

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MULTIPLEX PCR
PARA A DETECÇÃO DE *Staphylococcus aureus*,
Streptococcus agalactiae E *Escherichia coli* EM
AMOSTRAS DE LEITE BOVINO, OBTIDAS DE
TANQUES DE EXPANSÃO**

MARCELLA ZAMPOLI TRONCARELLI

Botucatu-SP
AGOSTO 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MULTIPLEX PCR
PARA A DETECÇÃO DE *Staphylococcus aureus*,
Streptococcus agalactiae E *Escherichia coli* EM
AMOSTRAS DE LEITE BOVINO, OBTIDAS DE
TANQUES DE EXPANSÃO**

MARCELLA ZAMPOLI TRONCARELLI

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

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni

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

Troncarelli, Marcella Zampoli.

Padronização da técnica de multiplex PCR para a detecção de
Staphylococcus aureus, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* em
amostras de leite bovino, obtidas de tanques de expansão / Marcella Zampoli
Troncarelli. – Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Orientador: Helio Langoni

Capes: 50502034

1. Bovino de leite. 2. Bactérias. 3. Leite – Contaminação. 4. Reação em
cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Bactérias; Biologia molecular; Bovinos; Diagnóstico; Leite de
mistura; Mastite.

Nome do Autor: Marcella Zampoli Troncarelli

Título: PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MULTIPLEX PCR PARA A DETECÇÃO DE *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* E *Escherichia coli* EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO, OBTIDAS DE TANQUES DE EXPANSÃO.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Helio Langoni
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu-SP

Profa. Titular Elizabeth Oliveira da Costa Freitas Guimarães
Membro Titular
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP – São Paulo-SP

Profa. Dra. Deolinda Maria Vieira Filha Carneiro
Membro Titular
Departamento de Sanidade Animal
Instituto Federal Catarinense – Araquari-SC

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
Membro Titular
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu-SP

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
Membro Titular
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu-SP

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos
Membro suplente
Departamento de Nutrição e Produção Animal
FMVZ – USP – Pirassununga-SP

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites
Membro suplente
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP – São Paulo-SP

Prof. Dr. Paulo Francisco Domingues
Membro suplente
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP – Botucatu-SP

Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha
Membro suplente
Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biociências – UNESP – Botucatu-SP

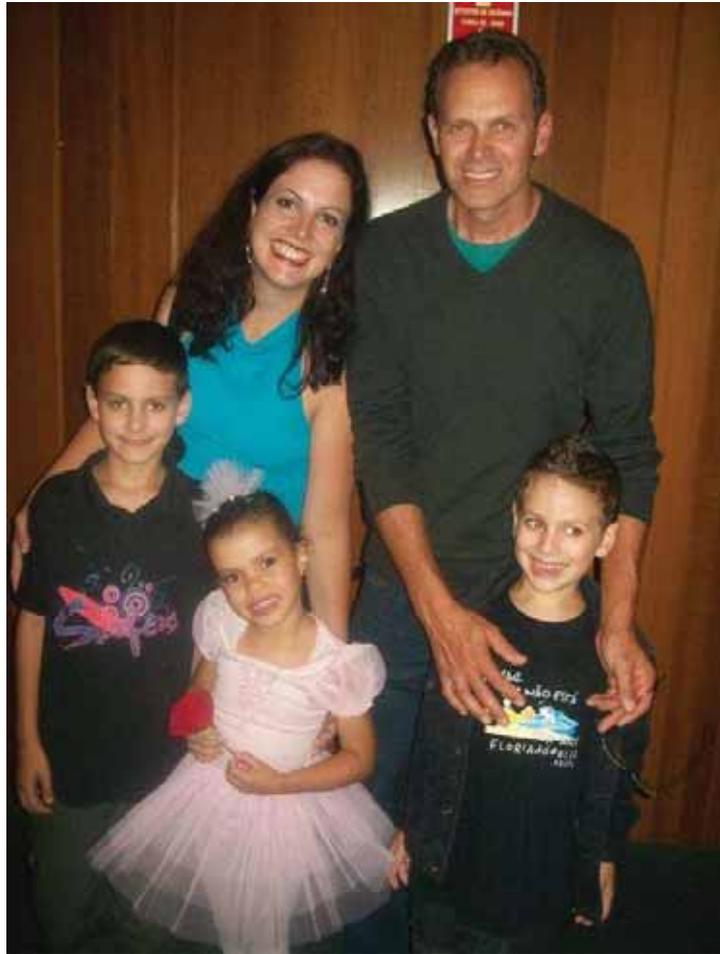
Data da Defesa: 05 de agosto de 2011.



*“Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.
 Onde houver ódio, que eu leve o amor,
 Onde houver ofensa, que eu leve o perdão,
 Onde houver discórdia, que eu leve a união,
 Onde houver dúvida, que eu leve a fé,
 Onde houver erro, que eu leve a verdade,
 Onde houver desespero, que eu leve a esperança,
 Onde houver tristeza, que eu leve a alegria,
 Onde houver trevas, que eu leve a luz.
 Ó Mestre, fazei que eu procure mais
 consolar que ser consolado;
 compreender que ser compreendido,
 amar, que ser amado.
 Pois é dando que se recebe
 é perdoando que se é perdoado,
 e é morrendo que se nasce para a vida eterna...”*

Oração de São Francisco de Assis

*D*EDICATÓRIA



Ao meu marido Luiz Alberto (Beto) e aos meus filhos Pedro, Tiago e Luana, que aquecem meu coração e enchem minha vida de luz ...

Ao meu sobrinho Lucas, que está começando a trilhar os maravilhosos caminhos da Medicina Veterinária.

A todos os que contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui, e que continuamente me estimulam a alcançar meus sonhos.

*A*GRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela maravilhosa bênção da vida e por Seu infinito Amor. Pelo conforto espiritual, em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis. Pela boa saúde. Por me conceder família e amigos tão maravilhosos. Pelo meu lar, pelo meu trabalho, pela oportunidade de estudar. Pelas dádivas alcançadas e ensinamentos constantes. Que eu possa sempre seguir Sua luz e trilhar o caminho do bem, ajudando a todos os que necessitarem de mim. Que o Senhor me ajude que, por meio de minha profissão, eu possa tornar melhor a vida dos animais e dos seres humanos. Amém.

Ao meu marido Luiz Alberto Troncarelli (Beto), pelo exemplo de humildade, honestidade, pureza de coração e amor. Pela compreensão e companheirismo. Pelo eterno sorriso. Por me confortar nos momentos difíceis. Por ser este anjo maravilhoso em minha vida...

Aos meus amados filhos Pedro, Tiago e Luana, querubins de luz que tornam a minha vida repleta de alegria, encanto e ternura. Que eu possa ser para vocês exemplo de dedicação e retidão, e que vocês sejam muito felizes!

Aos meus sogros Odila e Edmundo, pelo infinito amor (de pais) e pela ajuda com as crianças. Vocês contribuíram muito para que tudo isso fosse possível.

À minha mãe Zenaide, por toda a ajuda e amor e ao meu pai José Antonio, pela preocupação e palavras de apoio, mesmo de longe;

À minha querida irmã Gabriella, pelo carinho, amizade e apoio infinitos;

Ao meu irmão Victor Hugo, pelas palavras de incentivo;

Aos produtores de leite (proprietários e funcionários) que muito gentilmente autorizaram a realização das colheitas de amostras nas propriedades, entendendo a importância da realização desta pesquisa. Presto especial

homenagem a estes trabalhadores, que constituem parte importante da economia do país, e contribuem para que o leite bovino, alimento tão essencial, chegue à mesa do consumidor. O “retiro” leiteiro é um trabalho árduo, que exige dedicação diária, independente das condições climáticas.

A todos os animais envolvidos no estudo, por quem tenho extremo respeito e carinho. O contato com bovinos leiteiros sempre me enche de entusiasmo e felicidade! Esta é uma das maravilhas da profissão de Medicina Veterinária, pela qual tenho grande paixão...

Ao Prof. Márcio Garcia Ribeiro, Chefe do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ UNESP Botucatu-SP, pela amizade, direcionamento e apoio contínuos. Pelas valiosas contribuições fornecidas ao longo de toda minha formação acadêmica. Pelos apontamentos pertinentes durante o exame geral de qualificação. Por este maravilhoso exemplo de docente jovem que, ao mesmo tempo, contempla tamanha experiência e maturidade profissional.

Ao Prof. Paulo Francisco Domingues pela amizade, incentivo e oportunidades de crescimento. Pelas importantes contribuições fornecidas durante o exame geral de qualificação.

Ao Prof. Antonio Carlos Paes e à Profa. Jane Megid, pela amizade, confiança e oportunidades de crescimento.

À Profa. Simone Baldini Lucheis, pela ajuda nas colheitas de amostras de leite e análises laboratoriais.

À Profa. Kátia Bresciani (UNESP Araçatuba-SP), pelo incentivo e por me oferecer contínuas oportunidades de crescimento.

Aos amigos Virgínia Bodelão Richini-Pereira, Rodrigo Costa da Silva e Pâmela Marson, pelas valiosas explicações sobre biologia molecular e pela sua boa vontade em ajudar;

À amiga Deolinda Maria Vieira Filha Carneiro, pela amizade sincera e por ser uma grandiosa fonte de luz. Você é uma pessoa especial que merece muito sucesso!

Às amigas Ana Paula Corrêa e Dona Cidinha (esposa do Prof. Helio Langoni), pelo exemplo de superação e inabalável fé em Deus, mesmo frente aos mais severos desafios.

Aos amigos pós-graduandos, “irmãos de orientação”, Patrícia Faccioli, Felipe Freitas Guimarães, Diego Nóbrega, Lucilene Camossi, Luciana Baldini, Diego Generoso, Leila Ullmann, Felipe Fornazari e Gustavo Machado, pela amizade, presteza e companheirismo durante todo este trabalho;

À amiga e graduanda em Medicina Veterinária, Marcela de Pinho Manzi, pela dedicação, entusiasmo e ajuda nas colheitas de amostras e análises laboratoriais;

Aos aprimorandos e estagiários do Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses e do Núcleo de Pesquisas em Mastites, do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ, pelo convívio harmonioso e troca de experiências;

Aos funcionários Benedito Menozzi, Fernando Paganini, Marcos, Diego e Jéssica pela ajuda nas colheitas de amostras de leite e/ou preparo dos materiais;

À UNESP, *campus* de Botucatu-SP, especialmente à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Instituição onde, com muito orgulho, me graduei, e onde continuo minha formação.

A todos os professores, funcionários e colegas da Pós-graduação, especialmente do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da FMVZ UNESP Botucatu-SP, pelo companheirismo durante esta caminhada;

Aos alunos de graduação em Medicina Veterinária, com quem tive oportunidade de conviver durante algumas de minhas atividades acadêmicas. Que vocês possam contribuir para o incremento da Profissão, e que sejam felizes em seu campo de atuação.

Às funcionárias da limpeza, especialmente à Dona Ana e à Adriana, pela dedicação, carinho e palavras de incentivo;

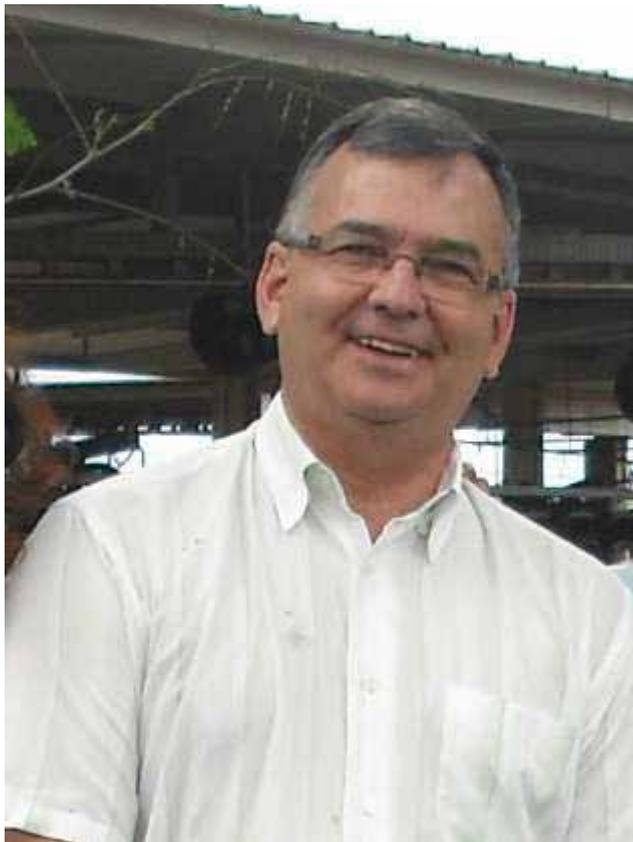
Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da FMVZ UNESP Botucatu-SP, pelas orientações e auxílio no preparo e andamento de documentos relacionados a todo curso de Doutorado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa (Processo número 2008/04125-4) e dos recursos de auxílio à pesquisa (Processo 2008/11362-2), acreditando na importância do trabalho;

Aos meus colegas de trabalho Marisa, Maria, Odair, Vera, Denise, Sílvia, Marilu, Mirian, Amanda e Rogério pelo companheirismo e incentivo nesta minha nova etapa profissional. À Rosana Minharro, chefe da Divisão de Vigilância Municipal de Botucatu-SP, pela confiança e incentivo constantes, e pela compreensão, especialmente nesta etapa final do meu curso de Doutorado.

A todas as pessoas que estiveram comigo e que me ajudaram de alguma maneira, muito obrigada!

AGRADECIMENTOS E HOMENAGEM ESPECIAL



"Ao meu querido orientador, Professor Helio Langoni, pelo exemplo de entusiasmo, dedicação e incansável trabalho, especialmente como educador. Tenho pelo senhor profunda admiração e sinto-me extremamente grata por receber suas constantes e sábias orientações, que muito me ajudam, tanto no âmbito acadêmico, como na vida. Felizes os que recebem seus ensinamentos e têm o privilégio de caminhar ao seu lado, pois certamente tornar-se-ão pessoas mais completas e realizadas, tanto profissionalmente quanto pessoalmente..."

Com carinho, de sua eterna aluna,

Marcella

*L*ISTA DE *Q*UADROS

*E T*ABELAS

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Tabela 1 -** Características avaliadas em 20 propriedades leiteiras localizadas no centro oeste Estado de São Paulo, com base em questionário aplicado ao(s) proprietário(s) e/ou funcionário(s), para classificação quanto às condições higiênico-sanitárias de ordenha. Botucatu-SP, 2011. 60
- Quadro 1 -** Resultados das reações bioquímicas para identificação de *S. agalactiae* isolados de espécies animais 62
- Tabela 2 -** Iniciadores utilizados no estudo para a amplificação do DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* em amostras de leite bovino, pela técnica de mPCR. Botucatu-SP, 2011. 66
- Tabela 3a-** Características gerais das propriedades leiteiras avaliadas (1 a 10), no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 73
- Tabela 3b -** Características gerais das propriedades leiteiras avaliadas (11 a 20), no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 74
- Tabela 4a -** Resumo das principais características observadas entre as vinte propriedades leiteiras avaliadas, no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 77
- Tabela 4b -** Resumo das principais características observadas entre as vinte propriedades leiteiras avaliadas, no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 81

- Tabela 5 -** Freqüências (absoluta e relativa) de resultados ao CMT a partir de amostras de leite colhidas dos quartos mamários de vacas em produção das 20 propriedades avaliadas, no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 82
- Tabela 6 -** Freqüências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos, frente ao total de amostras de leite avaliadas, de vacas em produção das 20 propriedades avaliadas, no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 85
- Tabela 7 -** Freqüências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos, frente ao total de isolamentos obtidos a partir de amostras de leite de vacas em produção das 20 propriedades avaliadas, no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 86
- Tabela 8 -** Micro-organismos isolados a partir de amostras de leite dos tanques de expansão de 20 propriedades avaliadas, no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 87
- Tabela 9 -** Freqüências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos, frente ao total de isolamentos obtidos a partir de amostras de leite de tanque de expansão de 20 propriedades localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 88

- Tabela 10** - Resultado da Contagem de Células Somáticas (CCS) realizada a partir de amostras de leite dos rebanhos em produção e dos tanques de expansão de 20 propriedades avaliadas, no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 89
- Tabela 11** - Distribuição das 20 propriedades leiteiras avaliadas, de acordo com a contagem de células somáticas (CCS) no leite de mistura (tanque de expansão), realizada pela técnica de citometria de fluxo. Botucatu-SP, 2011. 90
- Tabela 12** - Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de micro-organismos mesófilos e psicotróficos por mL de amostras de leite, obtidas de tanques de expansão em 20 propriedades leiteiras localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 90
- Tabela 13** - Distribuição das 20 propriedades leiteiras avaliadas de acordo com a contagem de mesófilos no leite de mistura (tanque de expansão), pela utilização do Petrifilm[®]. Botucatu-SP, 2011. 91
- Tabela 14** - Distribuição das 20 propriedades leiteiras avaliadas de acordo com a contagem de psicotróficos no leite de mistura (tanque de expansão), pela utilização do Petrifilm[®]. Botucatu-SP, 2011. 91
- Tabela 15** - Resultados de mPCR para detecção do DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* em 20 amostras de leite de tanques de expansão de propriedades localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 93

- Tabela 16a** - Micro-organismos isolados das amostras de leite dos tanques de expansão (1 a 10) avaliados, e resultados da mPCR para pesquisa de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*. Botucatu-SP, 2011. 94
- Tabela 16b** - Micro-organismos isolados das amostras de leite dos tanques de expansão (11 a 20) avaliados, e resultados da mPCR para pesquisa de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*. Botucatu-SP, 2011. 95
- Tabela 17** - Ocorrência de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nas amostras de leite dos rebanhos e dos 20 tanques de expansão avaliados, e resultados da multiplex PCR para a detecção do DNA destes três patógenos. Botucatu-SP, 2011. 96
- Tabela 18** - Resultados de cultivo microbiológico e de mPCR para *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nas 20 amostras de leite de tanques de expansão avaliadas. Botucatu-SP, 2011. 97
- Tabela 19** - Ocorrência de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nas 20 amostras de leite de tanques de expansão avaliadas, pelos métodos de cultivo microbiológico e multiplex PCR (mPCR). Botucatu-SP, 2011. 98
- Tabela 20** - Resultados da mPCR frente ao cultivo microbiológico, para a detecção de *S. aureus* em 20 amostras de leite de tanques de expansão, de propriedades do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 98

- Tabela 21** - Resultados da mPCR frente ao cultivo microbiológico, para a detecção de *S. agalactiae* em 20 amostras de leite de tanques de expansão, de propriedades localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 99
- Tabela 22** - Resultados da mPCR frente ao cultivo microbiológico, para a detecção de *E. coli* em 20 amostras de leite de tanques de expansão, de propriedades localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 99
- Tabela 23** - Resultados da mPCR frente ao cultivo microbiológico, para a detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* em 20 amostras de leite de tanques de expansão, de propriedades localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 100
- Tabela 24** - Limiares de detecção dos produtos das PCRs individuais e da mPCR para a pesquisa do DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, utilizando os iniciadores SAU1 e SAU2, SIP3 e SIP4 e Ecoli1 e Ecoli2, a partir do material genético extraído de cepas de referência. Botucatu-SP, 2011. 104

*L*ISTA DE *F*IGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Municípios do Estado de São Paulo onde foram realizadas as colheitas de amostras de leite bovino (identificados pelo marcador, em vermelho). Em “A”: município de Botucatu-SP, onde foram realizadas colheitas de amostras de leite e análises laboratoriais. Botucatu-SP, 2011. 56
- Figura 2 -** Colheita de amostra de leite bovino, de tanque de expansão, utilizando concha de aço inox, estéril. Botucatu-SP, 2011. 57
- Figura 3 -** A: Quarto mamário bovino apresentando mastite clínica necrótico-ulcerativa. B: Prova de Tamis (caneca telada de fundo escuro), realizada para o diagnóstico de mastite clínica. Botucatu-SP, 2011. 58
- Figura 4 -** A: colheita de amostra de leite bovino para realização da prova de CMT (B). C: anti-sepsia do esfíncter do teto com algodão embebido em álcool iodado. D: colheita de amostra de leite para cultivo microbiológico. E: colheita de amostra de leite (pool dos quatro quartos) para CCS. F: caixa de transporte dos tubos coletores para CCS. Botucatu-SP, 2011. 59
- Figura 5 -** Ampolas contendo linhagens bacterianas liofilizadas, utilizadas no estudo como referências (controles positivos) nas provas diagnósticas. Botucatu-SP, 2011. 63

-
- Figura 6 -** Petrifilm[®] utilizado para contagem bacteriana total (CBT) a partir de amostras de leite bovino, obtidas de tanque de expansão. Botucatu-SP, 2011. 64
- Figura 7 -** Padrões de peso molecular utilizados nas análises de PCR e mPCR. Botucatu-SP, 2011. 67
- Figura 8 -** Esquema das diluições seriadas realizadas com amostra de DNA quantificado de *E. coli* (amostra de referência) para avaliação da sensibilidade analítica da técnica de mPCR. Botucatu-SP, 2011. 69
- Figura 9 -** A: Sistema de ordenha bovino tipo balde-ao-pé. B: Sistema de ordenha tipo canalizado, com manejo de bezerro ao pé. C: Sistema de ordenha bovino tipo canalizado convencional. Botucatu-SP, 2011. 75
- Figura 10 -** A: Sistema de ordenha bovino tipo canalizado de alta tecnificação. B: Vacas de excelente genética e alta produção leiteira, em sistema de ordenha tecnificado. Botucatu-SP, 2011. 76

-
- Figura 11-** Propriedades leiteiras com manejo higiênico deficitário. A: presença de cão na sala de ordenha. B: conjunto de ordenha sujo com fezes bovinas. C: bovino em repouso na lama, imediatamente após ordenha. D: intenso grau de sujidade do úbere em animal recém-chegado à sala de ordenha. E e F: utilização de pano para secagem dos tetos. Botucatu-SP, 2011. 78
- Figura 12-** Procedimento de desinfecção do conjunto de ordenha (sistema balde ao pé) realizado em uma das 20 propriedades avaliadas, no Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 79
- Figura 13-** Procedimento de desinfecção *back-flushing* dos conjuntos de ordenha (sistema canalizado), realizado em uma das 20 propriedades avaliadas, no Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011. 79
- Figura 14-** Propriedades leiteiras com manejo e higiene satisfatórios. A: realização de *pré-dipping* com ácido láctico. B: tetos limpos e secos antes da ordenha. C e D: Sala de ordenha limpa. E: Tetos com solução desinfetante (iodo glicerinado) – *pós-dipping*. F: Animais se alimentando após ordenha. Botucatu-SP, 2011. 80
- Figura 15-** Amostra de leite bovino submetida ao CMT. Nota-se coagulação (gelificação) classificada como três cruces, caracterizando mastite subclínica. Botucatu-SP, 2011. 81

