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARNELA, K. et al. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. **Food Science and Technology**, Oxford, v.40, p.1041–1048, 2007.

ABDEL ALL; A.A.A., DARDIR; H.A. Hygienic quality of local traditional fermented skimmed milk (laban rayb) sold in Egypt. **World Journal of Dairy and Food Sciences**, Lancaster, v.4, p. 205–209, 2009.

ACCO, M. et al. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.20, p. 489–493, 2003.

AGUILAR, B.; ITURRALDE, M. Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.82, p.165–175, 2001.

AKINEDEN, Ö. et al. Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from Milk of Cows with Mastitis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v.8, p.959-964, 2001.

ALMEIDA, R.A.; FANG, W.; OLIVER, S.P. Adherence and internalization of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells are mediated by host cell proteoglycans. **Microbiology Letters**, Amsterdam, v.177, p.313–317, 1999.

ALMEIDA, R.A.; OLIVER, S.P. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. **Microbial Pathogenesis**, Londres v.31, p.205–212, 2001.

ANDRÉ, M.C.D.P.B. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. **Food Control**, Guildford, v.19, p.200–207, 2008.

ANNEMÜLLER C., LAMMÉLER, Ch., ZSCHÖCKS, M. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.69 217-224, 1999.

ARAGON-ALEGRO, L.C. et al. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. **Food Control**, Guildford, v.18, p.630–634, 2007.

ARCHER, G.L. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.26, p.1179–1181, 1998.

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

ARCURI, E.F. et al. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, p.440–446, 2006.

ARRIZUBIETA, M.J. et al. Calcium inhibits Bap-dependent multicellular behaviour in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.186, p.7490–7498, 2004.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.61, p.1–10, 2000.

BANNERMAN, T.L. et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, p.551–555, 1995.

BANWART, G.J. **Basic food microbiology**, 2 ed., India: CBS Publishers and Distributors, 1998

BASELGA, R. et al. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity**, Washington, v.61, p.4857–4862, 1993.

BARLETT, P.C.; MILLER, G.Y. Mastitis microbiology: what is considered normal? **Agri-Practice**, Santa Barbara, v.14, p.12-14, 1993.

BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; ZADOKS, R.N. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regime in the therapeutic success of bovine

Staphylococcus aureus mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, p.1877–1895, 2006.

BECK, H.S.; WISE, W.S.; DODD, F.H. Cost benefit analysis of bovine mastitis in the UK. **Journal of Dairy Research**. Cambridge, v.59, p.449–460, 1992.

BEEKEN, K.E.; BLEVIS, J.S.; SMELTZER, M.S. Mutation of *sarA* in *Staphylococcus aureus* limits biofilm formation. **Infection and Immunity**, Washington, v.71, p.4206–4211, 2003.

BELOTI, V.E.; MÜLLER, E.; FREITAS, J.C.; METTIFOGO, E. Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. **Semina**, Londrina, v.18, p. 45-53, 1997.

BERGONIER, D. et al. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**, Indore, v.34, p.689–716, 2003.

BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística**. São Paulo: EPU; 1981.

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

BOTREL, M.A. et al. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhone-Alpes, France. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v.7, p. 479–487, 2010.

BRABES, K.C.S. et al. Identificação e Classificação de Enterotoxinas Produzidas por *Staphylococcus* spp. Isolados de Ar de Ambiente, Manipuladores e de Superfícies em uma Indústria de Laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v. 58, p. 33-38, 2003.

BRAMLEY, A.J., Mastitis. In: ANDREWS, A.H., et al.; **Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle**. (eds) Boston: Blackwell Scientific Publication, 1992, p. 289–300.

BRANDLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, Londres, v.164, p.116–128, 2002.

BRADLEY, A. J. et al. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. **Veterinary Record**, Londres, v.160, p.253–258, 2007.

BRASIL. Portaria nº 368, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 19697, 1997.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os 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 União**, Brasília, Anexo IV, Seção 1, p. 13, 2002.

BREMER, P.J.; FILLERY, S.; McQUILLAN, A.J. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.106, p.254–262, 2006.

BRITO, M.A.V.P. et al. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Brazilian Journal of Veterinarian Research**, Rio de Janeiro, v.18, p.39-44, 1998.

BRITO, M.A.V.P. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Juiz de Fora, v.51, p.129-135, 1999.

BRITO, M.A.V.P. et al. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Juiz de Fora, v. 53, p.531-537, 2001.

BROUILLETTE, E. et al. 3' 5'-Cyclic diguanylic acid reduces the virulence of biofilm-forming *Staphylococcus aureus* strains in a mouse model of mastitis infection. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, v.49, p.3109–3113, 2005.

CAMPOS, M.M.C. **Avaliação de mastite bovina enfocando o California Mastitis Test, diagnóstico microbiológico sensibilidade in vitro**. 2000.105p. Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2000.

CAPURRO, A. et al. Genotypic variation among *Staphylococcus aureus* isolates from cases of clinical mastitis in Swedish dairy cows. **The Veterinary Journal**, Londres, v.185, p.188–192, 2010.

CASTREJÓN, M. E.;PEREA, C. R. Estudio de la resistencia a antimicrobianos que presentan los microorganismos productores de mastitis en vacas Holstein. In: CONGRESO PANAMERICANO DE CIENCIAS VETERINARIAS, 1994, Acapulco, Acapulco: **Acapulco Proceedings**. 1994. p. 45.

CERCA, N. et al. Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state. **Infection and Immunity**, Washington, v.74, p.4849–4855, 2006.

CERI, H. et al. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.37, p.1771–1776, 1999.

CHAMBERS, S.T.; PEDDIE, B.; PITHIE, A. Ethanol disinfection of plastic-adherent micro-organisms. **The Journal of Hospital Infection**, Londres, v.63, p.193–196, 2006.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.K.; GHANNOUM, M.A. *In vitro* growth and analysis of *Candida* biofilms. **Nature Protocols**, Londres, v.3, p.1909–1924, 2008.

CHEN, Y.H. et al. Quantification and variability analysis of bacterial cross-contamination rates in common food service tasks. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, p.72–80, 2001.

CHEN, J.; ROSSMAN, M. L.; PAWAR, D.M. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. **LWT – Food Science and Technology**, Oxford, v.40, p.249–254, 2007.

CHUNG, M. et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v.6, p.189–198, 2000.

CLUTTERBUCK, A.L. et al. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, 121, 1–17, 2007.

COSGROVE, S. E. et al. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.36, p.53–59, 2003.

COELHO, S.M.O. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Veterinarian Research**, Rio de Janeiro, v.29, p.369–374, 2009.

CONLEY, J. et al. Biofilm formation by group A streptococci: is there a relationship with treatment failure? **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, p.4043–4048, 2003.

COSTA, E. O. Etiologia bacteriana da mastite bovina no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.17, p.107-112, 1986.

COSTA, E.O. et al. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Rev Napgama**, São Paulo, v.2, p.16-20, 1999.

COSTA, G.M. et al. Population diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Research in Veterinary Science**, London, In Press, 2011

COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v.284 p.1318–1322, 1999.

CUCARELLA, C. et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**. Washington, v.183, p.2888–2896, 2001.

CUCARELLA, C. et al. Expression of biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. **Infection and Immunity**, Washington, v.70, p.3180–3186, 2002.

CUCARELLA, C. et al. Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v.72, p.2177–2185, 2004.

DASTMALCHI, S.H. et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.137, p.202–206, 2009.

DELUYKER, H.A., CHESTER, S.T., VAN OYE, S.N. A multilocation clinical trial in lactating dairy cows affected with clinical mastitis to compare the efficacy of treatment with intramammary infusions of a lincomycin/neomycin combination with an ampicillin/cloxacillin combination. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.22, p.274–282, 1999.