- Figura 16-** Isolados bacterianos obtidos a partir de amostras de leite bovino, colhidas de tanques de expansão. À esquerda, características fenotípicas macroscópicas das colônias. À direita, características fenotípicas microscópicas visualizadas em microscópio óptico com óleo de imersão, coloração de Gram e aumento de 100 vezes. A: colônias de estafilococos beta-hemolíticos isolados em ágar sangue. B: cocos Gram positivos, dispostos em grupamentos (cachos-de-uva). C: colônias de estreptococos beta-hemolíticos isolados em ágar sangue. D: cocos Gram positivos, dispostos em cadeias. E: colônias de enterobactérias, lactose positivas, isoladas em ágar MacConkey. F: bacilos Gram negativos. Botucatu-SP, 2011. 83
- Figura 17-** Produtos de mPCR obtidos a partir de cepas de referência. 1: *S. aureus* (1.300pb); 3: *E.coli* (660pb); 5: *E. coli* e *S. agalactiae* (590pb); 7: *S. agalactiae* (293pb); 2,4, 6 e 8: controles negativos; 9 e 10: *S. aureus*, *E. coli* e *S. agalactiae*; 11: padrão de peso molecular 100pb (Invitrogen). Botucatu-SP, 2011. 92
- Figura 18-** Produtos de mPCR obtidos a partir do DNA extraído de amostras de leite de tanques de expansão. 1: padrão de peso molecular 100pb (Invitrogen). 2: cepas de referência de *S. aureus* (1.300pb); *E. coli* (660pb) e *S. agalactiae* (590pb e 293pb) – controles positivos. 3: controle negativo. 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 16, 17, 18, 19, 20: amostras negativas. 5,12,14,15: amostras positivas para *E.coli*. 12: amostra positiva para *S. agalactiae*. Botucatu-SP, 2011. 92

-
- Figura 19-** Produtos de PCR obtidos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *S. aureus*, utilizando os iniciadores SAU1 e SAU2 e a cepa de referência do micro-organismo (ATCC 25923), nas concentrações de 10fg; 100fg; 1pg; 10pg; 100pg e 1ng. Controle negativo: água MiliQ. Botucatu-SP, 2011. 100
- Figura 20-** Produtos de PCR obtidos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *S. agalactiae*, utilizando os iniciadores SAGA1 e SAGA2 e a cepa de referência do micro-organismo (ATCC 13813), nas concentrações de 10fg; 100fg; 1pg; 10pg; 100pg e 1ng. Controle negativo: água MiliQ. Botucatu-SP, 2011. 101
- Figura 21-** Produtos de PCR obtidos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *S. agalactiae*, utilizando os iniciadores SIP3 e SIP4 e a cepa de referência do micro-organismo (ATCC 13813), nas concentrações de 10fg; 100fg; 1pg; 10pg; 100pg e 1ng. Controle negativo: água MiliQ. Botucatu-SP, 2011. 101
- Figura 22-** Produtos de PCR obtidos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *E. coli*, utilizando os iniciadores Ecoli1 e Ecoli2 e a cepa de referência do micro-organismo (ATCC 11229), nas concentrações de 10fg; 100fg; 1pg; 10pg; 100pg e 1ng. Controle negativo: água MiliQ. Botucatu-SP, 2011. 102

-
- Figura 23-** Produtos de mPCR obtidos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* utilizando os iniciadores SAU1 e SAU2, SIP3 e SIP4 e Ecoli1 e Ecoli2, e as cepas de referência dos microorganismos (ATCCs 25923, 13813 e 11229), individualmente, nas concentrações de 10fg; 100fg; 1pg; 10pg; 100pg e 1ng. Controle negativo: água MiliQ. Botucatu-SP, 2011. 103
- Figura 24-** Produtos de mPCR obtidos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* utilizando os iniciadores SAU1 e SAU2, SIP3 e SIP4 e Ecoli1 e Ecoli2, e as cepas de referência dos microorganismos (ATCCs 25923, 13813 e 11229), em conjunto, nas concentrações de 10fg; 100fg; 1pg; 10pg; 100pg e 1ng. Controle negativo: água MiliQ. Botucatu-SP, 2011. 104

LISTA DE

ABREVIATURAS E

SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- A – adenina
ATCC – American Type Culture Collection
c – concentração
C – citosina
CEEA – Câmara de Ética em Experimentação Animal
C. bovis – *Corynebacterium bovis*
CCS – Contagem de Células Somáticas
CBT – Contagem Bacteriana Total
CMT – California Mastitis Test
E. coli – *Escherichia coli*
DHVSP – Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
DNA – ácido desoxirribonucléico
DNAses – enzimas degradadoras de DNA
dNTPs – desoxinucleotídeos-trifosfatos
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
Esp – especificidade
et al. – e colaboradores
EUA – Estados Unidos da América
fg – fantograma
g – unidade de medida de força centrífuga relativa
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
G – guanina
GO – Estado de Goiás
HCl – ácido clorídrico
H₂S – gás sulfídrico
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IAL – Instituto Adolfo Lutz
IN – Instrução Normativa
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
KCl – cloreto de potássio

L – litro
L-TD – L-triptofano desaminase
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MG – Estado de Minas Gerais
MgCl₂ – cloreto de magnésio
mL – mililitro
mm - milímetros
μL – microlitros
μm - micrômetros
mmol – milimol
mM - milimolar
mPCR – Multiplex PCR
n – número amostral
ng - nanograma
nm – nanômetro
no. – número
NaCl – cloreto de sódio
NUPEMAS – Núcleo de Pesquisas em Mastites
p – nível descritivo (estatístico)
pb – pares de bases
PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase
pg – picograma
pH – potencial hidrogeniônico
pmol – picomol
PM – peso molecular
PR – Estado do Paraná
P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*
RJ – Estado do Rio de Janeiro
RNA – ácido ribonucléico
RNAses – enzimas degradadoras de RNA
rpm – rotações por minuto
RS – Estado do Rio Grande do Sul
RVP – relação de verossimilhança positiva
RVN – relação de verossimilhança negativa

S. agalactiae – *Streptococcus agalactiae*
S. aureus – *Staphylococcus aureus*
SC – Estado de Santa Catarina
S. dysgalactiae – *Streptococcus dysgalactiae*
S. epidermidis – *Staphylococcus epidermidis*
S. hyicus – *Staphylococcus hyicus*
S. intermedius – *Staphylococcus intermedius*
S. parauberis – *Streptococcus parauberis*
S. simulans – *Staphylococcus simulans*
S. uberis – *Streptococcus uberis*
Sens – sensibilidade
spp. – gênero
SP – Estado de São Paulo
T – timina
TBE – Tampão Tris Borato-EDTA
TCC – 2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólio
TRIS – Tris (hidroximetil)-amino-metano
UFC – unidades formadoras de colônias
UHT – ultra high temperature
UI – unidades internacionais
UNESP – Universidade Estadual Paulista
UV – ultravioleta
v - volume
V – volts
VPP – valor preditivo positivo
VPN – valor preditivo negativo
X – sinal de multiplicação (vezes)
 χ^2 – qui-quadrado
' – minuto
% – por cento
°C – graus Celsius

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xxxvii
ABSTRACT	xxxix
1 INTRODUÇÃO	41
2 REVISÃO DA LITERATURA	45
2.1 Principais agentes contagiosos e ambientais envolvidos na mastite bovina	45
2.2 <i>S. aureus</i>	46
2.3 <i>S. agalactiae</i>	47
2.4 <i>E. coli</i>	48
2.5 Métodos de diagnóstico molecular aplicados à detecção dos principais patógenos bacterianos causadores de mastite bovina	49
3 OBJETIVOS	53
3.1 Gerais	53
3.2 Específicos	53
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 Autorização para realização do estudo	55
4.2 Seleção de rebanhos e colheita de amostras de leite	55
4.3 Animais e diagnóstico de mastite	57
4.4 Dados epidemiológicos	60
4.5 Análise microbiológica	61
4.5.1 Cultivo das amostras	61
4.5.2 Isolamento e identificação de <i>S. aureus</i>	61
4.5.3 Isolamento e identificação de <i>S. agalactiae</i>	62
4.5.4 Isolamento e identificação de <i>E. coli</i>	62

4.5.5 Amostras bacterianas padrão	63
4.6 CBT	64
4.7 CCS	65
4.8 mPCR	65
4.8.1 Pesquisa dos materiais genômicos de <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> e <i>E. coli</i> nas amostras de leite colhidas dos tanques de expansão	65
4.8.1.1 Extração dos ácidos nucleicos	65
4.8.1.2 Desenho dos iniciadores	66
4.8.1.3 Amplificação do material genético pela mPCR	66
4.8.1.4 Visualização dos produtos amplificados	67
4.8.2 Teste de sensibilidade analítica da mPCR	67
4.8.3 Teste de especificidade analítica da mPCR	69
4.8.4 Teste de reprodutibilidade da mPCR	69
4.9 Análise dos resultados	70
5 RESULTADOS	72
5.1 Questionário epidemiológico e características das propriedades	72
5.2 CMT	82
5.3 Isolados bacterianos	83
5.4 CCS	88
5.5 CBT (tanques de expansão)	91
5.6 mPCR	91
5.7 Limiares de detecção	100
5.7.1 PCR individual para <i>S. aureus</i> (iniciadores SAU1 e SAU2)	100
5.7.2 PCR individual para <i>S. agalactiae</i> (iniciadores SAGA1 e SAGA2)	101
5.7.3 PCR individual para <i>S. agalactiae</i> (iniciadores SIP3 e SIP4)	101
5.7.4 PCR individual para <i>E. coli</i> (iniciadores Ecoli1 e Ecoli2)	102

5.7.5	mPCR para <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> e <i>E. coli</i> com DNAs das ATCCs separadas (iniciadores SAU1 e SAU2, Ecoli1 e Ecoli2, e SIP3 e SIP4)	103
5.7.6	mPCR para <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> e <i>E. coli</i> com DNAs das ATCCs juntas (iniciadores SAU1 e SAU2, Ecoli1 e Ecoli2, e SIP3 e SIP4)	104
5.8	Especificidade da mPCR	105
5.9	Reprodutibilidade da mPCR	106
6	DISCUSSÃO	107
6.1	Avaliação do manejo de ordenha e dos dados obtidos por questionários epidemiológicos	108
6.2	Ocorrência de mastites clínica e subclínica nos rebanhos avaliados, e isolamentos microbianos nas amostras de leite individuais e compostas	111
6.3	CCS e CBT	113
6.4	mPCR	114
6.5	Características epidemiológicas dos rebanhos e relação com resultados de cultivo microbiológico e da mPCR a partir de amostras de leite dos tanques de expansão	118
7	CONCLUSÕES	119
8	BIBLIOGRAFIA	121
	ANEXOS	129
	TRABALHOS CIENTÍFICOS	133
	NORMAS PARA PUBLICAÇÃO	157

*R*ESUMO

RESUMO

TRONCARELLI, M.Z. **Padronização da técnica de multiplex PCR para a detecção de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* em amostras de leite bovino, obtidas de tanques de expansão.** Botucatu-SP, 2011. 129p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Com o objetivo de normatizar a cadeia produtiva visando à melhoria da qualidade do leite no Brasil, o MAPA delineou a IN n° 51, em vigor desde julho de 2005. Em linha com estes parâmetros, objetivou-se, no presente estudo, padronizar o método de mPCR para a detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* em amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão, e avaliar esta técnica como possível recurso diagnóstico a ser empregado em programas de controle de qualidade do leite oferecido para consumo. Foram visitadas 20 propriedades leiteiras do Estado de São Paulo, com sistema de ordenha mecânica e tanque de expansão próprio, nas quais foram colhidas amostras de leite para a realização da mPCR, cultivo microbiológico, CCS e CBT. *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* foram isolados, em 30%; 10% e 40% das amostras de leite dos tanques de expansão, respectivamente, e detectados pela mPCR em 0; 10% e 35%, respectivamente. A mPCR apresentou acurácia de 78,3%; sensibilidade de 37,5% e especificidade de 93,2% e limiar de detecção de 100 picogramas. A CCS apresentou mediana de 395.000 células/mL, e 55% das amostras avaliadas resultou em valores de CBT satisfatórios para mesófilos. O índice de mastite subclínica nos rebanhos avaliados pelo CMT foi de 28,3%. Conclui-se que a mPCR para a detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* foi padronizada com êxito no presente estudo, e pode ser indicada como método complementar aos utilizados na rotina diagnóstica de mastite bovina e qualidade do leite.

Palavras-chave: bovinos, mastite, bactérias, leite de mistura, biologia molecular, diagnóstico.

*A***STRACT**

ABSTRACT

TRONCARELLI, M.Z. **Multiplex PCR standardization for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* detection in bovine milk samples obtained from bulk tanks.** Botucatu-SP, 2011. 129p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Brazilian Ministry of Agriculture and Supply, objecting the improvement of milk quality in Brazil, published the Normative Instruction n. 51, a technical group of rules for milk business that has been attended since July 2005. In line with these parameters, the aim of the present study was to standardize the mPCR test for *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* detection in bovine milk samples obtained from bulk tanks, in order to evaluate this method as a possible tool to be used in milk quality control programs. Twenty milk farms with milking machine system and individual bulk tank, of different regions of Sao Paulo state were sampled. Bulk milk samples were collected for mPCR, microbiological culture, Somatic Cell Count and Total Bacterial Count. *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* were isolated in 30%; 10% and 40% samples, respectively, and detected by mPCR in 0; 10% and 35% samples, respectively. mPCR presented 78,3% accuracy; 37,5% sensitivity and 93,2% specificity and detection lower of 100pg for each pathogen. CCCs presented medium of 395.000 cells/mL and 55% of evaluated samples resulted in TBC satisfactory values for mesophilus. Subclinical mastitis index in evaluated cattle, by CMT, was 28,3%. In conclusion, mPCR for *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* detection was successfully standardized in the present study and can be indicated as a complementary diagnosis to the routine methods for bovine mastitis and milk quality's monitoring.

Key words: bovine, mastitis, bacteria, bulk milk, molecular biology, diagnosis.



INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

O leite bovino é um excelente alimento pelo seu valor nutritivo, conferido principalmente pela presença de proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais, vitaminas e água (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004). É essencial para a nutrição dos humanos de todas as idades, especialmente de recém-nascidos (OLIVEIRA et al., 1999). Estudos realizados pelo Ministério da Saúde e pelo IBGE, considerando a população brasileira no ano de 2007, composta por aproximadamente 183 milhões de habitantes, evidenciaram que há demanda de produção de mais de 39 bilhões de litros de leite por ano, para que sejam atendidas as recomendações de ingestão diária por faixa etária (EMBRAPA, 2011). No entanto, segundo estimativas da Pesquisa da Pecuária Nacional, realizada pelo IBGE, houve produção de aproximadamente 30 bilhões de litros de leite em 2010, por 23 milhões de bovinos ordenhados, totalizando, em média, produção de 1.326 litros anuais por animal (pouco mais de 3,5 litros por vaca/dia).

O reduzido volume de produção de leite, bem como a qualidade do produto enviado aos laticínios e oferecido para o consumo tem sido alvo de constante preocupação no Brasil. Em muitas propriedades, ainda persistem problemas de manejo, condições deficientes de produção, mão-de-obra pouco qualificada, limitações de ordem genética dos rebanhos, nutrição inadequada dos animais e elevada prevalência de mastites (COSTA, 2002).

A mastite bovina determina grave impacto no setor leiteiro, causando sérios prejuízos, tanto pelo comprometimento funcional da glândula mamária, como pelo descarte prematuro de fêmeas e/ou morte ocasional de animais (MOTA et al., 2004; RADOSTITS et al., 2007;). Trata-se de processo inflamatório da glândula mamária, de ordem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica, psicológica ou infecciosa. A maioria dos casos de mastite bovina apresenta etiologia bacteriana e, em aproximadamente 80%, cinco espécies de micro-organismos (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis* e *E. coli*) são responsáveis pelo estabelecimento da doença (BRITO et al., 1999; BRADLEY, 2002). Além da importância destes micro-organismos como agentes causadores de mastites, também representam risco à saúde pública,

já que podem produzir toxinas, algumas termorresistentes, resistindo à pasteurização e ultrapasteurização, favorecendo sua permanência no leite e derivados. Com efeito, a identificação precoce destes patógenos pode contribuir para ações de controle e monitoramento da mastite em rebanhos leiteiros, com conseqüente melhora da qualidade do leite entregue ao laticínio, com vistas a assegurar a saúde pública e maior rendimento industrial.

A IN n°51 (BRASIL, 2002), em vigor desde julho de 2005, constitui um conjunto de normas técnicas de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite, elaboradas pelo MAPA, de maneira a melhorar a qualidade do leite produzido no país, orientando os diferentes elos da cadeia leiteira. Há demanda por métodos rápidos, com elevada sensibilidade e especificidade, custo acessível e aplicabilidade para o processamento de grande número de amostras de leite (GILLESPIE e OLIVER, 2005), visando à identificação de patógenos e a tomada de ações imediatas para o tratamento e controle de mastite nos rebanhos.

A biologia molecular tem contribuído significativamente na identificação de micro-organismos em amostras compostas ou individuais de leite e também em derivados lácteos, mesmo na presença de interferentes, que dificultam a detecção pelos métodos tradicionais de cultivo microbiológico. Ressalta-se a inibição da multiplicação bacteriana decorrente da presença de resíduos de antimicrobianos, o número reduzido de patógenos na amostra e a contaminação com micro-organismos ambientais (PHUEKTES et al., 2003).

Entre os métodos de diagnóstico molecular, assume destaque a PCR. Esta técnica requer pouco tempo para processamento e os resultados são caracterizados por elevados índices de sensibilidade e especificidade analítica. Pesquisas recentes utilizando diferentes protocolos de diagnóstico molecular para a detecção simultânea dos DNAs de mais de um agente bacteriano de mastite, denominados multiplex PCR, a partir de amostras de leite individuais ou compostas, têm apresentado excelentes resultados, contribuindo inclusive para estudos epidemiológicos e direcionamento de medidas de controle. Nesse contexto, a proposta do presente estudo foi padronizar a técnica de mPCR como método diagnóstico rápido e sensível para a detecção dos três principais patógenos causadores de mastites (*S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*) em amostras de leite coletadas em tanques de expansão, de forma a avaliar esta

técnica como possível recurso diagnóstico a ser utilizado em programas de monitoramento da qualidade do leite e controle de mastites.



REVISÃO DA LITERATURA

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Principais agentes contagiosos e ambientais envolvidos na mastite bovina

Considerando as fontes de infecção e vias de transmissão, os agentes causadores de mastite foram convencionalmente classificados como contagiosos e ambientais. Os contagiosos estão presentes na microbiota da pele dos quartos mamários, dos tetos, nas mucosas e conjuntivas dos animais (denominados de vaca-dependentes), bem como nos equipamentos de ordenha, em panos utilizados na limpeza e secagem dos tetos, e nas próprias mãos do ordenhador (BRADLEY, 2002). As moscas podem participar como vetores mecânicos de agentes contagiosos, especialmente em propriedades com elevada infestação, contribuindo para a transmissão dos micro-organismos às novilhas no período pré-parto (RADOSTITS et al., 2007).

A infecção pelos agentes contagiosos ocorre predominantemente durante a ordenha, e os micro-organismos, de forma oportunista, invadem a glândula mamária. Dentre os principais patógenos contagiosos destacam-se *S. aureus* e *S. agalactiae*. Estes micro-organismos ocorrem com elevada prevalência e geralmente causam mastite subclínica, de longa duração e com elevada CCS. A mastite subclínica exige diagnóstico específico e está relacionada à redução da produção de leite, muitas vezes não percebida pelos produtores (HORTET e SEEGERS, 1998).

O grupo de agentes ambientais está presente na matéria orgânica (solo e fezes), na água, terra, ar e na cama dos animais. A infecção ocorre principalmente no período entre-ordenhas, mas pode ocorrer também durante a ordenha. Fungos, leveduras, algas e enterobactérias são os principais patógenos ambientais, tendo especial importância neste grupo *E. coli*. Apesar da menor prevalência das mastites causadas por estes agentes, geralmente causam quadros clínicos severos, superagudos, podendo levar os animais a óbito. Há alterações importantes na glândula mamária, que apresenta hiperemia, aumento de volume, hipersensibilidade e alteração de comportamento das fêmeas, como recusa em permitir o aleitamento. Podem ocorrer, ainda, sinais sistêmicos como hipertermia, dispnéia, apatia, atonia

ruminal, taquicardia, inapetência, prostração e morte, em decorrência à sepsse. Além disso, são observadas alterações no aspecto do leite, que pode conter pus, grumos, flocos, dessora ou presença de sangue (DUNN, 1994).

Apesar dos diversos estudos realizados mundialmente, a mastite ainda permanece como doença de elevada prevalência em rebanhos leiteiros (HALASA et al., 2007). Em estudo realizado por Langoni et al. (1998), foram examinadas 7.902 amostras de leite de vacas com mastite subclínica e 850 clínica, em municípios do Estado de São Paulo. Foi verificado que 32,7% das mastites subclínicas eram resultantes da infecção por *Staphylococcus* sp. e 18,3% estavam relacionadas à infecção por *Streptococcus* sp. Já as enterobactérias foram responsáveis por 25,6% das mastites clínicas.

2.2 *S. aureus*

S. aureus é o agente etiológico mais freqüente nos quadros de mastite contagiosa em todos os rebanhos leiteiros. É encontrado na pele, mucosas e conjuntivas dos animais e dos humanos, o que torna praticamente impossível a erradicação nos rebanhos. A mastite por *S. aureus* está associada à elevada CCS, drástica redução da produção de leite e reduzidas taxas de cura microbiológica. Em bovinos, estima-se que a produção de leite esteja reduzida em até 45% por quarto infectado e em até 15% por vaca infectada (BRITO e BRITO, 1998). Segundo Nickerson (1993), aproximadamente 19 a 47% das vacas em um rebanho poderão estar infectadas por este micro-organismo.

Caracteriza-se como bactéria Gram positiva, anaeróbia facultativa (fermentadora), positiva à prova da catalase, negativa à oxidase e imóvel, multiplicando-se a temperaturas que variam de 15 a 45°C e em concentrações de NaCl tão altas quanto 15%. É coagulase positiva, assim como a maioria das linhagens dos demais estafilococos patogênicos (*S. intermedius* e *S. hyicus*), fermenta o manitol, a maltose e é resistente à polimixina B (300 UI) (QUINN et al., 2005). À microscopia, apresenta-se sob a forma de cocos, cujo diâmetro varia de 0,8 a 1,0 µm, ou agrupados em arranjos semelhantes a “cachos de uva”, embora as células possam estar isoladas.

Em meio sólido, as colônias são circulares-convexas, com 2 a 3 mm de diâmetro, de coloração branca ao amarelo-dourado, com halo de hemólise ao redor (QUINN et al., 2005). Podem ser isoladas em meios seletivos como o

ágar Baird Parker, apresentando-se de coloração negra, circundadas por um halo de precipitação (interno) e outro transparente (externo) (CARNEIRO, 2009; FACCIOLI, 2010).

S. aureus expressa grande variedade de fatores de virulência, os quais contribuem com a colonização, invasão e persistência deste patógeno no hospedeiro. A maioria das linhagens do micro-organismo produz exotoxinas, ou citolisinas, incluindo hemolisinas, entero-hemolisinas, toxina da síndrome do choque tóxico e toxinas exfoliativas, além de nucleases, proteases, lipases, coagulases, hialuronidase e colagenase (TODAR, 2002). A ação combinada destes fatores de virulência determina efeitos deletérios às células do hospedeiro, e o aparecimento de uma variedade de infecções em humanos e animais, bem como síndromes tóxicas no humano suscetível (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

As exotoxinas (citolisinas) são importantes fatores de virulência e, especialmente no caso da mastite, produzem agravos ao tecido mamário. São termorresistentes, podendo permanecer viáveis aos tratamentos térmicos comumente aplicados ao leite, como a pasteurização e esterilização (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004), constituindo importante risco à saúde pública.

S. aureus apresenta elevada resistência aos antimicrobianos, o que dificulta o tratamento. Além disso, este micro-organismo possui grande capacidade de invasão dos adenômeros mamários e fagócitos, o que permite sua instalação em todo tecido glandular, com formação de tecido fibroso nos focos da infecção, dificultando o acesso dos antimicrobianos convencionais.

2.3 *S. agalactiae*

S. agalactiae é bactéria Gram-positiva, altamente contagiosa, que apresenta habilidade de aderência ao tecido mamário. O microambiente específico do úbere é necessário para a multiplicação bacteriana. Por isso, é considerado agente contagioso obrigatório da glândula mamária. As colônias são pequenas, ao redor de 0,5 a 1 mm de diâmetro, translúcidas e apresentando alfa ou beta hemólise. À microscopia, apresentam-se como cocos isolados, aos pares ou em cadeias. É classificada bioquimicamente por

provas de hidrólise de esculina e do hipurato de sódio, CAMP test, inulina, lactose, manitol, rafinose, salicina, sorbitol, trealose e a multiplicação em NaCl a 6,5% (QUINN et al., 2005).

Antes do uso da penicilina no tratamento das mastites, os estreptococos eram reportados como causadores de 90% das mastites bovinas. Estima-se que pode haver até quarenta casos subclínicos para cada caso clínico em um rebanho afetado por essa bactéria (KEEFE, 1997).

A bactéria causa geralmente mastites subclínicas que tendem à cronicidade, com elevada CCS (acima de 1.000.000 células/mL), e marcada redução na produção e qualidade do leite (NMC, 1996). *S. agalactiae* infecta a cisterna e o sistema de ductos da glândula mamária determinando, em alguns casos, substituição do tecido secretor por tecido fibroso. Domingues et al. (1998) observaram que em quartos mamários mastíticos infectados por *S. agalactiae*, houve redução de 25,2% na produção de leite, em comparação com seus homólogos negativos, o que reafirma sua relevância como agente nas mastites e a importância das ações de controle, levando-se em consideração sua alta contagiosidade.

Vacas infectadas com *S. agalactiae* eliminam elevado número de bactérias no leite, determinando alta contagem bacteriana total (CBT) no leite enviado para a indústria (SOUZA et al., 2008).

Quando há diagnóstico precoce, são raros os casos de perda do quarto afetado. A resposta ao tratamento com antimicrobianos é boa e permite até a erradicação de *S. agalactiae* de rebanhos infectados (KEEFE, 1997).

2.4 *E. coli*

Trata-se de bactéria Gram negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae, que inclui os principais agentes causadores de mastite ambiental como *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. A mastite por *E. coli* geralmente é clínica, aguda ou hiperaguda, representando risco à vida do animal (DUNN, 1994). No entanto, há relatos de que pode não haver diferenças na manifestação de mastite clínica ou subclínica por enterobactérias (COSTA et al., 1998) e que infecções persistentes por *E. coli* podem causar somente mastite subclínica (DOPFER et al., 1999).

Pode ser isolada em meios seletivos para enterobactérias, como o ágar MacConkey, após incubação a 37°C durante 18-24 horas, apresentando colônias pequenas, fermentadoras de lactose. *E. coli* pode ser identificada bioquimicamente utilizando as seguintes provas ou substratos: gás/glicose, citrato, motilidade, indol e lisina (KONEMAN et al., 1997).

As infecções por este agente estão relacionadas ao seu comportamento oportunista, veiculado das fezes dos animais, por via ascendente, pelo canal galactóforo (RADOSTITS et al., 2007).

Diversas linhagens de *E. coli* são produtoras de citotoxinas como termolisinas, fator necrosante citotóxico, enterotoxinas e verotoxina (VT) ou “shiga-like” toxina (STX), de grande importância em Saúde Pública, visto que são associadas a casos de diarreia, septicemia, infecção do trato urinário e meningite nos humanos (FORSYTHE, 2002). *E. coli* habita o trato intestinal de bovinos saudáveis, que podem ser os principais reservatórios do sorotipo O157:H7 (FORSYTHE, 2002). Este sorotipo pode ser isolado de fezes e leite de bovinos assintomáticos (JAYARAO e HENNING, 2001) e causa colite hemorrágica e falência renal, com elevada letalidade, especialmente em crianças (CFSPH, 2009). Vale ressaltar o recente surto de infecção por *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)/Síndrome Hemolítica Urêmica, com 3.092 casos e 31 óbitos notificados em 16 países, sendo 14 situados na Europa, decorrentes, principalmente, do consumo de brotos crus contaminados, como lentilhas, alfafa, feijão azuki, entre outros, produzidos em uma fazenda na Baixa Saxônia, ao sul de Hamburgo, Alemanha (ANVISA, 2011).

2.5 Métodos de diagnóstico molecular aplicados para a detecção dos principais patógenos bacterianos causadores de mastite bovina

A biologia molecular tem contribuído, recentemente, em diversos aspectos no diagnóstico da mastite bovina, a partir de amostras de leite individuais ou compostas. Esta técnica permite a identificação de microorganismos em animais carreadores ou em estágios iniciais da doença, apresentando elevada sensibilidade e especificidade (RIFFON et al., 2001). Os métodos de biologia molecular também têm sido empregados para a pesquisa

de patógenos em leite UHT e em derivados lácteos (GANDRA, 2006; CHOTÁR et al., 2006).

Há diversos estudos disponíveis sobre a utilização da técnica de PCR para a identificação e genotipagem dos agentes causadores de mastite, bem como dos genes codificadores de toxinas (MARTINEAU et al., 1998; CREMONESI et al., 2005; FOURNIER et al., 2008). A PCR pode ser realizada utilizando somente um par de iniciadores, para amplificação do DNA de um micro-organismo-alvo (gênero ou espécie), denominada simplex PCR (ou PCR convencional). No entanto, há possibilidade de otimizar a identificação dos principais patógenos da mastite, realizando a amplificação simultânea de dois ou mais DNAs-alvos, com a utilização de mais de um par de iniciadores com ajuste de temperaturas ótimas para as reações, denominada multiplex PCR (mPCR). Além disso, novos métodos utilizando as seqüências das regiões 16S ou 23S rDNA são utilizados com sucesso para a identificação de inúmeras bactérias (FORSMAN et al., 1997).

Em estudo realizado por Riffon et al. (2001), foram avaliadas a sensibilidade, especificidade e rapidez da técnica de mPCR para a detecção dos principais patógenos de mastite bovina (*E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* e *S. uberis*). Para tanto, os pesquisadores avaliaram amostras de leite inoculadas com cepas padrão de cada micro-organismo, isoladas de casos de mastite, utilizando sete pares de iniciadores espécie-específicos. Verificou-se que o limite de detecção de *S. aureus* foi de $3,125 \times 10^2$ UFC/mL de leite, comprovando a excelente sensibilidade da técnica. A especificidade também foi demonstrada, pois não foram observadas amplificações de DNAs não-alvos, como o de *P. aeruginosa*, que foi testado frente aos iniciadores espécie-específicos utilizados no estudo.

A técnica de mPCR também foi utilizada por Phuektes et al. (2001) para detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis* em 117 amostras de leite de vacas com mastite subclínica. A PCR foi significativamente mais sensível que o cultivo microbiológico na detecção de *S. aureus* e *S. uberis*, apresentando limiares de detecção, para cada micro-organismo, de 10^4 UFC/mL e 10^3 UFC/mL, respectivamente. No entanto, não houve diferenças significativas entre a PCR e o cultivo para a detecção de *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae*. Os resultados sugerem que a mPCR pode ser

utilizada como método alternativo na rotina diagnóstica para detecção rápida, sensível, específica e simultânea destes agentes em amostras de leite bovino.

Phuektes et al. (2003) utilizaram a técnica de mPCR para a identificação de *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis* em 176 amostras de leite de tanque de expansão, relacionando com resultados de CCS, CBT e contagem de bactérias termodúricas. Com a técnica de mPCR, foi possível a detecção de *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. agalactiae* e *S. aureus* em 78 (44%), 49 (28%), 38 (22%) e 28 (16%) das amostras, respectivamente. Neste estudo, a presença de *S. agalactiae* estava associada às altas CCS e CBT do tanque.

Chotár et al. (2006) investigaram a presença do gene que codifica a proteína imunogênica de superfície de *S. agalactiae*, *S. aureus* e *E. coli*, e verificaram alta sensibilidade e especificidade da técnica, encontrando limite mínimo para detecção de *S. agalactiae* de 6 UFC/mL e 16 UFC/mL para os outros patógenos.

Há ainda possibilidade da utilização da mPCR em tempo real para a detecção simultânea de patógenos, bem como sua quantificação em amostras de leite individuais ou compostas (GILLESPIE e OLIVER, 2005). Entretanto, descrições da metodologia em tempo real revelam sua inabilidade em identificar algumas espécies de patógenos de mastite, devido ao elevado peso molecular (em pares de bases) dos materiais genômicos. Portanto, novos estudos e protocolos são necessários para ajustar a mPCR em tempo real no diagnóstico da mastite em animais.

A utilização da técnica de mPCR é uma linha de pesquisa mundialmente atual na área de mastite e qualidade do leite, visando a contribuir como método diagnóstico rápido, altamente sensível e específico na identificação dos principais patógenos envolvidos na gênese das infecções mamárias. No entanto, ainda não existiam estudos realizados no Brasil sobre a detecção simultânea de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* pela mPCR em amostras de leite de tanque de expansão. Com efeito, o presente estudo pretendeu avaliar a técnica de mPCR como método de diagnóstico para a detecção destes três agentes, face ao impacto dos mesmos sobre a casuística de mastite no Brasil e conseqüente interferência na qualidade do leite.



OBJETIVOS

3 – OBJETIVOS

3.1 Gerais

- Padronizar a técnica de mPCR como método diagnóstico para a detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* em amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão, e avaliar esta técnica como possível procedimento para programas de controle de qualidade do leite oferecido para o consumo humano.

3.2 Específicos

- Avaliar a frequência de *S. aureus*, de *S. agalactiae* e de *E. coli* em amostras de leite obtidas dos tanques de expansão das propriedades, mediante o diagnóstico pela mPCR e cultivo microbiano;
- Avaliar a CCS e a CBT nas amostras de leite dos tanques de expansão das propriedades;
- Comparar a eficiência da mPCR na detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* como método de diagnóstico no leite do tanque, em relação ao cultivo microbiológico, realizado a partir de amostras de leite colhidas dos quartos mamários e do tanque;
- Avaliar as características de cada propriedade, bem como sua relação com os resultados obtidos em cada técnica diagnóstica.



MATERIAL E MÉTODOS

4 – MATERIAL E MÉTODOS

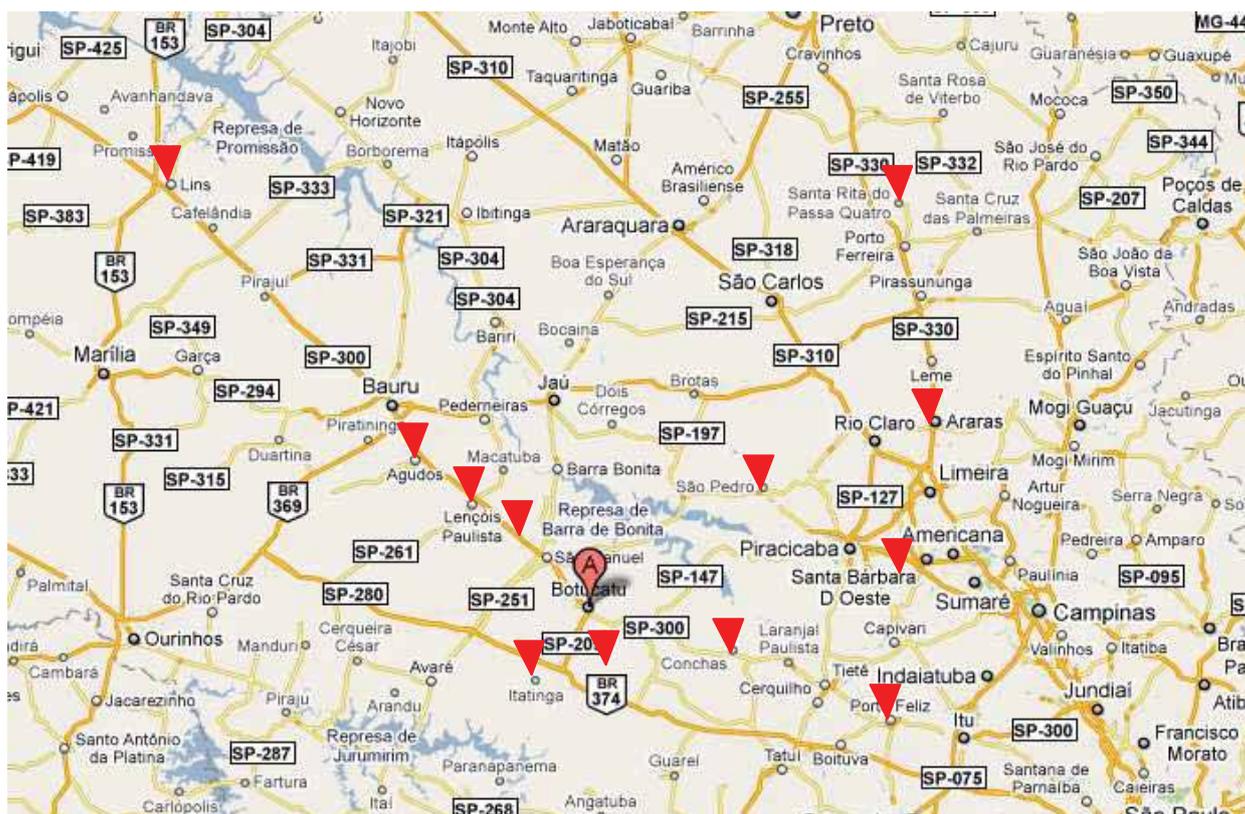
4.1 Autorização para a realização do estudo

O presente delineamento experimental foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, no dia 10 de junho de 2008, protocolo n° 133/2008-CEEA (Anexo 1).

As colheitas de amostras de leite dos bovinos foram também autorizadas pelos proprietários dos rebanhos envolvidos no estudo.

4.2 Seleção de rebanhos e colheita de amostras de leite

Foram avaliadas 20 propriedades leiteiras dos seguintes municípios do centro oeste do Estado de São Paulo: Botucatu (4), Nova Odessa (2), Areiópolis (1), Pardinho (1), São Pedro (2), Lençóis Paulista (1), Porto Feliz (1), Itatinga (3), Lins (1), Agudos (1), Araras (1), Santa Rita do Passa Quatro (1) e Conchas (1) (Figura 1). Todas as propriedades contavam com sistema de ordenha mecânica para extração do leite e tanque de expansão próprio, pré-requisitos para inclusão na pesquisa. As propriedades continham de 19 a 970 vacas em lactação.



▼ = marcador

FIGURA 1. Municípios do Estado de São Paulo onde foram realizadas as colheitas de amostras de leite bovino (identificados pelo marcador, em vermelho). Em “A”: município de Botucatu-SP, onde foram realizadas colheitas de amostras de leite e análises laboratoriais. Botucatu-SP, 2011.

As amostras de leite do tanque foram obtidas a partir do total de leite produzido por propriedade no período máximo de 24 horas. De cada tanque de expansão individual foram colhidos 250 mL de leite, utilizando conchas individuais de alumínio, estéreis (Figura 2). As amostras foram tomadas após adequada homogeneização, durante pelo menos cinco minutos, por meio do sistema de homogeneização automática, presente em todos os tanques de expansão avaliados, e acondicionadas em frascos de vidro com tampa rosqueável, estéreis. Foram transportadas sob refrigeração (4-8°C), em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, até o Laboratório do NUPEMAS, da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, onde foram separadas em duas alíquotas. A primeira foi utilizada para a análise microbiana, e a segunda congelada a -80°C para as análises moleculares. Para a CCS, amostras de leite obtidas dos

tanques de expansão foram acondicionadas em frascos plásticos com tampa, em triplicata. No interior de cada frasco, havia duas pastilhas do conservante bronopol, possibilitando o transporte das amostras em temperatura ambiente, até o laboratório.



FIGURA 2. Colheita de amostra de leite bovino, a partir de tanque de expansão, utilizando concha de alumínio, estéril. Botucatu-SP, 2011.

4.3 Animais e diagnóstico de mastite

Foram envolvidos no estudo preferencialmente os bovinos em período médio de lactação. Foram colhidas 6.066 amostras de leite de 1.550 animais. O diagnóstico da mastite clínica foi fundamentado nas alterações macroscópicas do leite (presença de pus, dessora, grumos e/ou estrias de sangue), na prova da caneca telada de fundo escuro ou Tamis (Figura 3); na presença de sinais de inflamação na glândula mamária (dor, hiperemia, sensibilidade, recusa em permitir o aleitamento dos bezerros) e/ou sinais sistêmicos (RADOSTITS et al., 2007). A mastite subclínica foi diagnosticada utilizando o CMT (SCHALM et al., 1971). Foram utilizadas para isolamento microbiano as amostras provenientes de tetos a partir do escore 1+ no CMT.

As amostras de leite foram colhidas assepticamente após antissepsia dos tetos com solução de iodo glicerinado a 1%, e transportadas sob temperatura de refrigeração (4-8°C) para cultivo microbiano (Figura 4).

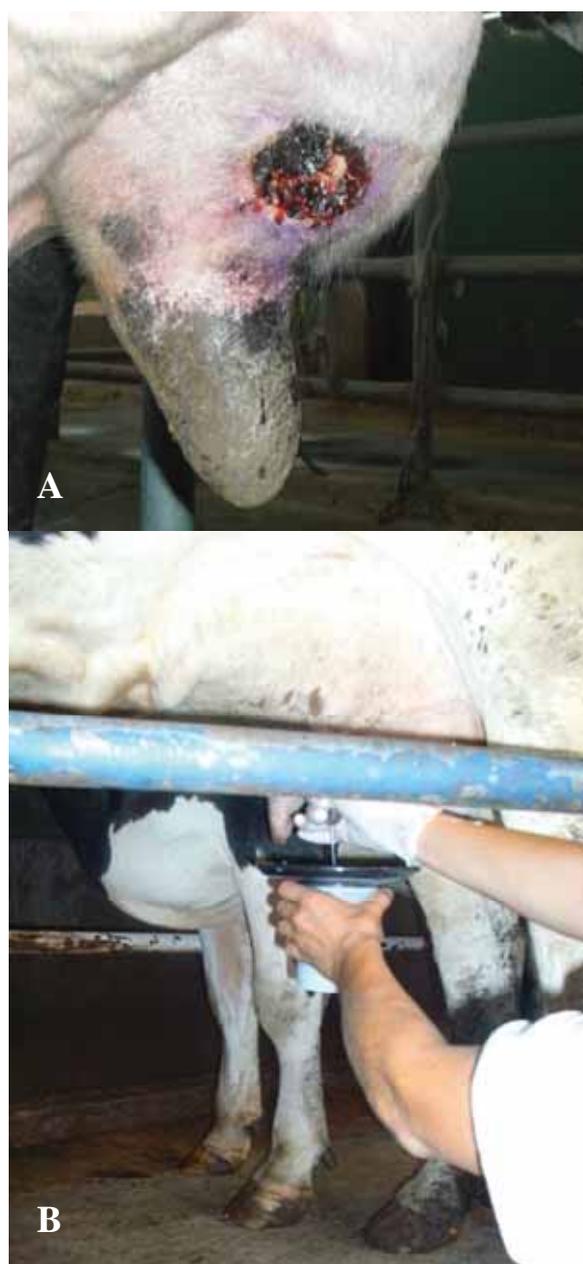


FIGURA 3. A: Quarto mamário bovino apresentando mastite clínica necrótico-ulcerativa. B: Prova de Tamis (caneca telada de fundo escuro), realizada para o diagnóstico de mastite clínica. Botucatu-SP, 2011.



FIGURA 4. A: colheita de amostra de leite bovino para realização da prova de CMT (B). C: antissepsia do esfínter do teto com algodão embebido em álcool iodado. D: colheita de amostra de leite para cultivo microbiológico. E: colheita de amostra de leite (*pool* dos quatro quartos) para CCS. F: caixa de transporte dos tubos coletores para CCS. Botucatu-SP, 2011.

4.4 Dados epidemiológicos

Foram colhidas informações epidemiológicas de cada propriedade, utilizando questionário (Anexo 1), aplicado no dia da colheita das amostras. Foram avaliadas as condições gerais de manejo dos animais e higiene de ordenha, considerando os seguintes itens: produção leiteira (média diária), tipos de equipamentos de ordenha e de armazenamento do leite, manejo de ordenha, hábitos de higiene dos ordenhadores, medidas de diagnóstico e prevenção de mastite, prevalência de mastite clínica e/ou subclínica, protocolo de tratamentos antimicrobianos rotineiramente utilizados nos animais com mastite (FAGUNDES, 2007).

Com as informações obtidas nos questionários, as propriedades foram classificadas de acordo com os métodos e condições gerais de ordenha (Tabela 1).

TABELA 1. Características avaliadas em 20 propriedades leiteiras localizadas no centro-oeste do Estado de São Paulo, com base em questionário aplicado ao(s) proprietário(s) e/ou funcionário(s), para classificação quanto às condições higiênico-sanitárias de ordenha. Botucatu-SP, 2011.

Item	Característica
1	Mão-de-obra qualificada
2	Realização de <i>pré-dipping</i>
3	Realização de <i>pós-dipping</i>
4	Realização de teste da caneca telada (Tamis)
5	Realização do CMT
6	Manejo do rebanho pós-ordenha
7	Limpeza diária da sala de ordenha / equipamentos
8	Estrutura física da sala de ordenha
9	Registro dos dados dos animais
10	Acompanhamento médico-veterinário

Classificação das propriedades (adaptada de FAGUNDES, 2007):

> 8 itens atendidos: A (condições satisfatórias de ordenha)

5-8 itens atendidos: B (condições regulares de ordenha)

< 5 itens atendidos: C (condições insatisfatórias de ordenha).

4.5 Análise microbiológica

4.5.1 Cultivo das amostras

O cultivo microbiológico foi realizado no Laboratório do NUPEMAS, no DHVSP – FMVZ UNESP/Botucatu-SP. Todas as amostras de leite foram semeadas nos meios de ágar acrescido de sangue bovino (5%) e ágar MacConkey, mantidas a 37°C em aerobiose, por 72 horas. As linhagens de micro-organismos de origem bacteriana foram identificadas segundo as características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo (QUINN et al., 2005). As linhagens de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E.coli* isoladas foram conservadas em caldo nutriente (infusão cérebro-coração) com glicerol 5%, a -80°C, para estocagem (MURRAY et al., 2007).