DEVRIESE, L.A., HOMMEZ, J. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy herds. **Research in Veterinarian Science**, Londres, v.19, p.23–27, 1975.

DONLAN, R.M. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.7, p.277–281, 2001.

DYKES, G.A., SAMPATHKUMAR, B., KORBER, D.R. Planktonic or biofilm growth affects survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.80, p.1–10, 2003.

FAGUNGES, H. et al. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw Milk produced in dairy Milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.41: p.376–380.

FARNSWORTH, R.J. Microbiologic examination of bulk tank milk. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v.9(3): 469–474, 1993.

FITZGERALD, J.R. Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. **Proceedings of National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.98, p.8821–8826, 2001.

FLINT, S. H.; BREMER, P. J.; BROOKS, J. D. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. **Biofouling**, Chur, v.11, p.81–97, 1997.

FORSYTHE, S. J.; HAYES, P.R., **Food hygiene, microbiology and HACCP**. 3 ed. [S.l.] Aspen Publishers, 1998.

FOX, L. K. et al. Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections as determined by phage typing: the effect of milking time

hygiene practices. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Ithaca, v.81p;83–193, 1991.

FOX, L.K.; GAY, J.M. Contagious mastitis in update on bovine mastitis. In: Anderson, K.L. (Ed.), *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Philadelphia v.9, p.475–487, 1993.

FOX, L.K. et al. Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* intramammary infections: the effect of milking time hygiene. **Cornell Vet**, Ithaca, v.81, p.183–193, 1991.

FOX, L.K.; ZADOKS, R.N.; GASKINS, C.T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.107, p.295–299, 2005.

FRANK, K.L.; PATEL, R. Activity of sodium metabisulfite against planktonic and biofilm *Staphylococcus* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Nova York, v.57, p.355–359, 2006.

FRENAY, H. et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. On the basis of protein A gene polymorphism. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** v.15, p.60–64, 1995.

FURLONG, J.; RIBEIRO, A.C.C.L. Controle da Mastite. Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento [MAPA]. **EMBRAPA**, Brasília, 2006. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_71_21720039240.html>. Acesso: novembro, 2011.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M.; Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.29, n.5, p.851–875, 2005.

GIBSON, H.J. et al. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.87, p.41–48, 1999.

GODDEN, S.M. et al. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.43, p.38–42, 2002.

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

GONZÁLEZ, R.N. et al. Relationship between mastitis pathogen numbers in bulk tank milk and bovine udder infections in California dairy herds. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.189, p.442-445, 1986.

GRAM, L. et al. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v.18, p.1165–1171, 2007.

GRINDAL, R.J. The role of the milking machine in mastitis. **British Veterinary Journal**, Londres, v.144, p.524-533, 1988.

GUVEN, K. et al. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in Turkey. **Journal of Food Safety**, Westport, v.30, p.196–212, 2010.

HALASA, T. et al. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v.29, p.18-31, 2007.

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

HARRAGHY, N. et al. Advances in in vitro and in vivo models for studying the staphylococcal factors involved in implant infections. **Internacional Journal Artificial Organ**, Milano, v.29, p.368–378, 2006.

HEIKENS, E. et al. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, p.2286–2290, 2005.

HENNEKINNE, J.K.; De BUYSER, M.L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food-poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. “Accepted Article”; doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x

HENSEN, S.M. et al. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. **Journal of Dairy Science** v.83, p.1966–1975, 2000a.

HENSEN, S.M. et al. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.418–429, 2000b.

HOOD, S.K.; ZOTTOLA, E.A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.37, p.145-153, 1997.

HOLAH, J.T.; KEARNEY, L.R. Introduction to biofilms in the food industry. In: **Biofilms: Science and Technology**, MELO, L.F., et al, [S.l.] Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1992, p.35-44.

HOLAH, J.T.; TAYLOR, J.H.; HOLDER, J.S. **The spread of *Listeria* by cleaning systems part II**. Technical Memorandum no.673. (eds) Chipping Campen, UK: Campden and Chorleywood Food Research Association. Jennings. 1993.

HOOKEY, J.V.; RICHARDSON, J.F.; COOKSON, B.D. Molecular typing of *Staphylococcus* spp. based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, n.4, p.1083-1089, 1998.

HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems. An application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.26, n.11, p.2465-2466, 1988.

JABLONSKY, L.M.; BOHACH, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M. P., Beuchat, L.R., Montville, T. J., eds. **Food Microbiology: Fundamentals and frontiers**. Washington, ASM Press, 1997. p. 353-376.

JANZEN, J.J: Economic losses resulting from mastitis. A review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.53, p.1151–1161, 1970.

JAY, J. M. **Microbiologia Moderna de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1994. 804 p.

JESSEN, B.; LAMMERT, L.. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.51, p.265–269, 2003.

JIANG, X.P.; DOYLE, M.P. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* on currency. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, p.805– 807, 1999.

JØRGENSEN, H.J. et al. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.99, p.158–166, 2005b.

JØRGENSEN, H.J.; MORK, T.; RORVIK, L.M. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.88, p.3810–3817, 2005c.

KAPUR, V. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, p.376-380, 1995.

KARAOLIS, D.K.R. et al. c-di-GMP (30-50-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell–cell interactions and biofilm formation. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Bethesda, v.49, p.1029–1038, 2005.

KARAKAWA, W.W. et al. Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.22 p.445-447, 1985.

KARAKAWA, W.W.; VANN, W.F. Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, Philadelphia, v.4, p.285-293, 1982.

KIRK, J.H., 1994. **Milk quality incentives**. Available Dairy Incentives Pay, 4th ed. [S.l.:s.n.], Disponível em: <www.cnr.berkeley.edu/ucce50/ag-labor/7dairy/05.pdf> Acesso: 01 de Novembro, 2011.

KLOOS, W.E.; SCHLEIFER, K.H. Genus IV. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (eds.), **Staphylococcus. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, p.1013–1035.

KOSSAIBATI, M. A.; ESSLEMONT, R. J. The costs of production diseases in dairy herds in England. **The Veterinary Journal**, Londres. v.154, p.41–51, 1997.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: review. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.42, p.9–27, 1998.

KUSUMANINGRUM, H. D. et al. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.85, p.227–236, 2003.

KUSUMANINGRUM, H. D. et al. Effects of antibacterial dishwashing liquid on foodborne pathogens and competitive microorganisms in kitchen sponges. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.65, p.61– 65, 2002.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins. In: DOWNES F. P; ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington:Apha, 2001. p. 387-403.

LANGE, C. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam v.67, p.127-141, 1999.

LANGENEGGER, H. et al. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.5, p.437, 1970.

LANGONI, H. et al. Aspectos etiológicos na mastite bovina. **Brazilian Journal of Veterinarian Research**, Rio de Janeiro, v.20:204-210, 1998.

LANGONI, H. et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 43, p. 507- 515, 1991.

LANGONI, H. et al. Mastite bovina subclínica: etiologia e sensibilidade bacteriana. **Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Pirassununga, v.14, n.1, p.11-31, 1990.

LANGSRUD, S. et al. Bacterial disinfectant resistance – a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.51, p.283–290, 2003.

LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella typhimurium* on parsley. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.109, p.229–233, 2006.

LARSEN, H.D. et al. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam. 76:153–162, 2000.

LARSEN, H.D. et al. The dynamics of *Staphylococcus aureus* intramammary infection in nine Danish dairy herds. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, 71:89–101, 2000.

LASA, I.; PENADES, J.R., Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, Paris. v.157, p.99–107, 2006.