As amostras de leite obtidas dos tanques de expansão foram diluídas em solução salina a 10^{-1} e 10^{-2} , para facilitar a visualização das colônias. As amostras puras (10^0) e suas respectivas diluições foram inoculadas nos meios de ágar sangue e MacConkey, espalhando-se com alça de Drigalski, e posteriormente incubadas a 37°C em aerobiose, por 72 horas.

4.5.2 Isolamento e identificação de *S. aureus*

Dentre as colônias observadas e quantificadas no procedimento supracitado, foram selecionadas aquelas suspeitas de *S. aureus*. Portanto, colônias com ao redor de 2 a 3 mm de diâmetro, de coloração branca a amarelo dourado, hemolíticas (QUINN et al., 2005), foram repicadas para verificação microscópica, em esfregaços corados pelo método de Gram. Após observação das características morfológicas e de hemólise das colônias, as bactérias foram submetidas à prova enzimática da catalase.

Isolados presumivelmente identificados como estafilococos pelas características morfo-tintoriais foram classificados como *S. aureus* quando resultaram positivos à prova de coagulase em tubo, à fermentação da maltose e manitol e apresentaram resistência à polimixina B (300UI) (KONEMAN et al., 1997). Os demais estafilococos isolados, incluindo os hemolíticos “não-*aureus*”, foram classificados como *Staphylococcus* sp.

4.5.3 Isolamento e identificação de *S. agalactiae*

Colônias pequenas, ao redor de 0,5 mm de diâmetro, translúcidas e apresentando hemólise (sugestivas de *S. agalactiae*), foram classificadas fenotipicamente pelas provas da hidrólise da esculina e do hipurato de sódio, CAMP-test e de carboidratos e álcoois, representados pela inulina, lactose, manitol, rafinose, salicina, sorbitol e trealose, e multiplicação em NaCl a 6,5%. A interpretação foi realizada de acordo com Quinn et al. (2005), apresentado no Quadro 1. Os demais estreptococos isolados, incluindo os hemolíticos “não-*agalactiae*”, foram classificados como *Streptococcus* sp.

QUADRO 1. Resultados das reações bioquímicas para identificação de *Streptococcus agalactiae* isolados de espécies animais

Reação bioquímica	Resultado da prova
Inulina	negativo
Lactose	positivo
Rafinose	negativo
Salicina	(positivo)
Sorbitol	negativo
Trealose	positivo
Hipurato de sódio	positivo
Hidrólise de esculina	negativo
Multiplicação em NaCl a 6,5%	negativo

() = maioria das estirpes positivas

Fonte: modificado de Quinn et al. (2005).

4.5.4 Isolamento e identificação de *E. coli*

E. coli no ágar MacConkey fermentam a lactose com a produção de ácidos, formando colônias rosa-avermelhadas, devido à viragem do indicador em pH baixo. No ágar sangue bovino as colônias de *E. coli* apresentam-se com coloração acinzentada, com 1,5 a 2,5 mm de diâmetro, com produção ou não de beta-hemólise.

As linhagens bacterianas isoladas em ágar MacConkey foram submetidas às provas bioquímicas para enterobactérias utilizando meios de cultura sólidos e semi-sólidos, distribuídos em tubos de ensaio, visando

determinar os seguintes parâmetros: produção de gás (glicose), H₂S, urease, L-TD, motilidade, indol, lisina e citrato de Simmons. Foram classificadas como *E. coli* aquelas linhagens que se apresentaram positivas nas provas de gás / glicose, indol e lisina, motilidade (variável), e negativas para H₂S, urease, L-TD e citrato de Simmons (SILVA et al., 2001; TRABULSI et al., 2005).

4.5.5 Amostras bacterianas padrão

Foram utilizadas linhagens bacterianas padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 11229), adquiridas da Coleção de Culturas do IAL de São Paulo, e linhagem padrão de *S. agalactiae* (ATCC 13813), adquirida no INCQS do Rio de Janeiro (Figura 5). Estas linhagens padrão foram utilizadas como controles positivos nos testes e na determinação da sensibilidade analítica das provas.



FIGURA 5. Ampolas contendo linhagens bacterianas liofilizadas, utilizadas no estudo como referências (controles positivos) nas provas diagnósticas. Botucatu-SP, 2011.

4.6 CBT

Para a contagem de micro-organismos aeróbios e anaeróbios facultativos mesófilos e psicrotróficos nas amostras de leite do tanque de expansão, foi utilizado o Petrifilm[®] (3M - EUA), a partir de três diluições, a saber: 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} para mesófilos (48 horas de incubação a 35°C) e 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} para psicrotróficos (dez dias de incubação a 7°C). Foram realizadas duplicatas de cada diluição, para cálculo da média de contagem de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos.

As placas Petrifilm[®] consistem de cartões de papel quadriculado revestido de polietileno e recobertos por nutrientes desidratados em um gel hidrossolúvel a frio (Figura 6). O sistema é protegido por um filme plástico transparente revestido internamente pelo mesmo gel e corante indicador TCC. Ao adicionar a amostra em teste, os nutrientes são imediatamente re-hidratados, ocorre a solidificação do gel, após o que a placa estará pronta para ser incubada (SANT'ANA et al., 2002).

O TCC é um corante amplamente utilizado em meios de cultura para a enumeração de bactérias, em amostras contendo impedientes. Os micro-organismos viáveis reduzem o TCC por meio de enzimas, originando um composto de cor vermelha (formazano) que fica acumulado no interior dos grânulos das células coradas (SANT'ANA et al., 2002).



FIGURA 6. Petrifilm[®] utilizado para contagem bacteriana total (CBT) a partir de amostras de leite bovino, obtidas de tanques de expansão. Botucatu-SP, 2011.

4.7 CCS

A contagem eletrônica de células somáticas das amostras de leite foi realizada por citometria de fluxo com equipamento Somacount 300[®] (BENTLEY, 1995; LANGONI, 2000), no Laboratório do NUPEMAS, DHVSP FMVZ-UNESP/Botucatu-SP. Foram utilizados frascos plásticos próprios, contendo conservante (bronopol). Este conservante apresenta formato de pastilha que, em contato com o leite, forma uma mistura de coloração rosa-clara. As amostras colhidas ficam sob temperatura ambiente, no máximo, até cinco dias da colheita, para a realização das análises. Na técnica de citometria de fluxo, as células coradas são carregadas por um líquido, excitadas por um feixe de laser. Os núcleos corados emitem, por fluorescência, impulsos luminosos que são ampliados por um foto multiplicador, contados e convertidos em concentração de células somáticas (SILVEIRA et al., 2005). Foram considerados indicativos de infecção amostras com contagens iguais ou superiores a 750.000 células/mL (BRASIL, 2002).

4.8 mPCR

Todos os procedimentos referentes ao diagnóstico molecular do estudo foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico de Zoonoses, DHVSP- FMVZ/UNESP – Botucatu-SP.

4.8.1 Pesquisa dos materiais genômicos de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nas amostras de leite colhidas dos tanques de expansão

4.8.1.1 Extração de ácidos nucleicos

As amostras de leite, mantidas congeladas, permaneceram em temperatura ambiente até atingirem aproximadamente 20°C. A extração do DNA, tanto das amostras de leite, quanto das linhagens bacterianas de referência, foi realizada utilizando-se o kit comercial *Milk Bacterial DNA Isolation Kit* (Norgen Biotek Corporation, Ontario, Canadá), de acordo com as recomendações do fabricante (Anexo 3).

4.8.1.2 Desenho dos iniciadores

Para identificação molecular de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* foram utilizados os iniciadores SAU1 e SAU2, SAGA1 e SAGA2, SIP3(F) e SIP4(R), Ecoli1 e Ecoli2, derivados de seqüências previamente publicadas (CHOTÁR et al., 2006). Os iniciadores amplificam regiões espécie-específicas do DNA codificadoras das regiões 16S e 23rRNA, baseado nas seqüências do banco de dados GenBank (Tabela 2).

TABELA 2. Iniciadores utilizados no estudo para a amplificação do DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* em amostras de leite bovino, pela técnica de mPCR. Botucatu-SP, 2011.

Cepas	Iniciadores	Seqüências dos iniciadores	Peso molecular do produto (pb)
<i>S. aureus</i>	SAU1	5'-GGA CGA CAT TAG ACG AAT CA -3'	1300
	SAU2	5'-CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT -3'	
<i>S. agalactiae</i>	SAGA1	5'-CGT TGG TAG GAG TGG AAA AT - 3'	590
	SAGA2	5'-CTG CTC CGA AGA GAA AGC CT - 3'	
	SIP3(F)	5'-TGA AAA TGC AGG GCT CCA ACC TCA -3'	293
	SIP4(R)	5'-GAT CTG GCA TTG CAT TCC AAG TAT -3'	
<i>E. coli</i>	Ecoli1	5'-GCT TGA CAC TGA ACA TTG AG -3'	660
	Ecoli2	5'-GCA CTT ATC TCT TCC GCA TT -3'	

pb: pares de bases

(CHOTÁR et al., 2006)

4.8.1.3 Amplificação do material genético pela mPCR

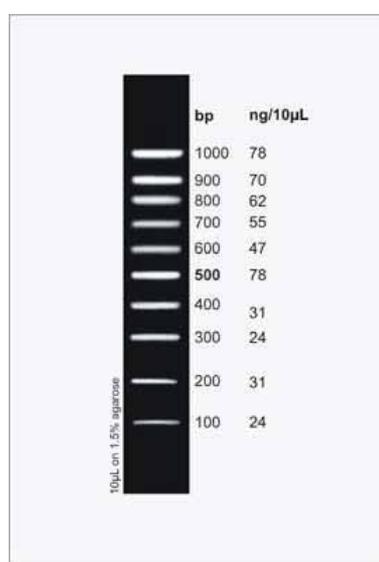
Para cada reação, foram utilizados 17,5µL de água miliQ; 2,5µL de tampão de reação (10mM Tris HCl pH 8.0, 50mM KCl); 0,75µL de MgCl₂ (1,5mM); 0,5µL de dNTP (0,2mM); 2,0µL de cada primer (10pM); 0,5µL (0,2 unidades) de *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen - EUA), e 3µL de DNA genômico (10ng). As condições de termociclagem foram: 96°C por 5'; 30 ciclos de 96°C por 1', 55°C por 1'e 72°C por 2'; e último ciclo de 72°C por 8'. Os

controles positivos da reação foram cepas de referência (ATCCs), provenientes da FIOCRUZ. Os controles negativos foram água MiliQ.

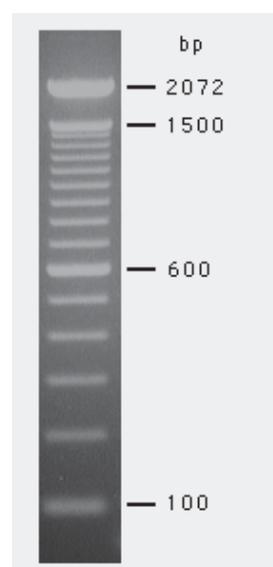
4.8.1.4 Visualização dos produtos amplificados

A visualização do material amplificado foi avaliada pela corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% adicionado de 1,0 μ L/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen -EUA). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 1X (89 nM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) com voltagem de 65V. O gel foi visualizado em transluminador de luz UV e a imagem capturada pelo sistema de documentação digital. Foram utilizados 8 μ L do material amplificado e como marcador de peso molecular 4 μ L de 100pb ladder (Invitrogen - EUA) (Figura 7). Para todas as amostras foram acrescentados 2 μ L do tampão de corrida.

A diferença de peso molecular entre produtos da PCR (*S. agalactiae*: 293 e 590 pb, *E. coli*: 660 pb, *S. aureus*: 1300 pb) facilitou a identificação e distinção entre os DNAs dos micro-organismos-alvo à eletroforese.



Norgen: PCR Sizer 100 bp DNA Ladder (Cat# 11400)



Invitrogen: 100 bp DNA Ladder (Cat15628-019)

FIGURA 7. Padrões de peso molecular utilizados nas análises de PCR e mPCR. Botucatu-SP, 2011.

4.8.2 Teste de sensibilidade analítica da mPCR

Linhagens padrão de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* foram utilizadas para a determinação do limiar de detecção dos DNAs-alvo, pela técnica de

mPCR. Para tanto, realizou-se o cultivo das amostras bacterianas de referência em ágar sangue a 10%, com incubação de aproximadamente 36 horas. As colônias foram transferidas com auxílio de alça de platina para tubo de vidro contendo solução salina estéril, até ser obtida turvação correspondente ao valor 1,0 da escala de MacFarland. Foram utilizados inóculos individuais de *S. aureus*, *E. coli* e *S. agalactiae* e um inóculo composto pelos três microorganismos.

Uma alíquota de 1mL de cada solução foi transferida para microtubo livre de DNases e RNases, para a realização da extração de DNA.

As amostras de DNA extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare® - EUA). Para a calibração, foram utilizados 2 µL de água Milli Q estéril (branco) e, para a quantificação, 2 µL do DNA extraído. As concentrações de DNA de *E. coli*, *S. aureus* e *S. agalactiae* foram de 118ng/µL; 15,7ng/µL e 10,5ng/µL, respectivamente. A partir da leitura em ng/µL, foi realizada a diluição com água Milli Q estéril para ajustar a concentração em 1ng/µL.

Utilizando o exemplo da concentração de DNA de *E. coli*, temos:

$$c1 \times v1 = c2 \times v2$$

$$118\text{ng}/\mu\text{L} \cdot V1 = 1\text{ng}/\mu\text{L} \cdot 100 \mu\text{L}$$

$V1 = 0,847 \mu\text{L}$ produto de DNA quantificado + $99,153 \mu\text{L}$ de água Milli Q, para obter $1\text{ng}/\mu\text{L}$.

Foram preparados cinco microtubos contendo $90 \mu\text{L}$ de água Milli Q estéril cada. Da amostra contendo $1 \text{ng}/\mu\text{L}$, retirou-se $10 \mu\text{L}$ que foram diluídos em $90 \mu\text{L}$ de água MiliQ contido no primeiro microtubo. Deste foram procedidas diluições sucessivas, em base 10, nos demais. Desta forma, obteve-se as concentrações de DNA de $1 \text{ng}/\mu\text{L}$, $100 \text{pg}/\mu\text{L}$, $10 \text{pg}/\mu\text{L}$, $1 \text{pg}/\mu\text{L}$, $100 \text{fg}/\mu\text{L}$, $10 \text{fg}/\mu\text{L}$ (Figura 8).

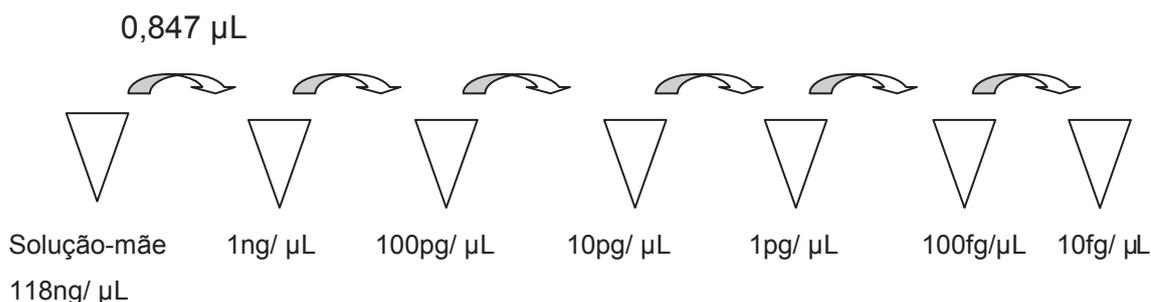


FIGURA 8. Esquema das diluições seriadas realizadas com amostra de DNA quantificado de *E. coli* (amostra de referência) para avaliação da sensibilidade analítica da técnica de mPCR. Botucatu-SP, 2011.

As soluções de DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, bem como suas respectivas diluições, foram submetidas à mPCR, individualmente, e em conjunto. Foi considerado como limiar de detecção para cada DNA-alvo a última diluição onde houve visualização de banda (produto de mPCR) à eletroforese.

4.8.3 Teste de especificidade analítica da mPCR

Para testar a especificidade dos iniciadores (*S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*) frente à presença do material genômico de outras espécies bacterianas comumente encontradas em amostras de leite, foram utilizados os DNAs de linhagens padrão de *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* e *P. aeruginosa*, adquiridas no INCQS do Rio de Janeiro.

4.8.4 Teste de reprodutibilidade da mPCR

A reprodutibilidade dos produtos da mPCR foi testada por meio da análise do DNA de cinco amostras selecionadas ao acaso do total das estudadas, mais os DNAs das linhagens padrão de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, utilizados como controles positivos. Foram realizadas reações de amplificação durante cinco dias consecutivos para a avaliação da reprodutibilidade entre testes.

4.9 Análise dos resultados

A prevalência de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nos rebanhos estudados foi obtida com base nos resultados de cultivo microbiológico e mPCR.

O teste ajustado de χ^2 de McNemar (Phuektes et al., 2001) foi utilizado para o cálculo da acurácia, sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos da técnica de mPCR frente ao cultivo microbiológico. Probabilidades menores que 0,05 foram consideradas significativas.

Os resultados obtidos pelas técnicas de cultivo microbiológico e de mPCR a partir das amostras de leite dos tanques de expansão avaliados, bem como os resultados de cultivo microbiológico das amostras de leite dos quartos mamários dos animais dos rebanhos foram avaliados frente aos dados epidemiológicos das propriedades, para a análise da relação entre as condições gerais de ordenha e os resultados obtidos pelas técnicas diagnósticas.



RESULTADOS

5 – RESULTADOS

5.1 Questionário epidemiológico e características das propriedades

Os resultados dos questionários epidemiológicos aplicados nas vinte propriedades leiteiras avaliadas estão apresentados nas tabelas 3a e 3b.

Nas figuras 9 e 10 estão apresentados diferentes sistemas de ordenha, utilizados em algumas das propriedades envolvidas no estudo.

Nas tabelas 4a e 4b são apresentados os resumos das características das fazendas, com base nas condições de higiene e manejo de ordenha; média de produção leiteira e de CCS das amostras de leite dos tanques de expansão.

TABELA 3a. Características gerais das propriedades leiteiras avaliadas (1 a 10), localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Características	Propriedades leiteiras									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Localização (município)	Botucatu	Nova Odessa	Areiópolis	Pardinho	São Pedro	São Pedro	Lençóis Paulista	Porto Feliz	Itatinga	Itatinga
Produção total de leite (L/dia)	1.300	3.300	1.400	2.000	7.345	3.200	500	2.400	1.700	295
No. de animais em lactação	75	126	94	116	273	160	29	129	90	40
Número de animais avaliados	77	123	87	110	51	56	27	58	86	44
Média diária de produção de leite por animal	17,3	26,1	14,8	17,2	26,9	20	17,2	18,6	18,8	7,3
No. de ordenhas diárias	2	3	2	2	3	3	2	2	2	2
No. de animais com mastite clínica	0	2	10	2	0	1	1	2	2	0
Sistema de ordenha	Canalizado	Canalizado	Canalizado	Canalizado	Canalizado	Canalizado	Canalizado	Canalizado	Canalizado	Canalizado
Lavagem dos tetos antes da ordenha	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Secagem dos tetos / como	Papel toalha	Papel toalha	Jornal	Papel toalha	Papel toalha	Papel toalha	Papel toalha	Papel toalha	Papel toalha	Papel toalha
Pré dipping / desinfetante utilizado	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / iodo	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / iodo	Sim / iodo	Sim / cloro
Pós dipping / desinfetante utilizado	Sim / iodo	Sim / iodo	Sim / cloro	Sim / iodo	Sim / iodo	Sim / iodo	Sim / iodo	Sim / iodo	Sim / iodo	Sim / iodo
Faz prova Tamis (caneca telada de fundo escuro)	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Faz teste CMT	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não
Critério para tratamento de mastite clínica	Aleatório	Antibiograma	Aleatório	Aleatório	Aleatório	Aleatório	Aleatório	Aleatório	Aleatório	Aleatório
Desinfecção tetos pós-ordenha / desinfetante	Sim / cloro	Sim / cloro	Não	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro
Manejo animais pós-ordenha	Alimentação	Alimentação	Alimentação	Alimentação	Alimentação	Alimentação	Alimentação	Repouso	Alimentação	Alimentação
Realiza terapia/profilaxia vaca seca	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Limpeza diária equipamentos ordenha	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Registra os animais	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Acompanhamento veterinário	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Condição de higiene	Ruim	Satisfatória	Regular	Satisfatória	Satisfatória	Satisfatória	Satisfatória	Regular	Satisfatória	Ruim
Estrutura da sala de ordenha	Regular	Satisfatória	Regular	Satisfatória	Satisfatória	Satisfatória	Satisfatória	Satisfatória	Satisfatória	Ruim
Higienização do tanque	Dias alternados	Diária	Diária	Dias alternados	Diária	Diária	Diária	Diária	Diária	Dias alternados
CCS do tanque (x 10 ³ células/mL)	230	59	138	544	236	160	815	306	418	1.422
CBT* do tanque (UFC/mL)	2,2 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁵	4,7 x 10 ⁴	4,9 x 10 ⁴	1,6 x 10 ³	< 10 ¹	1,4 x 10 ⁵	4,7 x 10 ⁴	4,8 x 10 ⁵
Classificação	B	A	B	B	A	A	B	B	A	B

*mesófilos

TABELA 3b. Características gerais das propriedades leiteiras avaliadas (11 a 20), localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Características	Propriedades leiteiras									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Localização (município)	Lins	Agudos	Botucatu	Botucatu	Itatinga	Araras	Nova Odessa	Santa Rita do Passa Quatro	Conchas	Botucatu
Produção total de leite (L/dia)	4.700	19.800	450	120	900	34.000	700	2.200	1.050	80
No. de animais em lactação	260	580	75	19	39	970	65	96	46	28
Número de animais avaliados	54	85	75	19	39	330	61	94	46	28
Média diária produção leite por animal	18	34,1	6	6,3	23	35	10,7	22,9	22,8	2,8
No. de ordenhas diárias	3	3	1	2	2	3	2	2	2	1
No. de animais com mastite clínica	10	6	1	0	6	10	5	6	2	1
Sistema de ordenha	Canalizado	Canalizado	Balde ao pé	Balde ao pé	Balde ao pé	Canalizado	Canalizado	Canalizado	Canalizado	Balde ao pé
Lavagem dos tetos antes da ordenha	Sim	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
Secagem dos tetos / como	Papel toalha	Papel toalha	Não	Não	Jornal	Papel toalha	Papel toalha	Papel toalha	Papel toalha	Pano
Pré dipping / desinfetante utilizado	Sim / iodo	Sim / cloro	Não	Não	Não	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / ácido láctico	Não
Pós dipping / desinfetante utilizado	Sim / iodo	Sim / cloro	Não	Não	Não	Sim / iodo	Sim / iodo	Sim / iodo	Sim / iodo	Não
Faz prova Tamis (caneca telada de fundo escuro)	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Faz teste CMT	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não
Critério para tratamento de mastite clínica	Aleatório	Aleatório	Aleatório	Aleatório	Aleatório	Antibiograma	Antibiograma	Aleatório	Aleatório	Aleatório
Desinfecção teteiras pós-ordenha / desinfetante	Sim / cloro	Sim	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro	Sim / cloro
Manejo animais pós-ordenha	Alimentação	Alimentação	Repouso	Repouso	Repouso	Alimentação	Alimentação	Alimentação	Alimentação	Repouso
Realiza terapia/profilaxia vaca seca	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Limpeza diária equipamentos ordenha	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Registra os animais	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Acompanhamento veterinário	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Condição de higiene	Regular	Satisfatória	Regular	Regular	Ruim	Satisfatória	Satisfatória	Satisfatória	Satisfatória	Regular
Estrutura da sala de ordenha	Satisfatória	Satisfatória	Regular	Regular	Ruim	Satisfatória	Satisfatória	Satisfatória	Satisfatória	Regular
Higienização do tanque	Dias alternados	Diária	Dias alternados	Dias alternados	Dias alternados	Diária	Diária	Diária	Diária	Dias alternados
CCS do tanque (x 10 ³ células/mL)	735	113	120	550	267	391	528	827	590	400
CBT* do tanque (UFC/mL)	7,3 x 10 ⁴	7,0 x 10 ⁵	3,1 x 10 ⁶	2,2 x 10 ⁵	6,0 x 10 ⁴	< 10 ¹	< 10 ¹	2,8 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁴	1,3 x 10 ⁷
Classificação	B	A	C	C	C	A	A	A	A	C