LATASA, C. et al. Biofilm associated proteins. **Comptes Rendus Biologies**, Paris. v.329, p.849–857, 2006.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Different responses of planktonic and attached *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* to sanitizer treatment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, p.368–379, 1999.

LØVSETH, A.; LONCAREVIC, S.; BERDAL, KG. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.42, p.3869–3872, 2004.

LUES, J.F.R.; VAN TONDER, I. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. **Food Control**, Guildford, v.18, p.326–332, 2007.

MAH, T.F.; O TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.9, p.34–39, 2001.

MAGALHÃES, V.D.; FERREIRA, B.C.; DARINI, A.L. Eletrofores em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.64, p.155–151, 2005.

MAMO, W.; LINDAHL, M.; JONSSON, P. Enhanced virulence of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis induced by growth in milk whey. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam. v.27, p.371–384, 1991.

MAKAYA, P.V. Distribution and antibiotic resistance patterns of common mastitis pathogens (Gram-positive cocci) in selected dairy herds of three dairy sectors in Zimbabwe. **Zimbabwe Veterinary Journal**, Salisbury, v.29, p.132–139, 1996.

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

MATHUR, T. et al. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: and evaluation of three different screening methods. **Indian Journal of Medical Microbiology**, New Delhi, 24, 25–29, 2006.

MATOS, J.S. et al. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, p.1544-1549, 1991.

MAUKONEN, J. et al. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.30, p.327-356, 2003.

McDOUGAL, L.K. et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United States: Establishing a National Database. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, p.5113–5120, 2003.

MELCHIOR, M.B.; FINK-GREMMELS, J.; GAASTRA, W. Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. **Journal of Veterinary Medicine Series B Infectious Disease and Veterinary Public Health**, Budapeste, v.53, p.326–332, 2006a.

MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infection? **The Veterinary Journal**, Londres, v.171, p.398–407, 2006b.

MELLES, D.C. et al. Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.69, p.371–375, 2007.

MELO, P.C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite subclínica bovina.** 2008. 122p. Dissertação (Mestrado Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP, Jaboticabal, 2008.

MIDDLETON, et al. Use of pulsed Field gel electrophoresis for detecting differences in *Staphylococcus aureus* strain populations between dairy herds with different cattle importation practices. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.129 p.387–395, 2002.

MITTELMAN, M.W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, p.2760–2764, 1998.

MONTESINOS, I. et al. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, p.2119–2125, 2002.

MONTVILLE, R.; CHEN, Y.H.; SCHAFFNER, D.W. Glove barriers to bacterial cross-contamination between hands to food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.64, p.845–849, 2001.

MOSTELLER, T.M.; BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.56: p.34-41, 2003.

MURCHAN, S. et al., Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, p.1574–1585, 2003.

MYLLYS, V. et al. Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.51, p.245-251, 1997.

NADER FILHO, A. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite tipo B. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.35, n.5, p.621-630, 1983.

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

NEAVE, F.K. et al. Control of Mastitis in the Dairy Herd by Hygiene and Management. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.52, p.696-707, 1969.

NERO, L.A. et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: Perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, p.191–195, 2005.

NORMANNO, G. et al. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.115, p.290–296, 2007.

OBRITZHAUSER, W.; DEUTZ, A.; FUCHS, K. Vergleich von Klinischer und Bakteriologischer Untersuchung bei Akutmastiten von Milchkühen. **Tierärztl Umsch**, Konstanz, v. 50, p. 31-41, 1995.

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

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

OLIVEIRA, M. et al. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 124, pp 187–191, 2007.

OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, p10-16, 1999.

OLSON, M.E. et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.66, p.86–92, 2002.

OSTERGAARD, S. et al. A stochastic model simulating pathogen specific mastitis control in a dairy herd. **Journal of Dairy Science**, Champaign. v.88, p.4243–4257, 2005.

OWENS, W.E. et al. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, p.313–317, 1997.