*mesófilos

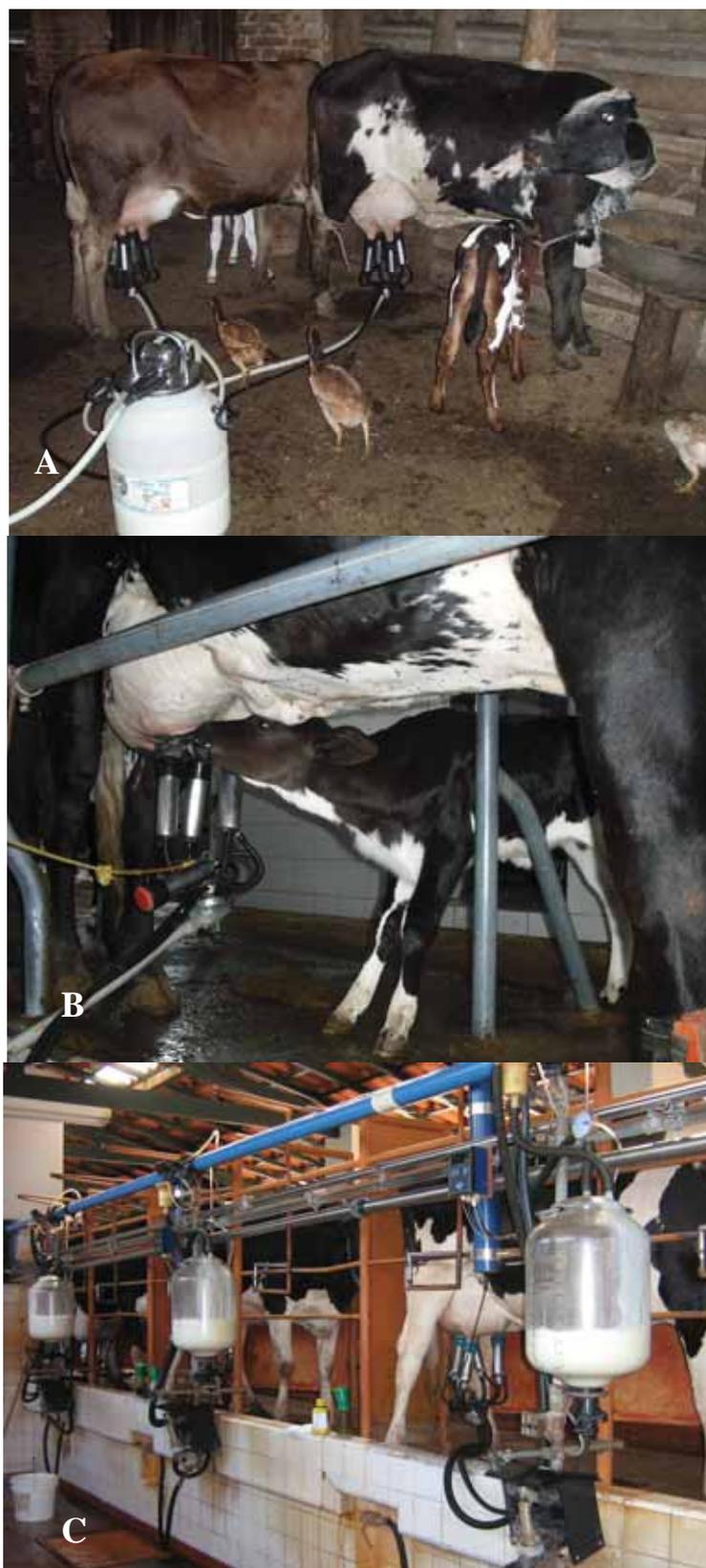


FIGURA 9. A: Sistema de ordenha bovino tipo balde-ao-pé. B: Sistema de ordenha tipo canalizado, com manejo de bezerro ao pé. C: Sistema de ordenha bovino tipo canalizado convencional. Botucatu-SP, 2011.

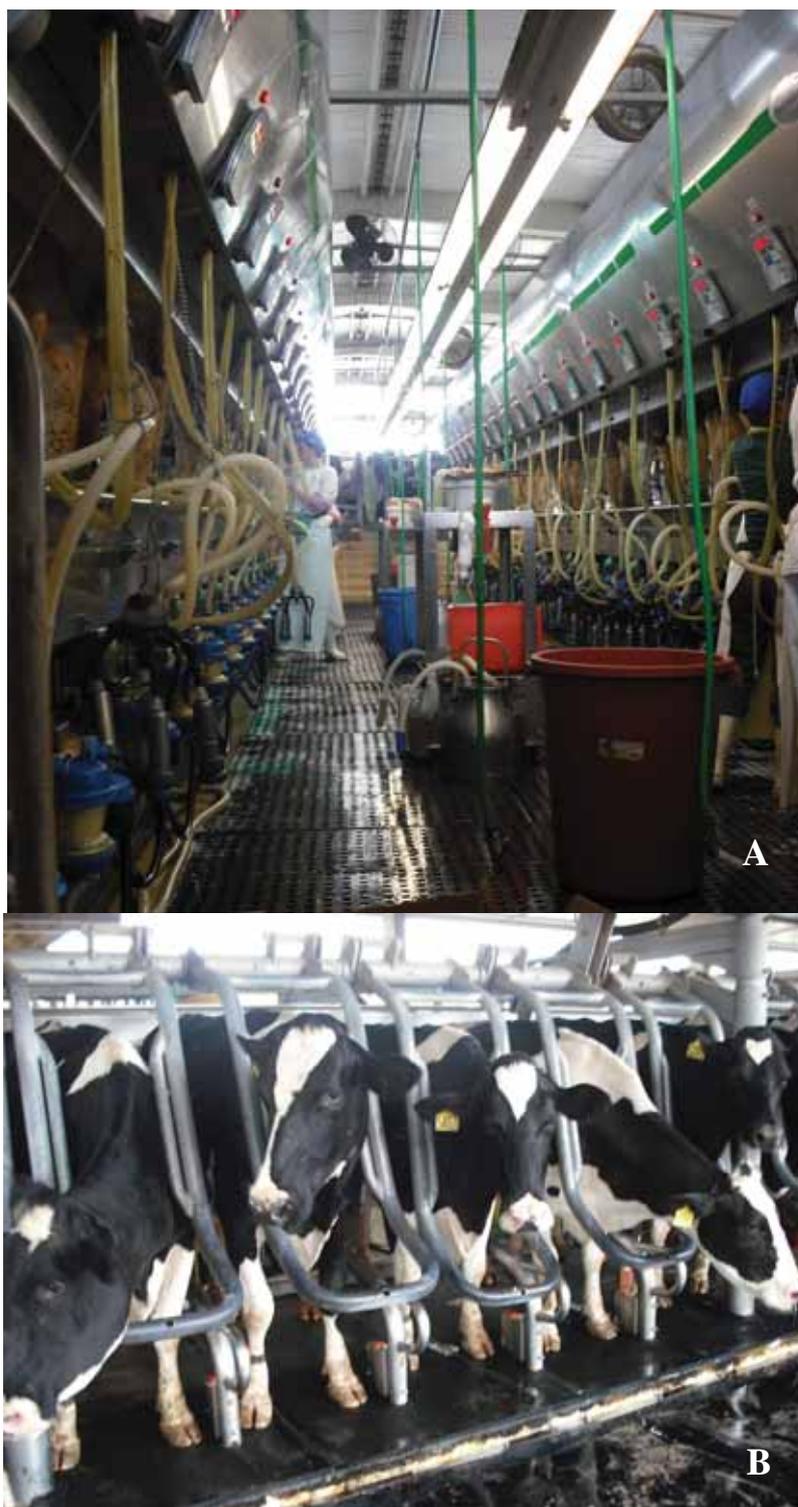


FIGURA 10. A: Sistema de ordenha bovino tipo canalizado de alta tecnificação. B: Vacas de excelente genética e elevada produção leiteira, em sistema de ordenha tecnificado. Botucatu-SP, 2011.

TABELA 4a. Resumo das principais características observadas entre as vinte propriedades leiteiras avaliadas, do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.

Característica	Ocorrências
Condições satisfatórias de ordenha (Grupo A)	9 (45%)
Condições regulares de ordenha (Grupo B)	7 (35%)
Condições insatisfatórias de ordenha (Grupo C)	4 (20%)
Sistema de ordenha	16 (80%) canalizado 4 (20%) balde ao pé
Lavagem tetos antes ordenha	9 (45%) sim 11 (55%) não
Secagem tetos	2 (10%) não 15 (75%) papel toalha 2 (10%) jornal 1 (5%) pano
Pré-dipping	4 (20%) não 11 (55%) cloro 4 (20%) iodo 1 (5%) ácido láctico
Pós-dipping	4 (20%) não 14 (70%) iodo 2 (10%) cloro
Prova de Tamis	16 (80%) sim 4 (20%) não
CMT	6 (30%) sim 14 (70%) não
Tratamento mastite	17 (85%) sem base em antibiograma 3 (15%) com base em antibiograma
Desinfecção teteiras pós-ordenha	19 (95%) sim 1 (5%) não
Manejo pós-ordenha	15 (75%) alimentação 5 (25%) repouso
Terapia/profilaxia vaca seca	15 (75%) sim 5 (25%) não
Acompanhamento veterinário	16 (80%) sim 4 (20%) não
Higiene sala ordenha	3 (15%) insatisfatória 6 (30%) regular 11 (55%) satisfatória
Estrutura sala ordenha	2 (10%) insatisfatória 5 (25%) regular 13 (65%) satisfatória
Higienização tanque expansão	8 (40%) diária 12 (60%) em dias alternados
Limpeza diária sala ordenha	20 (100%) sim
Registra os dados dos animais	16 (80%) sim 4 (20%) não

Na Figura 11 são apresentadas condições insatisfatórias de higiene e de manejo em algumas das propriedades envolvidas no estudo.



FIGURA 11. Propriedades leiteiras com manejo higiênico deficitário. A: presença de cão na sala de ordenha. B: conjunto de ordenha sujo com fezes bovinas. C: bovino em repouso na lama, imediatamente após ordenha. D: intenso grau de sujeira do úbere em animal recém-chegado à sala de ordenha. E e F: utilização de pano para secagem dos tetos. Botucatu-SP, 2011.

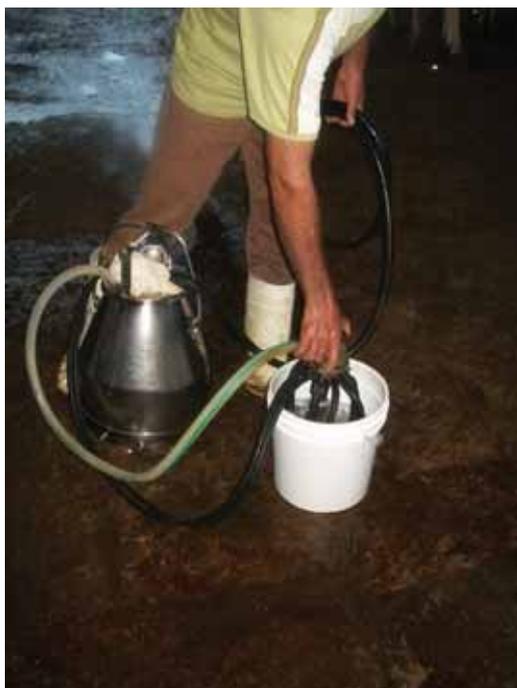


FIGURA 12. Procedimento de desinfecção do conjunto de ordenha (sistema balde ao pé) realizado em uma das 20 propriedades avaliadas, localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.



FIGURA 13. Procedimento de desinfecção *back-flushing* dos conjuntos de ordenha (sistema canalizado), realizado em uma das 20 propriedades avaliadas, localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.

Na Figura 14 são apresentadas condições satisfatórias de higiene e manejo em algumas das propriedades envolvidas no estudo.

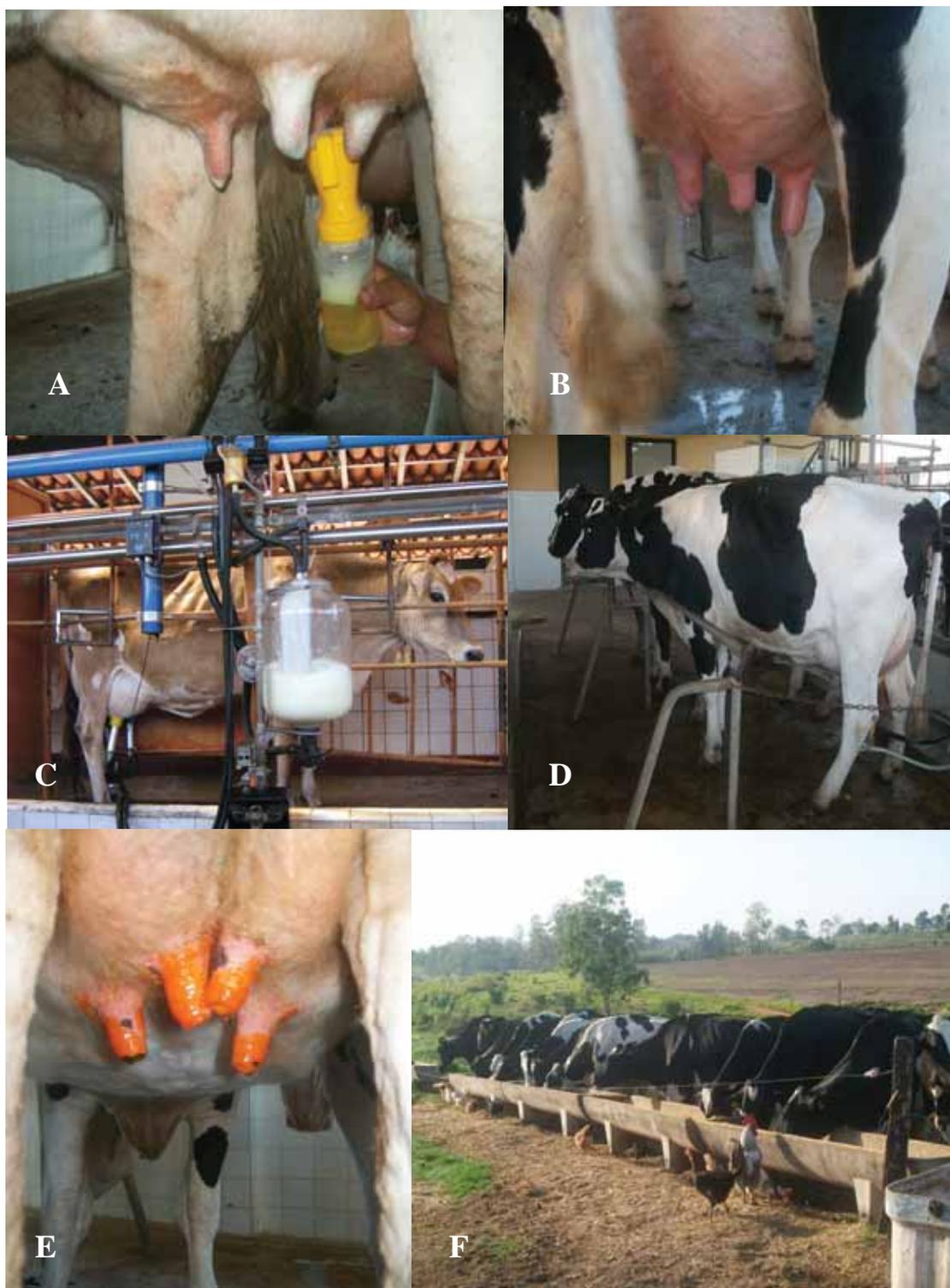


FIGURA 14. Propriedades leiteiras com manejo e higiene satisfatórios. A: realização de *pré-dipping* com ácido láctico. B: tetos limpos e secos antes da ordenha. C e D: Sala de ordenha limpa. E: Tetos com solução desinfetante (iodo glicerinado) – *pós-dipping*. F: Animais se alimentando após ordenha. Botucatu-SP, 2011.

TABELA 4b. Resumo das principais características observadas entre as vinte propriedades leiteiras avaliadas, localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.

Característica	Ocorrências
Produção diária de leite/propriedade (L)	Média: 4.372 Mediana: 1.550 Total geral: 87.445
Produção diária de leite/animal (L)	Média: 18,3 Mediana: 18,3 Total geral: 366
Animais em lactação	Média: 165 Mediana: 92 Total geral: 3.310
Número de animais com mastite clínica	Média: 3,3 Mediana: 2 Total geral: 67
Número de animais avaliados	1.550
Número de amostras de leite avaliadas	6.066

5.2 CMT

Na Figura 15 está representado um exemplo de análise de leite pelo CMT. Os resultados obtidos pela prova de CMT são apresentados na Tabela 5.



FIGURA 15. Amostra de leite bovino submetida ao CMT. Nota-se coagulação (gelificação) classificada como três cruces, caracterizando mastite subclínica. Botucatu-SP, 2011.

TABELA 5. Frequências (absoluta e relativa) de resultados ao CMT a partir de amostras de leite colhidas dos quartos mamários de vacas em produção das 20 propriedades avaliadas, localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.

Fazenda	Negativo	1+	2+	3+	Total mastite subclínica	Mastite clínica	Tetos perdidos**
1 (n=308)	241 (78,2%)	28 (9,1%)	19 (6,2%)	20 (6,5%)	67 (21,8%)	0	0
2 (n=481)	406 (84,4%)	25 (5,1%)	18 (3,7%)	30 (6,2%)	73 (15,2%)	2 (0,4%)	11 (2,2%)
3 (n=329)	197 (59,8%)	45 (13,7%)	36 (10,9%)	51 (15,5%)	132 (40,1%)	0	19 (5,4%)
4 (n=428)	343 (80,1%)	15 (3,5%)	17 (3,9%)	53 (12,4%)	85 (19,8%)	0	12 (2,7%)
5 (n=198)	144 (72,7%)	10 (5,0%)	11 (5,5%)	33 (16,6%)	54 (27,2%)	0	6 (2,9%)
6 (n=223)	178 (79,8%)	14 (6,3%)	16 (7,2%)	15 (6,7%)	45 (20,2%)	0	1 (0,4%)
7 (n=106)	79 (74,5%)	9 (8,5%)	10 (9,4%)	8 (7,5%)	27 (25,5%)	0	2 (1,85%)
8 (n=229)	172 (75,1%)	9 (3,9%)	13 (5,7%)	32 (13,9%)	54 (23,6%)	3 (1,3%)	3 (1,3%)
9 (n=348)	283 (81,3%)	28 (8,0%)	25 (7,1%)	12 (3,4%)	65 (18,6%)	0	0
10 (n=174)	74 (42,5%)	39 (22,4%)	22 (12,6%)	39 (22,4%)	100 (57,4%)	0	2 (1,1%)
11 (n=209)	128 (61,2%)	31 (14,8%)	23 (11%)	27 (12,9%)	81 (38,7%)	0	7 (3,3%)
12 (n=333)	204 (61,2%)	33 (9,9%)	34 (10,2%)	62 (18,6%)	129 (38,7%)	0	7 (2,1%)
13 (n=297)	229 (77,1%)	29 (9,7%)	22 (7,4%)	17 (5,7%)	68 (22,8%)	0	3 (1,0%)
14 (n=76)	49 (64,4%)	8 (10,5%)	11 (14,4%)	8 (10,5%)	27 (35,5%)	0	0
15 (n=155)	104 (67%)	25 (16,1%)	18 (11,6%)	8 (5,1%)	51 (32,9%)	0	1 (0,6%)
16 (n=1273)	853 (67%)	35 (2,7%)	83 (6,5%)	302 (23,7%)	420 (32,9%)	11 (0,8%)	55 (4,3%)
17 (n=239)	156 (65,2%)	22 (9,2%)	29 (12,1%)	32 (13,3%)	83 (34,7%)	5 (2,0%)	5 (2,0%)
18 (n=369)	276 (74,7%)	10 (2,7%)	23 (6,2%)	60 (16,2%)	93 (25,2%)	0	7 (1,8%)
19 (n=179)	129 (72,0%)	16 (8,9%)	17 (9,4%)	17 (9,4%)	50 (27,9%)	0	5 (2,7%)
20 (n=112)	95 (84,8%)	9 (8,0%)	5 (4,4%)	3 (2,6%)	17 (15,1%)	0	0
Total (n=6.066)	4.340 (71,6%)	440 (7,2%)	430 (7,4%)	829 (13,6%)	1.721 (28,3%)	21 (0,3%)	146 (2,4%)

n: total de amostras de leite analisadas; 1+: uma cruz; 2+: duas cruces; 3+: três cruces.

5.3 Isolados bacterianos

Na Figura 16 são apresentadas características fenotípicas dos isolados bacterianos obtidos de amostras de leite de tanques de expansão.