PARIZZI, S.Q.F. **Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela Microscopia de Epifluorescência e Contagem em Placas**. 2000, 58p. Dissertação

(Mestrado Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, 2000.

PEACOCK, S.J. et al. Virulent combinations of adhesins and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v.70, p.4987–4996, 2002.

PINTO, B.; CHENOLL, E.; AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.28, p.340–352, 2005.

POMPERMAYER, D.M.C.; GAYLARDE, C.C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food microbiology**, Londres, v.17, p.361-365, 2000.

POUTREL, B. et al. Prevalence of capsular polysaccharide types 5 and 8 among *Staphylococcus aureus* isolates from cow, goat, and ewe milk. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.26, p.38-40, 1988.

PYÖRÄLÄ, S.H.; PYÖRÄLÄ, E.O. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows: 487 cases (1989–1995). **Journal of The American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.212, p.407–412, 1998.

RABELLO, R.F. **Susceptibilidade aos antimicrobianos e diversidade genética de amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isoladas de casos de mastite subclínica no Estado do Rio de Janeiro**. 2003. 100p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2003.

REINOSA, E. B. et al. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. **Microbiological Research**, Jena, v.163, p.314—322, 2008.

REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo. Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, p.651–658, 2003.

ROBERSON, J.R. et al. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, p.:3354- 3364, 1994.

ROSENGREN, A. et al. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.144, p.263–269, 2010.

ROHDE, H. et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. **Biomaterials**, Surrey, v.28, p.1711–1720, 2007.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experimental and observation leading to development of California mastitis test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 130, n. 5, p. 199-204, 1957.

SCOTT, E.; BLOOMFIELD, S.F. The survival and transfer of microbial-contamination via cloths, hands and utensils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford v.68, p. 271–278, 1990.

SEARS, P.M.; MCCARTHY, K.K. Management and treatment of staphylococcal mastitis. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, Philadelphia, v.19, p.171–185, 2003.

SHANKS, R.M.Q. et al. Heparin Stimulates *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. **Infection and Immunity**, Washington, v.73, p. 4596–4606, 2005.

SHARMA, M.; ANAND, S.K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry - a case. **Food Control**, Guildford, v.13, p.469-477, 2002.

SHARMA, M.; ANAND, S.K. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. **Food Microbiology**, Londres, v.19, p.627–636, 2002a.

SHIM, E.H.; SHANKS, R.D; MORIN, D.E: Milk loss and treatment costs associated with two treatment protocols for clinical mastitis in dairy cows **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87: p.2702–2708, 2004.

SMITH, E.M. et al. Multilocus sequence typing of intercontinental bovine *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.43, p.4737–4743, 2005.

da SILVA, E.R.; do CARMO, L.S.; da SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.106, p.103–107, 2005.

SILVA, W. P. et al. 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, p.103-106, 2000.

SIHORKAR, V., VYAS, S.P. Biofilm consortia on biomedical and biological surfaces: delivery and targeting strategies. **Pharmaceutical Research**, Nova York, v.18, p.1254–1427, 2001.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, Oxford, v.43, p.573–583, 2010.

SOL, J. et al. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.278–284, 2000.

SOMERS, E.B.; WONG, A.C. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat-meat residue. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.67, p.218–2229, 2004.

SOUTO, L.I. et al. Relationship between occurrence of mastitis pathogens in dairy cattle herds and raw-milk indicators of hygienic-sanitary quality. **Journal of Dairy Research**. Cambridge, v.75, p.121–127, 2008.

STEPANOVIĆ, S. et al. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, Londres, v.20, p.339-343, 2003.

STRUELENS, M.J. et al. Epidemiologic Typing and Delineation of Genetic Relatedness of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Macrorestriction Analysis of Genomic DNA by Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, p. 2599-2605, 1992.

SUTRA, L.; POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.40, p.79–89, 1994.