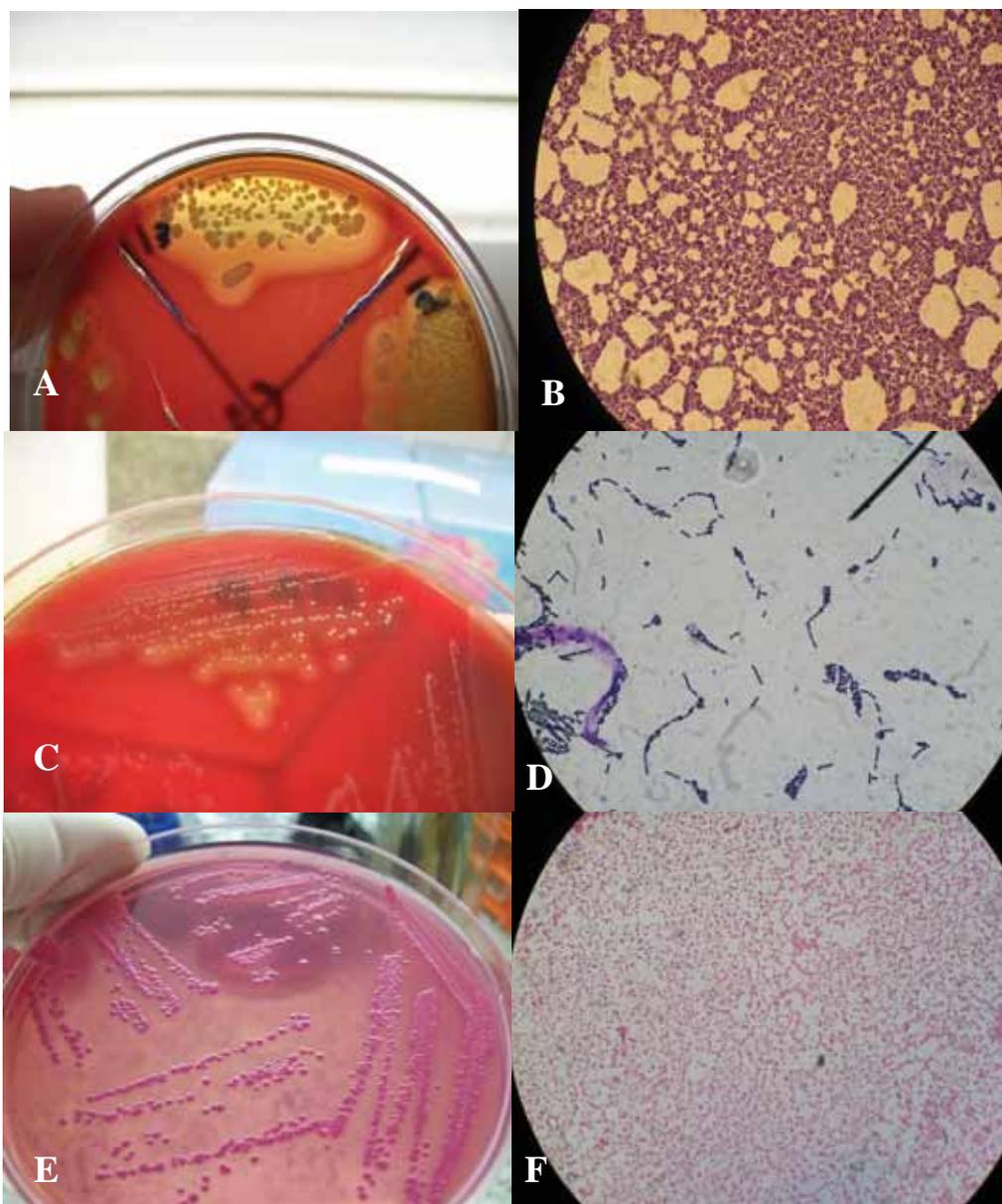


FIGURA 16. Isolados bacterianos obtidos a partir de amostras de leite bovino, colhidas de tanques de expansão. À esquerda, características fenotípicas macroscópicas das colônias. À direita, características fenotípicas microscópicas visualizadas em microscópio óptico com óleo de imersão, coloração de Gram e aumento de 100 vezes. A: colônias de estafilococos beta-hemolíticos isolados em ágar sangue. B: cocos Gram positivos, dispostos em grupamentos (cachos-de-uva). C: colônias de estreptococos beta-hemolíticos isolados em ágar sangue. D: cocos Gram positivos, dispostos em cadeias. E: colônias de enterobactérias, lactose positivas, isoladas em ágar MacConkey. F: bacilos Gram negativos. Botucatu-SP, 2011.

Nas Tabelas 6 e 7 estão apresentados os resultados de isolamento microbiano das amostras de leite colhidas dos animais, e nas Tabelas 8 e 9 os isolados obtidos em amostras de leite dos tanques de expansão das 20 propriedades avaliadas.

TABELA 6. Freqüências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos, frente ao total de amostras de leite avaliadas, de vacas em produção das 20 propriedades avaliadas, localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.

Fazenda	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Corynebacterium</i> sp.	Leveduriformes	Outros
1 (n=308)	10 (3,2%)	0	0	17 (5,5%)	10 (3,2%)	18 (5,8%)	1 (0,3%)	1 (0,3%)
2 (n=481)	13 (2,7%)	0	5 (1,0%)	7 (1,4%)	10 (2,0%)	0	0	0
3 (n=329)	15 (4,5%)	12 (3,6%)	4 (1,2%)	33 (10,0%)	57 (17,3%)	59 (17,9%)	0	2 (0,6%)
4 (n=428)	12 (2,8%)	1 (0,2%)	0	16 (3,7%)	7 (1,6%)	20 (4,6%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)
5 (n=198)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0	9 (4,5%)	2 (1,0%)	32 (16,2%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)
6 (n=223)	6 (2,7%)	0	0	4 (1,8%)	3 (1,3%)	21 (9,4%)	0	1 (0,4%)
7 (n=106)	3 (2,8%)	0	0	10 (9,4%)	3 (2,8%)	1 (0,9%)	3 (2,8%)	1 (0,9%)
8 (n=229)	6 (2,6%)	2 (0,9%)	0	3 (1,3%)	8 (3,5%)	25 (10,9%)	0	1 (0,4%)
9 (n=348)	11 (3,1%)	0	0	3 (0,8%)	7 (2,0%)	32 (9,1%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)
10 (n=174)	42 (24,1%)	0	5 (2,8%)	23 (13,2%)	17 (9,7%)	46 (26,4%)	0	6 (3,4%)
11 (n=209)	8 (3,8%)	0	1 (0,4%)	11 (5,2%)	5 (2,3%)	30 (14,3%)	1 (0,4%)	1 (0,4%)
12 (n=333)	11 (3,3%)	1 (0,3%)	11 (3,3%)	21 (6,3%)	17 (5,1%)	20 (6,0%)	1 (0,3%)	9 (2,7%)
13 (n=297)	10 (3,3%)	1 (0,3%)	0	9 (3,0%)	7 (2,3%)	36 (12,1%)	0	0
14 (n=76)	16 (21,0%)	0	0	3 (3,9%)	1 (1,3%)	20 (26,3%)	0	0
15 (n=155)	35 (22,5%)	0	0	8 (5,1%)	2 (1,2%)	22 (14,1%)	1 (0,6%)	2 (1,2%)
16 (n=1273)	8 (0,6%)	0	5 (0,3%)	50 (3,9%)	73 (5,7%)	3 (0,2%)	0	28 (2,1%)
17 (n=239)	11 (4,6%)	0	5 (2,0%)	25 (10,4%)	24 (10,0%)	17 (7,1%)	0	0
18 (n=369)	0	14 (3,7%)	1 (0,2%)	28 (7,5%)	5 (1,3%)	12 (3,2%)	2 (0,5%)	4 (1,0%)
19 (n=179)	4 (2,2%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)	8 (4,4%)	3 (1,6%)	19 (10,6%)	0	1 (0,5%)
20 (n=112)	5 (4,4%)	3 (2,6%)	0	4 (3,5%)	1 (0,8%)	4 (3,5%)	0	0
Total (n=6.066)	227 (3,7%)	36 (0,5%)	38 (0,6%)	292 (4,8%)	262 (4,3%)	437 (7,2%)	12 (0,2%)	60 (1,0%)

n: total de amostras de leite avaliadas.**total de quartos mamários improdutivos

TABELA 7. Freqüências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos, frente ao total de isolamentos obtidos a partir de amostras de leite de vacas em produção das 20 propriedades avaliadas, localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.

Micro-organismo	Freqüência absoluta	Freqüência relativa (%)
<i>Corynebacterium</i> sp.	437	32,0
<i>Staphylococcus</i> sp.	292	21,4
<i>Streptococcus</i> sp.	262	19,3
<i>S. aureus</i> *	227	16,6
Outros**	60	4,4
<i>E. coli</i> *	38	2,7
<i>S. agalactiae</i> *	36	2,6
Leveduriformes	12	0,8
TOTAL	1.364	100

*Freqüência dos micro-organismos-alvo: 301 (22%)

**Demais micro-organismos não-alvos, tais como outras espécies de enterobactérias, *Pseudomonas* sp., entre outros.

TABELA 8. Micro-organismos isolados a partir de amostras de leite dos tanques de expansão de 20 propriedades avaliadas, localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Fazenda	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Corynebacterium</i> sp.	Leveduriformes	Outros**
1	-	-	-	+	+	-	-	+
2	-	-	+	+	+	-	-	-
3	-	-	+	-	-	-	-	+
4	-	-	-	+	-	-	-	+
5	-	-	-	+	-	-	-	+
6	-	-	-	+	-	-	-	-
7	-	-	-	+	+	-	+	-
8	-	+	-	-	-	-	-	+
9	+	-	-	-	+	-	-	+
10	+	-	+	-	+	-	-	+
11	-	-	-	+	+	+	-	+
12	-	+	+	-	-	-	-	+
13	+	-	+	-	+	-	-	+
14	+	-	-	+	-	-	-	-
15	+	-	+	-	-	-	-	+
16	-	-	-	-	+	-	+	+
17	-	-	-	-	+	-	-	+
18	-	-	+	-	+	-	-	+
19	+	-	+	+	+	-	-	+
20	-	-	-	-	+	-	-	+
Freqüência*	6 (30,0%)	2 (10,0%)	8 (40,0%)	9 (45,0%)	12 (60%)	1 (5,0%)	2 (10,0%)	16 (80,0%)

*Relativa ao total de amostras de leite de tanque avaliadas. ** Demais micro-organismos não-avulsos, tais como outras espécies de enterobactérias, *Pseudomonas* sp., entre outros.

+: isolamento do agente (amostra positiva); -: ausência de isolamento do agente (amostra negativa).

TABELA 9. Freqüências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos, frente ao total de isolamentos obtidos a partir de amostras de leite de tanque de expansão de 20 propriedades localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.

Micro-organismo	Freqüência absoluta	Freqüência relativa (%)
Outros*	16	28,5
<i>Streptococcus</i> sp.	12	21,4
<i>Staphylococcus</i> sp.	9	16,0
<i>E. coli</i>	8	14,2
<i>S. aureus</i>	6	10,7
<i>S. agalactiae</i>	2	3,5
Leveduriformes	2	3,5
<i>Corynebacterium</i> sp.	1	1,7
TOTAL	56	100

*Demais micro-organismos não-alvos, tais como outras espécies de enterobactérias, *Pseudomonas* sp., entre outros.

5.4 CCS

Os resultados de CCS (média do pool das amostras de leite dos animais avaliados, e média das amostras de leite dos tanques de expansão), estão apresentados na Tabela 10.

TABELA 10. Resultado da Contagem de Células Somáticas (CCS) realizada a partir de amostras de leite dos rebanhos em produção e dos tanques de expansão de 20 propriedades avaliadas, localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.

Propriedade (identificação)	CCS x 10 ³ (Média do rebanho)*	CCS x 10 ³ (Mediana do rebanho)	CCS x 10 ³ (tanque de expansão)	Classificação propriedade**
2	436	80	59	A
12	538	83	113	
6	361	56	160	
5	435	136	236	
16	1260	420	391	
9	483	156	418	
17	878	120	528	
19	827	232	590	
18	1198	371	827	
3	405	108	138	B
1	421	165	230	
8	683	207	306	
4	607	155	544	
11	537	290	735	
7	740	231	815	
10	1940	984	1422	
14	11	3	11	C
13	55	9	120	
15	1192	249	267	
20	17	0	400	

*Média dos animais avaliados

**Segundo condições gerais de higiene de ordenha

CCS geral dos tanques de expansão	Média: 442,4 (x10 ³ células/mL) Mediana: 395,5 (x10 ³ células/mL)
-----------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------

Na Tabela 11 apresenta-se a distribuição das propriedades avaliadas, com relação à CCS obtidas nas amostras de leite dos tanques de expansão.

TABELA 11. Distribuição das 20 propriedades leiteiras avaliadas, de acordo com a contagem de células somáticas (CCS) no leite de mistura (tanque de expansão), realizada pela técnica de citometria de fluxo. Botucatu-SP, 2011.

CCS (cél/mL x 10 ³)	n	%
< 200	5	25
200 a 400	6	30
401 a 750	6	30
751 a 1000	2	10
> 1000	1	5
Total	20	100

cél/mL: células por mililitro de leite; n: número de propriedades leiteiras; %: porcentagem.

TABELA 12. Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de microorganismos mesófilos e psicrotróficos por mL de amostras de leite, obtidas de tanques de expansão em 20 propriedades leiteiras localizadas no centro-oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.

Propriedades (identificação)	Classificação das propriedades*	Mesófilos (UFC/mL) Média	Psicrotróficos (UFC/mL) Média
2	A	1,0 x 10 ⁵	2,0 x 10 ⁵
5	A	4,9 x 10 ⁴	< 10 ³
6	A	1,6 x 10 ³	4,1 x 10 ³
9	A	4,7 x 10 ⁴	3,3 x 10 ¹
12	A	7,0 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁵
16	A	< 10 ³	< 10 ³
17	A	< 10 ³	< 10 ³
18	A	2,8 x 10 ⁶	< 10 ³
19	A	2,6 x 10 ⁴	< 10 ³
1	B	2,2 x 10 ⁵	1,1 x 10 ⁵
3	B	2,3 x 10 ⁵	5,0 x 10 ⁵
4	B	4,7 x 10 ⁴	< 10 ³
7	B	< 10 ³	< 10 ³
8	B	1,4 x 10 ⁵	0,8 x 10 ³
10	B	4,8 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁶
11	B	7,3 x 10 ⁴	< 10 ³
13	C	3,1 x 10 ⁶	4,4 x 10 ⁵
14	C	2,2 x 10 ⁵	7,0 x 10 ⁴
15	C	6,0 x 10 ⁴	3,3 x 10 ¹
20	C	1,3 x 10 ⁷	6,3 x 10 ²

Isolamento e contagem de UFC realizada em Petrifilm®.

Diluições das amostras: 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ para mesófilos e 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴ para psicrotróficos.

*Segundo condições gerais de higiene de ordenha.

5.5 CBT (tanques de expansão)

Na Tabela 12, estão apresentados os resultados de CBT das amostras de leite obtidas do tanque de expansão, das vinte propriedades leiteiras avaliadas. As distribuições das fazendas de acordo com a contagem de mesófilos e de psicrotróficos no leite de mistura estão apresentadas, respectivamente, nas tabelas 13 e 14.

TABELA 13. Distribuição das 20 propriedades leiteiras avaliadas de acordo com a contagem de mesófilos no leite de mistura (tanque de expansão), pela utilização do Petrifilm®. Botucatu-SP, 2011.

Mesófilos UFC/mL	n	%
$< 10^4$	4	20
10^4 a 10^5	7	35
10^5 a 10^6	4	20
10^6 a 10^7	4	20
$> 10^7$	1	5
Total	20	100

UFC/mL: unidades formadoras de colônias por mililitros; n: número de propriedades leiteiras; %: porcentagem.

TABELA 14. Distribuição das 20 propriedades leiteiras avaliadas de acordo com a contagem de psicrotróficos no leite de mistura (tanque de expansão), pela utilização do Petrifilm®. Botucatu, 2011.

Psicrotróficos UFC/mL	n	%
$< 10^4$	13	65
10^4 a 10^5	1	5
10^5 a 10^6	5	25
10^6 a 10^7	1	5
$> 10^7$	0	0
Total	20	100

UFC/mL: unidades formadoras de colônias por mililitros; n: número de propriedades leiteiras; %: porcentagem.

5.6 mPCR

Na Figura 17 estão apresentados os produtos da mPCR, visualizados em gel de agarose, pela técnica de eletroforese. Os produtos de mPCR obtidos pela análise dos DNAs extraídos das amostras de leite dos tanques de expansão estão apresentados na Figura 18.

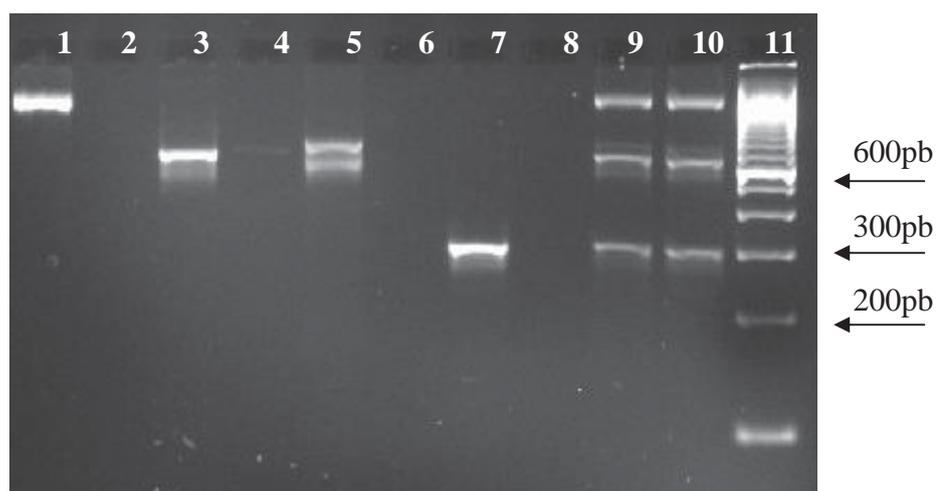


FIGURA 17. Produtos de mPCR obtidos a partir de cepas de referência. 1: *S. aureus* (1.300pb); 3: *E.coli* (660pb); 5: *E. coli* e *S. agalactiae* (590pb); 7: *S. agalactiae* (293pb); 2,4, 6 e 8: controles negativos; 9 e 10: *S. aureus*, *E. coli* e *S. agalactiae*; 11: padrão de peso molecular 100pb (Invitrogen). Botucatu-SP, 2011.

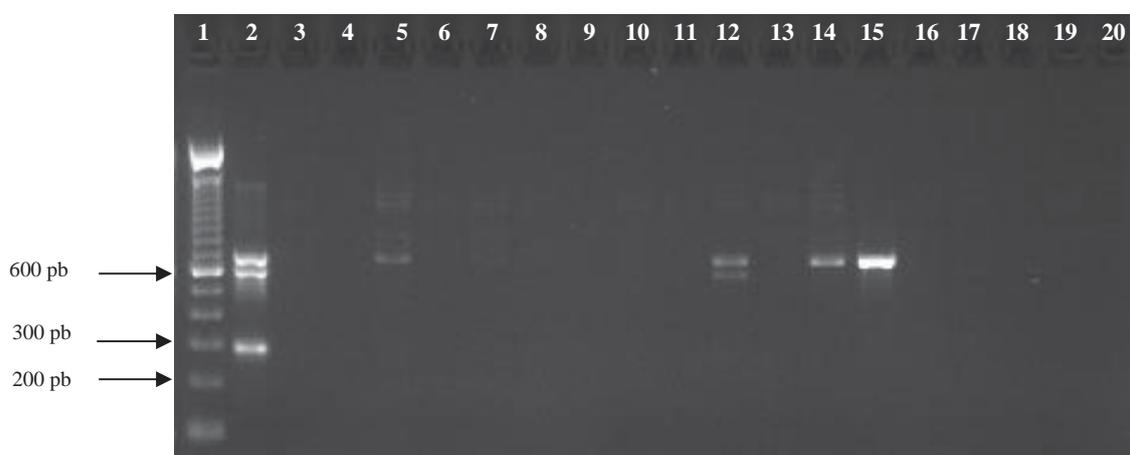


FIGURA 18. Produtos de mPCR obtidos a partir do DNA extraído de amostras de leite de tanques de expansão. 1: padrão de peso molecular 100pb (Invitrogen). 2: cepas de referência de *S. aureus* (1.300pb); *E. coli* (660pb) e *S. agalactiae* (590pb e 293pb) – controles positivos. 3: controle negativo. 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 16, 17, 18, 19, 20: amostras negativas. 5,12,14,15: amostras positivas para *E.coli*. 12: amostra positiva para *S. agalactiae*. Botucatu-SP, 2011.

Os resultados obtidos pela técnica de mPCR nas 20 amostras de leite de tanque de expansão avaliadas estão apresentados na Tabela 15.

TABELA 15. Resultados da mPCR para detecção do DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, em 20 amostras de leite de tanques de expansão, de propriedades localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Fazenda	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>E. coli</i>
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	+
4	-	-	-
5	-	+	+
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	+	+
11	-	-	-
12	-	-	+
13	-	-	+
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	-	-
17	-	-	-
18	-	-	+
19	-	-	+
20	-	-	-

+: positivo para detecção do DNA do agente.

-: negativo para detecção do DNA do agente.

Nas tabelas 16a e 16b estão apresentados os resultados do isolamento microbiológico e da mPCR a partir das 20 amostras de leite de tanques de expansão avaliadas.

TABELA 16a. Micro-organismos isolados das amostras de leite dos tanques de expansão (1 a 10) avaliados, e resultados da mPCR para pesquisa de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*. Botucatu-SP, 2011.

Propriedade	Micro-organismos isolados	mPCR para <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> e <i>E. coli</i>
1	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Negativo
2	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. <i>E. coli</i>	Negativo
3	<i>E. coli</i> <i>Pseudomonas</i> sp.	Positivo para <i>E. coli</i>
4	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	Negativo
5	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp.	Positivo para <i>E. coli</i> e <i>S. agalactiae</i>
6	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.	Negativo
7	<i>Candida</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp.	Negativo
8	<i>S. agalactiae</i> <i>Enterobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Negativo
9	<i>S. aureus</i> <i>Klebsiella</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.	Negativo
10	<i>S. aureus</i> <i>Streptococcus</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>Pseudomonas</i> sp.	Positivo para <i>E. coli</i> e <i>S. agalactiae</i>

TABELA 16b. Micro-organismos isolados das amostras de leite dos tanques de expansão (11 a 20) avaliados, e resultados da mPCR para pesquisa de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*. Botucatu-SP, 2011.

Propriedade	Micro-organismos isolados	mPCR para <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> e <i>E. coli</i>
11	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	Negativo
12	<i>Klebsiella</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. agalactiae</i>	Positivo para <i>E. coli</i>
13	<i>E. coli</i> <i>Klebsiella</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. <i>S. aureus</i>	Positivo para <i>E. coli</i>
14	<i>S. aureus</i> <i>Klebsiella</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp.	Negativo
15	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>Enterobacter</i> sp.	Negativo
16	<i>Nocardia</i> sp. <i>Candida</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp.	Negativo
17	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp. <i>Shigella</i> sp.	Negativo
18	<i>Streptococcus</i> sp. <i>E. coli</i>	Positivo para <i>E. coli</i>
19	<i>Streptococcus</i> sp. <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Positivo para <i>E. coli</i>
20	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	Negativo

TABELA 17. Ocorrência de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nas amostras de leite dos rebanhos e dos 20 tanques de expansão avaliados, e resultados da multiplex PCR para a detecção do DNA destes três patógenos. Botucatu-SP, 2011.