SWARTZ, R.; JOOSTE, P.J.; NOVELLO, J.C. Bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus* strains isolated from Bloemfontein dairy herds. **Journal South African Veterinary Association**, Pretoria, v.56, p.69–73, 1985.

TAKEUCHI, S. et al. Variation of the agr locus in *Staphylococcus aureus* isolates from cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.79, p.267–274, 2001.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, v.18, p.7-20, 1997.

TENOVER, F.C. et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.407–415, 1994.

TRINIDAD, P.; NICKERSON, S. C.; ALLEY, T. K. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, p. 107-114, 1990a.

TONDO, E.C. et al. Assessing and analysing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.46, p.1108-1114, 2000.

TÜRKYLMAZ, S. et al. Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Milk. **Zoonoses Public Health**, Berlin, v.57, p.197-203, 2010.

VANDERHAEGHEN, W. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.138, p.606–625, 2010b.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.92, p.179–185, 2003.

VERAN, J. Biofouling in food processing: biofilm or biotransfer potential? **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v.80, p.292–298, 2002.

VIANNI, M.C.E.; NADER FILHO, A.R.P. Determinação do número de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* em amostras de leite de vacas com mastite subclínica. **Ciência Veterinária**, Jaboticabal, v. 3, p. 5-6, 1989.

VIANNI M.C.E.A.; NADER FILHO A.R.P.; LANGENEGGER, J. **Frequência de isolamentos de *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa na mastite subclínica em bovinos e sua influência na produção láctea**. Arqs Uni-v. Fed. Rural Rio de J. v.15, p.187-92, 1992.

VIEIRA, M.J.; MELO, L.; PINHEIRO, M.M. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. **Biofouling**, Chur, v.7, p.67–80, 1993.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M.-L. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.3366–3370, 2002.

WATANABE, E. T. **Avaliação do uso de antibióticos por via intramamária e sistêmica no tratamento de mastite clínica em vacas em lactação e sub-clínica na interrupção da lactação**. 1999. 121p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas - USP, São Paulo, 1999.

WHIST, A.C.; OSTERAS, O.; SOLVEROD, L. Association between isolation of *Staphylococcus aureus* one week after calving and milk yield, somatic cell count, clinical mastitis, and culling through the remaining lactation. **Journal of Dairy Research**. Cambridge, v.76, p.24–35, 2009.

WIEDMANN, M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v.85, n.2, p.524-531, 2002.

WILSON, D.J. et al. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, p.1664–1670, 1999.

WILSON, D. J., GONZALES, R. N., DAS, H. H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 2592-2598, 1997.

WIRTANEN, G.; MATTILA-SANDHOLM, T. Removal of foodborne biofilms - comparison of surface and suspension tests Part I. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, Londres, v.25, p.43-49, 1999a.

WIRTANEN, G.; MATTILA-SANDHOLM, T. Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to a chlorine sanitizer Part II. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, Londres, v.25, p.50-54, 1999b.

WIRTANEN, G., SAARELA, M., & MATTILA-SANDHOLM, T. Biofilms impact on hygiene in food industries. In: BRYERS, J. D., (eds), **Biofilms II: Process analysis and applications**. [S.l.:s.n.], p. 327-372, 2000.

WONG, A.C.L. Biofilm in food processing environments. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, p.2765-2770, 1998.

ZADOKS, R.N. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulse-field gel electrophoresis, and binary typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, p.3894-3902, 2002.

ZADOKS, R.N.; WATTS, J.L. Species identification of coagulase-negative staphylococci genotyping is superior to phenotyping. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.68, p.1100-1109, 2008.

ZACHEUS, O.M. et al. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. **Water Research**, Nova York, v.34, p.63-70, 2000.

ZAFALON, L.F. et al. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, p.577-585, 2007.

ZHANG, S.; IANDOLO, J.; STEWART, C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **Microbiology Letters**, Amsterdam, v.168, p.227-233, 1998.

ZHAO, P. et al. Development of a model for evaluation of microbial crosscontamination in the kitchen. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, p.960- 963, 1998.

ZOBELL, C.E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.46, p.39–56, 1943.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry-Should it the be a concern? **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.23, p.125-148, 1994.

ANEXOS

ANEXO A - Questionário para caracterização das Propriedades Leiteiras

Itens de Verificação	Resposta
ORDENHA	
Tipo de ordenha	Manual () Balde ao pé () Canalizado ()
Produção diária de leite	_____ Litros
Roupa própria para ordenha (padrão:SIM)	Sim Não
É realizada tricotomia dos pêlos do úbere? (padrão:SIM)	Sim Não
É realizado pré-dipping? (padrão:SIM)	Sim Não
É utilizado papel toalha para secagem dos tetos? (padrão: SIM)	Sim Não
É reutilizado? (padrão: NÃO)	Sim Não
Os ordenhadores usam luvas? (padrão:SIM)	Sim Não
Os ordenhadores mantêm as mãos limpas? (padrão:SIM)	Sim Não
É realizado o pós-dipping? (padrão:SIM)	Sim Não
O local é iluminado adequadamente? (padrão:SIM)	Sim Não
Há calçamento no curral de espera? (padrão:SIM)	Sim Não
O curral de espera é limpo (seco, sem acúmulo de esterco)? (padrão:SIM)	Sim Não
O chão da sala de ordenha é lavado freqüentemente? (padrão:SIM)	Sim Não
O chão é lavado entre as ordenhas? (padrão:SIM)	Sim Não
Há moscas no curral de espera, de saída e sala de ordenha? (padrão:NÃO)	Sim Não
O chão do curral de espera e saída são lavados entre as ordenhas? (padrão:SIM)	Sim Não
EQUIPAMENTOS/UTENSÍLIOS	
Há água quente para limpeza dos equipamento/utensílios? (padrão:SIM)	Sim Não
Pré- Enxágüe: é utilizado água quente (40°C)? (padrão:SIM)	Sim Não
É utilizado detergente alcalino (pH >11 e cloro = 140 ppm)? (padrão:SIM)	Sim Não
Enxágüe ácido: é realizada limpeza com água morna por 5 minutos com adição de detergente ácido (pH<3)? (padrão:SIM)	Sim Não
Na pré-ordenha é passada água clorada (100 a 200 ppm) por 5 minutos? (padrão:SIM)	Sim Não
TANQUE DE LEITE	
A temperatura do leite no resfriador está entre 4°C e 7°C? (padrão:SIM)	Sim Não
Há odor no resfriador? (padrão:NAO)	Sim Não
É realizada agitação no resfriador? (padrão:SIM)	Sim Não
Esse ciclo é automático? (padrão:SIM)	Sim Não
A higienização do resfriador é feita diariamente? (padrão:SIM)	Sim Não
É feita a Pré-lavagem do tanque: um ciclo de água morna (35-45°C)? (padrão:SIM)	Sim Não

Ciclo de limpeza: é utilizado detergente alcalino (pH >11 e cloro = 130 ppm) na limpeza com água quente (50°C)? (padrão:SIM)	Sim	Não
Enxágüe ácido: é realizada limpeza com água morna com adição de detergente ácido (pH<3)? (padrão:SIM)	Sim	Não
É feita a sanitização com solução de iodo (25 ppm) ou cloro (130 ppm) sem enxágüe? (padrão:SIM)	Sim	Não
É utilizada escova própria para limpeza do resfriador? (padrão:SIM)	Sim	Não
A pessoa entra no resfriador para realizar a lavagem? (padrão:NAO)	Sim	Não
Se sim, há uma bota especial para este fim? (padrão:SIM)	Sim	Não
O leite é recolhido diariamente? (padrão:SIM)	Sim	Não
ALIMENTAÇÃO		
Uso de silagem	Sim	Não