Propriedade	<i>S. aureus</i>			<i>S. agalactiae</i>			<i>E. coli</i>		
	MR (%)	MTQ	mPCR TQ	MR (%)	MTQ	mPCR TQ	MR (%)	MTQ	mPCR TQ
1	3,2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2,7	0	0	0	0	0	1,0	1***	0
3	4,5	0	0	3,6	0	0	1,2	1***	1
4	2,8	0	0	0,2	0	0	0	0	0
5	0,5	0	0	0,5	0	1	0	0	1
6	2,7	0	0	0	0	0	0	0	0
7	2,8	0	0	0	0	0	0	0	0
8	2,6	0	0	0,9	1***	0	0	0	0
9	3,1	1***	0	0	0	0	0	0	0
10	24,1	1***	0	0	0	1	2,8	1***	1
11	3,8	0	0	0	0	0	0,4	0	0
12	3,3	0	0	0,3	1**	0	3,3	1***	1
13	3,3	1***	0	0,3	0	0	0	1***	1
14	21,0	1**	0	0	0	0	0	0	0
15	22,5	1**	0	0	0	0	0	1***	0
16	0,6	0	0	0	0	0	0,3	0	0
17	4,6	0	0	0	0	0	2,0	0	0
18	0	0	0	3,7	0	0	0,2	1***	1
19	2,2	1**	0	0,5	0	0	0,5	1*	1
20	4,4	0	0	2,6	0	0	0	0	0

MR= cultivo micrológico amostras de leite do rebanho (prevalência em %)

MTQ= cultivo microbiológico de amostra de leite do tanque de expansão [0: negativo, 1*: isolamento de reduzido número de colônias (1-10 UFC/mL), 1**: isolamento de moderado número de colônias (11-20 UFC/mL), 1*** crescimento de grande número de colônias (>21 UFC/mL)]

mPCR TQ= multiplex PCR de amostra de leite do tanque de expansão (0: negativo, 1: positivo)

TABELA 18. Resultados de cultivo microbiológico e de mPCR para *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nas 20 amostras de leite de tanques de expansão avaliadas. Botucatu-SP, 2011.

Propriedade	<i>S. aureus</i>		<i>S. agalactiae</i>		<i>E. coli</i>	
	Cultivo	mPCR	Cultivo	mPCR	Cultivo	mPCR
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	1	0
3	0	0	0	0	1	1
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	1	0	1
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	1	0	0	0
9	1	0	0	0	0	0
10	1	0	0	1	1	1
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	1**	0	1	1
13	1	0	0	0	1	1
14	1**	0	0	0	0	0
15	1**	0	0	0	1	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	1	1
19	1**	0	0	0	1*	1
20	0	0	0	0	0	0

0: negativo

1: positivo

*número reduzido de colônias isoladas (1-10 UFC/mL)

**número moderado de colônias isoladas (10-20 UFC/mL)

TABELA 19. Ocorrência de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nas 20 amostras de leite de tanques de expansão avaliadas, pelos métodos de cultivo microbiológico e multiplex PCR (mPCR). Botucatu-SP, 2011.

Micro-organismo	Cultivo microbiológico		mPCR	
	Positivos	Ocorrência (%)	Positivos	Ocorrência (%)
<i>S. aureus</i>	6/20	30	0	0
<i>S. agalactiae</i>	2/20	10	2/20	10
<i>E. coli</i>	8/20	40	7/20	35

TABELA 20. Resultados da mPCR frente ao cultivo microbiológico, para a detecção de *S. aureus* em 20 amostras de leite de tanques de expansão, de propriedades localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.

		Cultivo microbiológico <i>S. aureus</i>	
		Positivo	Negativo
mPCR	Positivo	0	0
<i>S. aureus</i>	Negativo	6	14

p McNemar = 0,0313

Sens: 0; Esp: 100 %; VPP: 0; VPN: 70%; Prevalência: 30%; Acurácia: 70%; RVP:0; RVN: 1.

TABELA 21. Resultados da mPCR frente ao cultivo microbiológico, para a detecção de *S. agalactiae* em 20 amostras de leite de tanques de expansão, de propriedades localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.

		Cultivo microbiológico <i>S. agalactiae</i>	
		Positivo	Negativo
<i>S. agalactiae</i>	mPCR Positivo	0	2
	mPCR Negativo	2	16

p McNemar = 1,00

Kappa= -0,1111

$p=0,3096$

Sens: 0; Esp: 88%; VPP: 0; VPN: 88%; Prevalência: 10%; Acurácia: 80%; RVP: 0; RVN: 1,13.

TABELA 22. Resultados da mPCR frente ao cultivo microbiológico, para a detecção de *E. coli* em 20 amostras de leite de tanques de expansão, de propriedades localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.

		Cultivo microbiológico <i>E. coli</i>	
		Positivo	Negativo
<i>E. coli</i>	mPCR Positivo	6	1
	mPCR Negativo	2	11

p McNemar = 1,00

Kappa= 0,6809

$p=0,0011$

Sens: 75%; Esp: 91,7%; VPP: 85,7%; VPN: 84,6%; Prevalência: 40%; Acurácia: 85%; RVP: 9,0
RVN: 0,273.

TABELA 23. Resultados da mPCR frente ao cultivo microbiológico, para a detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* em 20 amostras de leite de tanques de expansão, de propriedades localizadas no centro oeste do Estado de São Paulo. Botucatu-SP, 2011.

		Cultivo microbiológico	
		Positivo	Negativo
mPCR	Positivo	6	3
<i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>E. coli</i>	Negativo	10	41

p McNemar = 0,0923

Kappa= 0,3564

p = 0,0016)

Sens: 37,5%; Esp: 93,2%; VPP: 66,7%; VPN: 80,4%; Prevalência: 26,7%; Acurácia: 78,3%; RVP: 5,5; RVN:0,67.

5.7 Limiares de detecção

5.7.1 PCR individual para *S. aureus* (iniciadores SAU1 e SAU2)

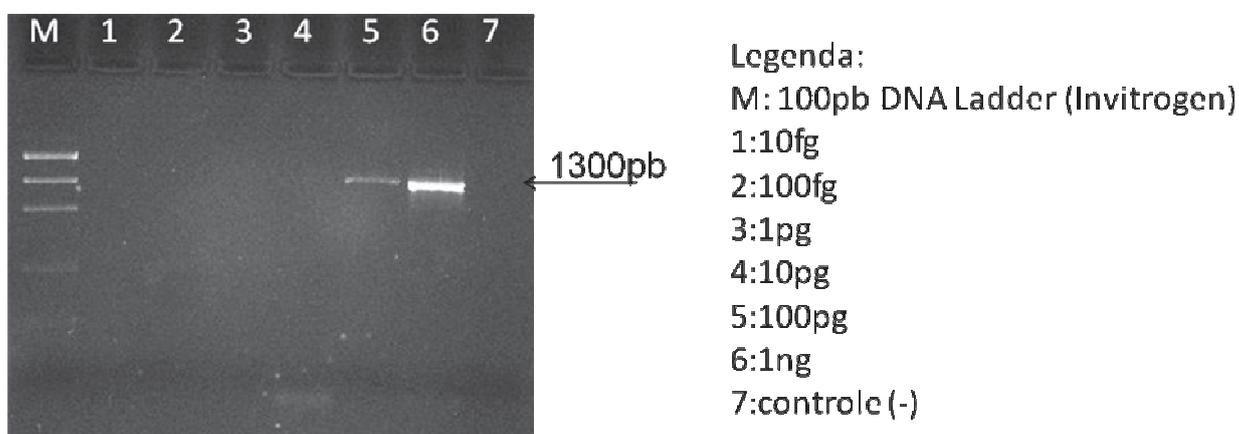


FIGURA 19. Produtos de PCR obtidos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *S. aureus*, utilizando os iniciadores SAU1 e SAU2 e a cepa de referência do micro-organismo (ATCC 25923), nas concentrações de 10fg; 100fg; 1pg; 10pg; 100pg e 1ng. Controle negativo: água MiliQ. Botucatu-SP, 2011.

5.7.2 PCR individual para *S. agalactiae* (iniciadores SAGA1 e SAGA2)

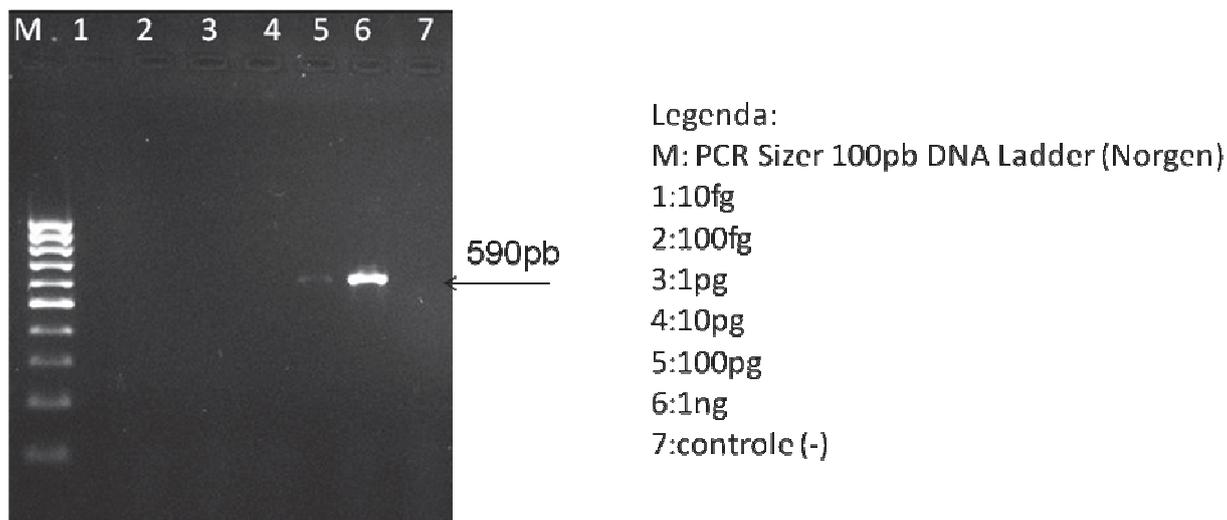


FIGURA 20. Produtos de PCR obtidos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *S. agalactiae*, utilizando os iniciadores SAGA1 e SAGA2 e a cepa de referência do micro-organismo (ATCC 13813), nas concentrações de 10fg; 100fg; 1pg; 10pg; 100pg e 1ng. Controle negativo: água MiliQ. Botucatu-SP, 2011.

5.7.3 PCR individual para *S. agalactiae* (iniciadores SIP3 e SIP4)

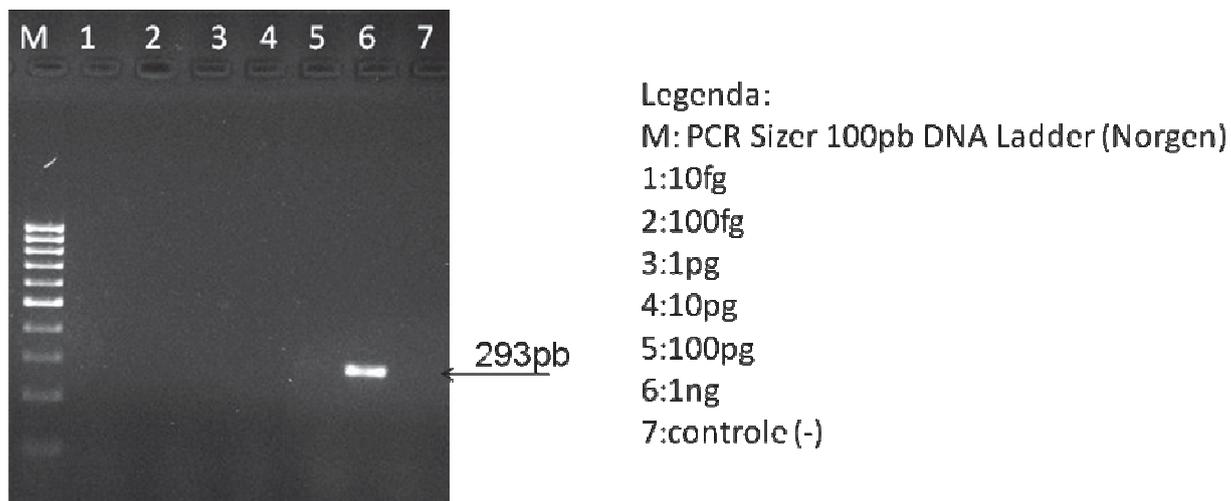


FIGURA 21. Produtos de PCR obtidos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *S. agalactiae*, utilizando os iniciadores SIP3 e SIP4 e a cepa de referência do micro-organismo (ATCC 13813), nas concentrações de 10fg; 100fg; 1pg; 10pg; 100pg e 1ng. Controle negativo: água MiliQ. Botucatu-SP, 2011.

5.7.4 PCR individual para *E. coli* (iniciadores Ecoli1 e Ecoli2)

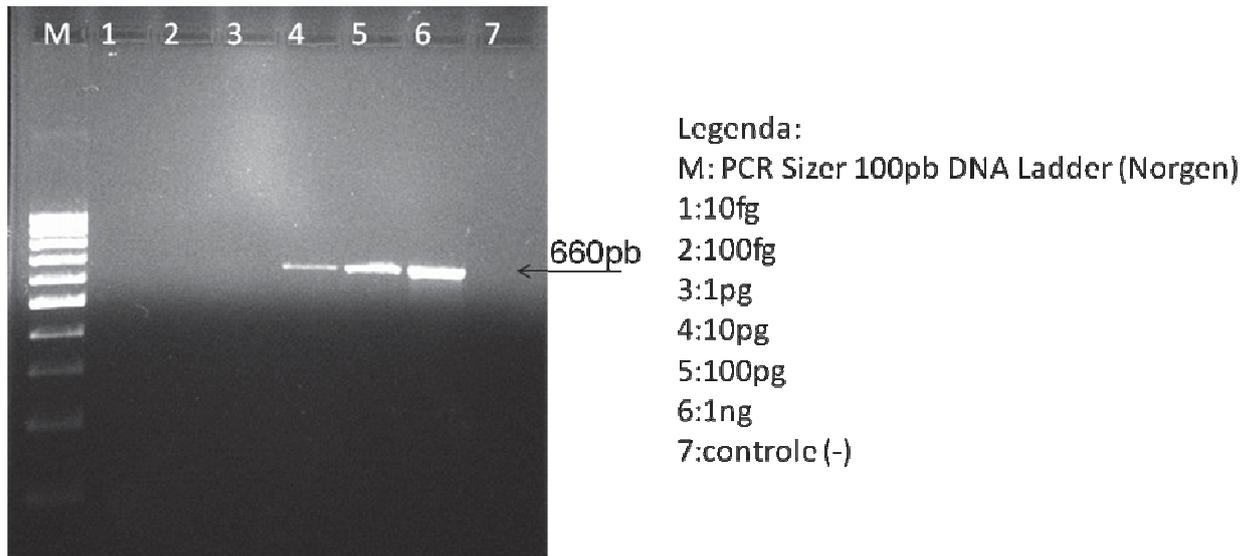
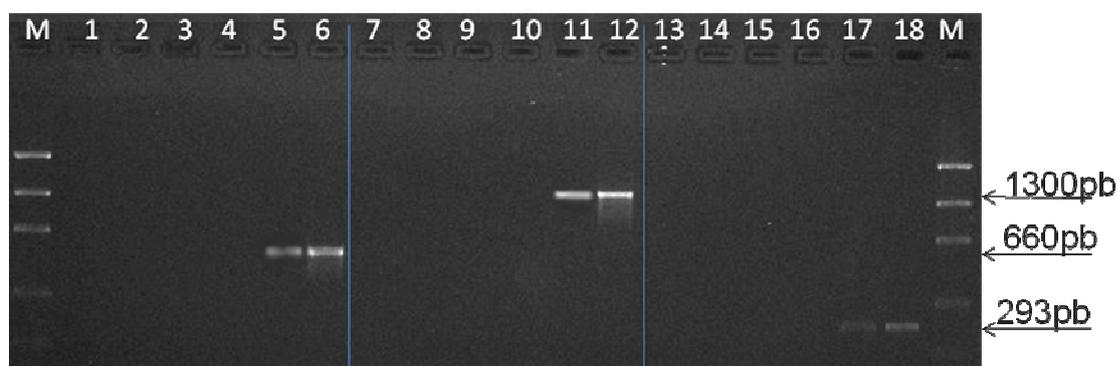


FIGURA 22. Produtos de PCR obtidos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *E. coli*, utilizando os iniciadores Ecoli1 e Ecoli2 e a cepa de referência do micro-organismo (ATCC 11229), nas concentrações de 10fg; 100fg; 1pg; 10pg; 100pg e 1ng. Controle negativo: água MiliQ. Botucatu-SP, 2011.

5.7.5 mPCR para *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* - com DNAs das ATCC separadas (iniciadores SAU1 e SAU2; Ecoli1 e Ecoli2; SIP3 e SIP4)

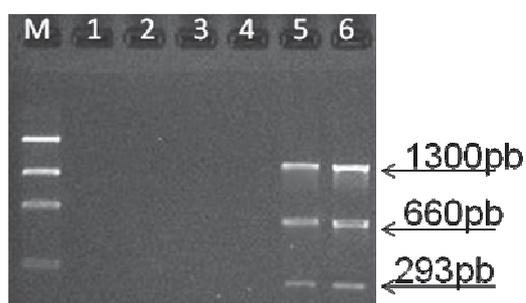


Legenda:

M: 100pb DNA Ladder (Invitrogen)	7: 10fg <i>S.aureus</i>	13: 10fg <i>S.agalactiae</i>
1: 10fg <i>E.coli</i>	8: 100fg <i>S.aureus</i>	14: 100fg <i>S. agalactiae</i>
2: 100fg <i>E.coli</i>	9: 1pg <i>S.aureus</i>	15: 1pg <i>S. agalactiae</i>
3: 1pg <i>E.coli</i>	10: 10pg <i>S.aureus</i>	16: 10pg <i>S. agalactiae</i>
4: 10pg <i>E.coli</i>	11: 100pg <i>S.aureus</i>	17: 100pg <i>S. agalactiae</i>
5: 100pg <i>E.coli</i>	12: 1ng <i>S.aureus</i>	18: 1ng <i>S. agalactiae</i>
6: 1ng <i>E.coli</i>		

FIGURA 23. Produtos de mPCR obtidos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* utilizando os iniciadores SAU1 e SAU2, SIP3 e SIP4 e Ecoli1 e Ecoli2, e as cepas de referência dos micro-organismos (ATCCs 25923, 13813 e 11229), individualmente, nas concentrações de 10fg; 100fg; 1pg; 10pg; 100pg e 1ng. Controle negativo: água MiliQ. Botucatu-SP, 2011.

5.7.6 mPCR para *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* - com DNAs das ATCC juntas (iniciadores SAU1 e SAU2; Ecoli1 e Ecoli2; SIP3 e SIP4)



Legenda:

M: 100pb DNA Ladder (Invitrogen)

1: 10fg *E.coli* + *S.aureus* + *S. agalactiae*

2: 100fg *E.coli* + *S.aureus* + *S. agalactiae*

3: 1pg *E.coli* + *S.aureus* + *S. agalactiae*

4: 10pg *E.coli* + *S.aureus* + *S. agalactiae*

5: 100pg *E.coli* + *S.aureus* + *S. agalactiae*

6: 1ng *E.coli* + *S.aureus* + *S. agalactiae*

FIGURA 24. Produtos de mPCR obtidos para avaliação do limiar de detecção do DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* utilizando os iniciadores SAU1 e SAU2, SIP3 e SIP4 e Ecoli1 e Ecoli2, e as cepas de referência dos microorganismos (ATCCs 25923, 13813 e 11229), em conjunto, nas concentrações de 10fg; 100fg; 1pg; 10pg; 100pg e 1ng. Controle negativo: água MiliQ. Botucatu-SP, 2011.

TABELA 24. Limiares de detecção dos produtos das PCRs individuais e da mPCR para a pesquisa do DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, utilizando os iniciadores SAU1 e SAU2, SIP3 e SIP4 e Ecoli1 e Ecoli2, a partir do material genético extraído de cepas de referência. Botucatu-SP, 2011.

	SAU1 e SAU2	SAGA1 e SAGA2	SIP3 e SIP4	Ecoli1 e Ecoli2
PCR individual	100pg	100pg	1ng	10pg
mPCR*	100pg	NA	100pg	100pg
mPCR**	100pg	NA	100pg	100pg

*cepas de referência separadas

**cepas de referência juntas

NA: não utilizados, devido aos produtos de mPCR para *S. agalactiae*, utilizando os iniciadores SAGA1 e SAGA2, apresentarem 590pb, muito semelhantes aos produtos para *E. coli* (660pb), o que poderia dificultar a identificação à eletroforese.

pg: picograma

ng: nanograma

5.8 Especificidade da mPCR

Após a realização de cinco repetições do ensaio de especificidade da mPCR, utilizando cepas de referência de *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* e *P. aeruginosa*, verificou-se que não houve amplificação de DNA destes micro-organismos não-alvos, comprovando a especificidade para detecção de material genético de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, por esta técnica.

5.9 Reprodutibilidade da mPCR

Verificou-se que, após a realização de cinco repetições da técnica de mPCR para amostras de leite aleatórias, os resultados foram idênticos, comprovando a reprodutibilidade do método.



*D*ISSCUSSÃO

6 – DISCUSSÃO

6.1 Avaliação do manejo de ordenha e dos dados colhidos por meio dos questionários epidemiológicos

Segundo os dados apresentados nas Tabelas 3a e 3b, verifica-se que houve envolvimento, de propriedades leiteiras das mais variadas características, tanto estruturais, quanto de manejo. Foram avaliadas propriedades com 19 a 970 animais em lactação e, embora todas contassem com sistema de ordenha mecânico e tanque de expansão próprio, as mesmas apresentavam diferentes sistemas de ordenha e distintos níveis de tecnificação. Foi observado que nem todas as propriedades com elevados volumes de produção de leite apresentaram classificação A (satisfatória) ou B (regular), notadamente quanto à higiene e estrutura de ordenha (Tabela 1), a exemplo da propriedade número 15, que produz 900 litros diários, classificada como C (insatisfatória). Em contraste, a propriedade número 10, com produção de 295 litros/dia, foi classificada como B.

Foi verificado que as quatro propriedades (números 13, 14, 15 e 20) classificadas como C (insatisfatórias) apresentavam sistema de ordenha do tipo “balde ao pé”, com consideráveis falhas de manejo, a saber: não realização da lavagem dos tetos antes da ordenha, limpeza direta dos tetos com jornal ou pano, não realização de pré e pós-*dipping*, não realização das provas de Tamis e CMT, ausência de critério para tratamento de mastite clínica, não realização de terapia/profilaxia da vaca seca, ausência de controle dos dados dos animais, más condições de higiene na ordenha, mão-de-obra não qualificada e estrutura física insatisfatória da sala de ordenha. Vale ressaltar que estas quatro propriedades não eram acompanhadas por profissional Médico Veterinário, o que reforça a importância da assistência técnica para a melhoria da qualidade do leite (LANGONI, 2000).

Em 45% das propriedades avaliadas foram encontradas condições satisfatórias de ordenha (Tabela 4a). Estes dados corroboram os de Fagundes (2007), que avaliou 42 propriedades leiteiras, em duas regiões do Estado de São Paulo, e verificou que 33,3% e 19,1% delas apresentavam adequado manejo higiênico-sanitário de ordenha, respectivamente, na região 1 (São Carlos) e na região 2 (Ribeirão Preto). Por outro lado, em ambas regiões

avaliadas, 47,6% das propriedades apresentavam condições insatisfatórias de ordenha, diferindo dos resultados obtidos no presente estudo, onde 20% e 35% das propriedades apresentavam manejo deficitário e regular, respectivamente.

O sistema de ordenha canalizado mostrou-se predominante nas 20 propriedades avaliadas no presente estudo, o que pode estar relacionado à média de produção de leite/animal, que foi de 18,3 litros/dia. Constatou-se que, para a região avaliada, o sistema balde ao pé é utilizado em propriedades com menor volume de produção, embora uma delas apresentasse produção diária de 900 litros de leite. Estes resultados diferem dos obtidos por Fagundes (2007), que verificaram 57% e 67% de sistema canalizado, e 43% e 33% de sistema balde ao pé, respectivamente, nas regiões 1 e 2 avaliadas, que apresentaram média de produção de 1.000 L de leite/dia.

Em 55% das propriedades avaliadas no presente estudo a lavagem dos tetos é realizada antes da ordenha. Constatou-se que onde se adota esta prática, não se procede a lavagem total do animal, nem do úbere, e sim somente dos tetos, de maneira a evitar a contaminação do leite e dos equipamentos de ordenha, especialmente por micro-organismos ambientais. Já a secagem dos tetos é uma conduta bastante freqüente nas propriedades, com a utilização de papel toalha em 75% dos casos, demonstrando que o hábito de utilização de jornal, pano ou outros tecidos, está sendo descontinuado.

A realização de pré e pós-*dipping* ocorreu em 80% das propriedades avaliadas. Foi constatado durante as visitas às propriedades que os produtores utilizam antissépticos em concentrações adequadas, demonstrando correto manejo preventivo de mastite ambiental e contagiosa. A utilização de produtos à base de cloro no pré-*dipping* e de iodo no pós-*dipping* é prática comum entre os produtores, embora em uma das propriedades o ácido láctico tem sido utilizado no pré-*dipping*, com redução dos casos de mastite no rebanho e menores níveis de CCS no leite de mistura.

Ainda com relação ao manejo pré-ordenha, embora a prova de Tamis seja realizada em 80% das propriedades, verificou-se que o CMT não é realizado em 70% delas, indicando que os produtores não realizam rotineiramente o diagnóstico de mastite subclínica nos rebanhos. Além disso, a escolha do tratamento de mastite clínica é realizada com base na experiência profissional ou no apelo comercial de certos anti-mastíticos, não fundamentada

em isolamento microbiológico/antibiograma, em 85% das propriedades estudadas. Mesmo considerando que há acompanhamento veterinário em 16 das 20 propriedades avaliadas, em somente três propriedades assistidas pelo profissional o tratamento dos casos de mastite clínica é fundamentado em cultivo e antibiograma. Este aspecto é preocupante, uma vez que durante as visitas às propriedades, muitos produtores relataram insucesso no tratamento das vacas com mastite clínica, que acabavam por apresentar cronicidade do quadro e/ou perda permanente da função do(s) quarto(s) acometido(s).

Foi constatado que 95% dos produtores relataram realizar o procedimento de desinfecção das teteiras após a ordenha. No entanto, verificou-se que em algumas propriedades este processo não é realizado corretamente, podendo comprometer inclusive a qualidade do leite, por contaminação microbiológica. Como exemplo, cita-se a imersão dos conjuntos de ordenha em baldes contendo solução de cloro diluído em água, em proporções incorretas, a qual é mantida sem troca até o final da ordenha, como exemplificado na Figura 12. O procedimento incorreto de desinfecção é tão prejudicial quanto a não realização do mesmo. Em estudo realizado por Amaral et al. (2004), a desinfecção das teteiras com hipoclorito de sódio durante a ordenha não foi eficiente como método preventivo de redução de ação das teteiras como vias de transmissão de micro-organismos para o úbere e para o leite. Os autores constataram que a prática de desinfecção das teteiras não reduziu significativamente o número de coliformes e de *Staphylococcus* spp., destacando que, em algumas teteiras, após o uso do desinfetante, ocorreu aumento do número de micro-organismos isolados.

Quanto ao manejo pós-ordenha, a maioria dos produtores (75%) reconhece que as vacas devem ser alimentadas, para que permaneçam em estação, de maneira a evitar a ocorrência de mastite ambiental e, por isso, praticam este manejo. Além disso, em 75% das propriedades a conduta de terapia/profilaxia da vaca seca é realizada, segundo informado pelos produtores. Outro dado importante é que em 80% das propriedades existe acompanhamento de profissional veterinário e registro dos dados dos animais, demonstrando novamente a marcante orientação técnica da produção.

Embora 100% dos produtores tenham relatado que realizam limpeza diária da sala de ordenha, constatou-se que em 30% delas a higiene estava

regular e em 15% insatisfatória, assim como em 25% das propriedades a sala de ordenha apresentava estrutura regular e em 10% insatisfatória. Ressalta-se que as condições físicas (estruturais) da sala de ordenha são fatores que podem contribuir ou prejudicar sua adequada higienização. Como exemplos, citam-se rachaduras nos pisos e/ou revestimentos; ressecamento e fissuras nas tubulações dos equipamentos de ordenha, entre outros, que podem acumular sujidades de difícil remoção (RADOSTITS et al., 2007).

As 20 propriedades avaliadas apresentaram mediana de mais de 1.500 litros de leite produzidos por dia, com mediana de 92 animais em lactação, produzindo aproximadamente 18,3 litros de leite/dia. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Fagundes (2007), que verificaram média de produção de 15,6 L/animal/dia, em 42 propriedades avaliadas no Estado de São Paulo. No entanto, estas médias apresentam-se consideravelmente acima daquela estimada para o Estado, que é de 5,1 L/animal/dia, totalizando aproximadamente 1,5 milhões de litros no ano de 2010, caracterizando sexto lugar no *ranking* nacional de produção, atrás de MG, RS, PR, GO e SC. (EMBRAPA, 2011). Esta disparidade pode encontrar justificativa no critério de inclusão do presente estudo, que previa a necessidade de ordenha mecânica e tanque de expansão individual, geralmente presente em propriedades tecnificadas e de maior produção.

6.2 Ocorrência de mastites clínica e subclínica nos rebanhos avaliados, e isolamentos microbianos nas amostras de leite individuais e compostas

A ocorrência de mastite subclínica nos rebanhos estudados foi de 28,3%. Este achado foi inferior aos relatados na literatura, que atingem valores acima de 38,7% (CUNHA et al., 2008). No entanto, o CMT realizado durante as visitas às propriedades, permitiu a identificação de 13,6% casos de mastite subclínica classificadas como três cruces, contra 7,2% uma cruz e 7,4% duas cruces. Estes resultados são preocupantes tendo em vista que em somente seis das 20 propriedades envolvidas no estudo o CMT era realizado como teste de rotina diário para o monitoramento de mastite subclínica.

S. aureus foi o agente predominante nas amostras de leite cultivadas, em relação aos demais micro-organismos-alvos, tendo sido isolado em

praticamente todos os rebanhos (à exceção de um), com freqüência de 3,7%. Os demais micro-organismos-alvos da pesquisa, *S. agalactiae* e *E. coli* apresentaram menores freqüências de isolamento (0,5% e 0,6%, respectivamente). *Corynebacterium* sp. foi o micro-organismo mais freqüentemente isolado nos rebanhos (7,2%), seguido de estafilococos e estreptococos não hemolíticos.

Estudos indicam que, em rebanhos controlados, onde a freqüência de mastites é baixa, especialmente por *S. aureus*, o isolamento de *Corynebacterium* sp. é significativo. Alguns autores chegaram a considerar este agente como micro-organismo comensal da glândula mamária. Apesar disso, como apresentado na Tabela 8, não há relação entre a maior freqüência de isolamento de *Corynebacterium* sp. nos rebanhos, com os resultados de isolamento nas amostras de leite dos tanques de expansão, na medida em que este micro-organismo foi isolado em somente uma das 20 amostras de leite de mistura avaliadas. Este fato pode ser explicado pela possível inibição da multiplicação de *Corynebacterium* sp., pela presença de outros microrganismos, especialmente enterobactérias, que apresentam multiplicação rápida e abundante, competindo pelos nutrientes do meio de cultura (QUINN et al., 2005).

Ressalta-se o isolamento abundante de micro-organismos não-alvos nas amostras de leite dos tanques de expansão avaliados (Tabela 9), como outras espécies de enterobactérias, *Pseudomonas* sp., etc., embora estes micro-organismos tenham sido isolados com reduzida freqüência nos rebanhos (1,0%). Estes resultados indicam possível contaminação da tubulação do sistema de ordenha e/ou do tanque de expansão por estes agentes, ou ainda utilização de água contaminada na higienização dos equipamentos (SANTOS e FONSECA, 2007).

Os estreptococos e estafilococos não-hemolíticos, semelhante ao que ocorreu nos rebanhos, foram isolados com maior freqüência nas amostras de leite dos tanques de expansão, reforçando a importância destes patógenos bacterianos causadores de mastite contagiosa, que determinam prejuízos à qualidade final do leite de mistura (SOUZA et al., 2008).

6.3 CCS e CBT

O resultado médio de CCS nas amostras de leite dos 20 tanques de expansão avaliados foi de 442.400 células/mL, com mediana de 395.500 células/mL, valores bastante satisfatórios e muito próximos ao limite permitido pela IN no. 51 do MAPA. Apesar de quatro propriedades terem sido classificadas como C (insatisfatórias), com relação às condições de manejo e higiene de ordenha, os valores de CCS das amostras de leite dos tanques de expansão, nestas propriedades, variaram de 11 mil a 400 mil células/mL. Estes resultados são inesperados, uma vez que em propriedades com manejo insatisfatório, o leite de mistura apresenta CCS acima de 800 mil células/mL, como verificado por Fagundes (2007).

A maioria das amostras de leite dos tanques de expansão avaliadas – 17/20 (85%) – apresentou CCS até 750.000 células/mL (Tabela 11). Se for considerada a mediana, que foi de 395.000 células/mL (Tabela 10) verifica-se que a maior parte destas propriedades já estaria atendendo ao limite máximo de 400.000 células/mL para leite de mistura, em vigor desde 01/07/2011, determinado pela IN 51 do MAPA (BRASIL, 2002). Por outro lado, quando se considera o valor máximo vigente durante a realização do estudo, ou seja, de 750.000 células/mL, constata-se que três das 20 propriedades avaliadas (15%) ainda estariam em desacordo com a legislação.

O limite máximo permitido para mesófilos no leite de mistura, de acordo com a IN 51 (BRASIL, 2002), é da ordem de 10^5 UFC/mL. Nove das 20 propriedades avaliadas (45%) apresentaram resultados insatisfatórios quanto à contagem de mesófilos (Tabela 13). Ressalta-se ainda que, apesar de não haver limite de contagem de psicotróficos, pela legislação vigente, considerando como 10^5 o limite para contagem destes micro-organismos, seis fazendas avaliadas (33,3%) também apresentariam resultados insatisfatórios (Tabela 14). Os micro-organismos psicotróficos, por apresentarem multiplicação mesmo em temperaturas de refrigeração, geralmente entre 4-8°C, são especialmente importantes no caso de leite de mistura, uma vez que permanecem viáveis e determinam prejuízos à qualidade do leite, com conseqüente redução do rendimento industrial (SANTOS e FONSECA, 2007).

6.4 mPCR

A ausência de resultados positivos para *S. aureus* pela técnica de mPCR (Tabela 15) reforça a questão amplamente divulgada na literatura de que a sensibilidade e especificidade de métodos moleculares para a detecção de agentes bacterianos em amostras de leite estão estreitamente relacionadas, tanto às características dos micro-organismos – como complexidade de parede celular, que podem dificultar a lise durante o processo de extração do DNA (CREMONESI et al., 2006) – como também aos tipos de iniciadores utilizados.

Em estudo realizado por Carneiro (2009), foram avaliadas 100 amostras de leite de tanques de expansão de 50 propriedades no Oeste de Santa Catarina, pela técnica de PCR utilizando os iniciadores Sa442- 1 e Sa442-2, para a detecção de *S. aureus*. A técnica não apresentou limiares de sensibilidade (53,8%) e especificidade (36,5%) que justifiquem sua utilização como método de detecção do agente em amostras de leite de tanque, quando comparado ao cultivo microbiológico em Baird-Parker (técnica de referência), que identificou 42% de amostras positivas para a presença do micro-organismo.

A grande variedade de espécies isoladas nas amostras de leite de mistura (Tabelas 16a e 16b), especialmente de enterobactérias, também pode ter interferido na detecção de *S. aureus* pela técnica molecular. Verificou-se ainda que não houve relação entre as frequências de isolamento de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nas amostras de leite individuais (quartos mamários) com o isolamento destas mesmas espécies nas amostras de leite dos respectivos tanques de expansão, sequer com a detecção do DNA destes patógenos pela mPCR. Estes dados reforçam que a maior concentração de micro-organismos alvo nas amostras individuais não necessariamente implica em melhor detecção dos agentes no leite de mistura, tanto pela técnica de cultivo convencional, quanto por técnicas moleculares. Com efeito, as análises de amostras do leite de mistura constituem métodos diagnósticos complementares ao monitoramento da mastite nos rebanhos, bem como da qualidade do leite, não devendo substituir as análises de amostras individuais obtidas dos quartos mamários.

Melhores resultados de sensibilidade para a detecção de *S. aureus* a partir de amostras de leite são verificados quando se realiza a PCR simplex

(convencional). Ymagishi et al. (2007) avaliaram 106 amostras de leite colhidas de quartos individuais e do tanque de expansão em um rebanho leiteiro no Japão. *S. aureus* foi detectado em nove amostras pela PCR convencional e somente em três amostras pelo cultivo microbiológico, com limiar de detecção de 1 UFC/mL de leite. Em outro estudo, realizado por Faccioli (2010), foram avaliadas 104 amostras de leite, obtidas de tanques de expansão, pela técnica de PCR para a pesquisa do agente. A técnica apresentou sensibilidade de 99%, com moderada concordância com o cultivo microbiológico, nas amostras positivas, uma vez que o segundo deixou de detectar *S. aureus* em 176 (56,41%) amostras que a PCR detectou. Há que se considerar que cerca de 50% das amostras de leite bovino cultivadas resultam negativas, e que de 10 a 30% dos animais infectados por patógenos bacterianos de mastite apresentam quadro autolimitante (SANTOS e FONSECA, 2007). Sendo assim, apesar dos micro-organismos não estarem viáveis, seu material genético pode ser detectado pela PCR, mesmo com resultado negativo ao cultivo.

Ainda com relação à detecção de *S. aureus*, vale ressaltar que a lisostafina, uma peptidase produzida por *S. simulans* que cliva uma ligação glicina-glicina de ponte cruzada interpeptídica da parede celular de *S. aureus*, tem sido utilizada em protocolos de extração para facilitar a exposição do DNA do agente, possibilitando sua melhor detecção por diversos métodos de PCR (ZOCHE et al., 2010). No presente estudo, foi utilizado kit comercial para extração do DNA que, apesar de ser específico para liberação do material genômico de bactérias, tanto Gram negativas quanto positivas de amostras de leite, não apresentava lisostafina em sua composição, o que pode ter prejudicado o rendimento final de DNA de *S. aureus*.

Em contraste, quando se compara as ocorrências de *S. agalactiae* e de *E. coli*, pelo cultivo microbiológico e pela mPCR, verifica-se valores muito semelhantes (Tabela 19). No caso de *S. agalactiae*, a mPCR apresentou elevados valores de especificidade (88%) e acurácia (80%) (Tabela 21). O mesmo ocorreu para *E. coli*, e a técnica molecular apresentou sensibilidade de 75%, especificidade de 91,7% e acurácia de 85% (Tabela 22), além de boa concordância com o cultivo microbiológico. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por Moussa et al. (2010), que padronizaram um protocolo de mPCR para detecção e caracterização de cepas de *E. coli* shiga

toxigênicas (ECST) em amostras de leite e fezes de um rebanho bovino leiteiro na Arábia Saudita. A técnica de mPCR sorogrupo-específica detectou o DNA de *E.coli* em todas as amostras que também resultaram positivas ao cultivo bacteriológico. Ademais, quatro cepas (7,98%) O157:H7 e três cepas (5,36%) O111 de amostras de fezes de animais com diarreia, bem como duas amostras (8,33%) O111 de animais assintomáticos, que haviam sido negativas pelo cultivo microbiológico, resultaram positivas pela mPCR. De maneira semelhante, uma amostra negativa ao cultivo foi positiva pela mPCR, no presente estudo, comprovando a boa sensibilidade da técnica molecular para a detecção de *E. coli*.

Apesar da acurácia de 78,3% da técnica de mPCR em relação ao cultivo microbiológico, para a detecção simultânea de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* (Tabela 23), a sensibilidade do método molecular foi baixa (37,5%). Estes resultados são discordantes dos verificados por Phuektes et al. (2001), que utilizaram a mPCR para detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis* em 117 amostras de leite de vacas com mastite subclínica. A mPCR foi significativamente mais sensível que o cultivo microbiológico na detecção de *S. aureus* e *S. uberis*, apresentando limiares de detecção, para cada micro-organismo, de 10^4 UFC/mL e 10^3 UFC/mL, respectivamente. No entanto, não houve diferenças significativas entre a mPCR e o cultivo para a detecção de *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae*.

A especificidade obtida pela mPCR, no presente estudo, foi de 93,2%, considerada muito boa, comparável aos valores obtidos em outros estudos, variando de 96,3% a 100% (GILLESPIE e OLIVER, 2005; MAXWELL et al., 2008; SILVENNOINEN et al., 2010). As características de baixa sensibilidade e elevada especificidade analítica apresentadas pela mPCR indicam que esta técnica diagnóstica deva ser utilizada como método confirmatório, em complementação às técnicas de rotina (triagem).

Verifica-se que não houve diferença entre os limiares de detecção da PCR individual e da mPCR para a detecção do DNA de *S. aureus* (Tabela 24). Estes resultados corroboram os de Riffon et al. (2001), que utilizaram a técnica de mPCR para detecção de *S. aureus* e de mais cinco patógenos bacterianos de mastites, em amostras de leite de quartos mamários. O limiar de detecção foi de 5×10^3 UFC/mL para todos os micro-organismos, tanto pela mPCR,

quanto pela PCR individual. Em outro estudo, Cremonesi et al. (2005) analisaram 93 amostras de leite para detecção de *S. aureus* e de 10 genes codificadores de toxinas estafilocócicas. O limiar de detecção, tanto pela PCR individual, quanto pela mPCR, foi de 10 UFC/mL.

Para *S. agalactiae*, a mPCR apresentou melhor limiar de detecção do que a PCR individual. Este resultado é discordante daqueles verificados na literatura (PHUEKTES et al., 2001; RAMESH et al., 2002; SILVA et al., 2008). Já no caso de *E. coli*, a PCR individual foi superior à mPCR.

No presente estudo, não houve diferença nos limiares de detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* quando se realizou a mPCR com os DNAs extraídos das cepas de referência, analisadas em conjunto ou separadamente. Este dado é importante, pois comprova que não houve interferência de um agente em relação ao outro, mesmo considerando que nas amostras de leite colhidas, as concentrações dos patógenos eram distintas.

Após a realização de cinco repetições do ensaio de especificidade da mPCR, utilizando cepas de referência de *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* e *P. aeruginosa*, verificou-se que não houve amplificação de DNA destes micro-organismos não-alvos, comprovando a especificidade para detecção de material genético de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, por esta técnica. Estes resultados são similares aos obtidos por Riffon et al. (2001), que utilizaram a técnica de mPCR para a detecção de *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* e *S. uberis* em amostras de leite inoculadas com cepas padrão de cada micro-organismo, isoladas de casos de mastite, utilizando sete pares de iniciadores espécie-específicos. Neste estudo, não houve amplificações de DNAs não-alvos, como o de *P. aeruginosa*, que foram testados frente aos iniciadores espécie-específicos utilizados.

Verificou-se que, após a realização de cinco repetições da técnica de mPCR para amostras de leite aleatórias, os resultados foram idênticos, comprovando a reprodutibilidade do método. Este dado é relevante, uma vez que possibilita a indicação da técnica como recurso diagnóstico complementar para análise de grande número de amostras de leite.

6.5 Características dos rebanhos e relação com resultados de cultivo microbiológico e da mPCR a partir de amostras de leite dos tanques de expansão

Utilizando o teste χ^2 de independência ($P < 0,05$), para verificar a relação entre o isolamento dos patógenos estudados (*S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*) com as técnicas diagnósticas utilizadas (cultivo microbiano a partir das amostras de leite dos tanques de expansão e dos rebanhos, e mPCR para análise do leite dos tanques), verificou-se que a ocorrência destes três micro-organismos não sofreu influência pelo tipo de sistema de ordenha, assim como da lavagem e secagem dos tetos, da utilização de pré e pós-*dipping*, da realização da prova de Tamis, do CMT, do tipo de tratamento usado para mastite (baseado em antibiograma ou realizado aleatoriamente), da desinfecção das teteiras, do tipo de manejo pós-ordenha (repouso ou alimentação), da profilaxia/terapia da vaca seca, do acompanhamento veterinário, das condições de higiene, da higienização dos tanques de expansão e da classificação da propriedade ($P > 0,05$), para os métodos diagnósticos utilizados.

Com base nos resultados obtidos na presente pesquisa, ressalta-se o êxito na padronização da técnica de mPCR para a detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* – principais micro-organismos causadores de mastites e de especial relevância em saúde pública – em amostras de leite de mistura. Destacam-se ainda as contribuições diagnósticas que esta técnica molecular poderá trazer em complementação aos métodos de rotina, para os programas de monitoramento de mastite e controle da qualidade do leite, estando em linha com a IN no. 51 do MAPA e também com as mais recentes pesquisas realizadas no mundo sobre este aspecto.



CONCLUSÕES

7 – CONCLUSÕES

- A técnica de mPCR proposta foi padronizada com êxito no presente estudo. No entanto, embora tenha apresentado excelentes valores de acurácia para a detecção de *E.coli* e *S. agalactiae*, este método molecular não possibilitou a detecção de *S. aureus* nas amostras de leite compostas, constituindo, portanto, recurso diagnóstico ineficaz para este patógeno em amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão;
- A utilização em conjunto das técnicas de cultivo microbiológico e mPCR possibilitou a determinação da frequência dos micro-organismos-alvo com excelente acurácia, a partir das amostras de leite compostas, sendo que o cultivo apresentou maiores índices de sensibilidade e a mPCR maior especificidade;
- A maioria das amostras de leite de tanques de expansão avaliadas apresentou valores de CCS e CBT abaixo dos limites máximos permitidos pela IN no. 51 do MAPA, indicando que a qualidade do leite das propriedades amostradas apresentou-se satisfatória;
- Não houve relação de dependência entre os resultados obtidos pelo cultivo microbiológico e pela mPCR com os procedimentos de ordenha das propriedades avaliadas, sinalizando que outros fatores não avaliados no presente estudo também influenciaram na qualidade microbiológica final das amostras de leite.

*B***IBLIOGRAFIA**

8 – BIBLIOGRAFIA¹

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

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Autilização sobre surto causado por *E. coli* na Alemanha. Nota técnica. Disponível em: <<http://pfarma.com.br/noticia-setor-farmaceutico/saude/612-anvisa-surto-bacterias-e-coli-europa.html>> Acesso em: 05/07/2011.

BENTLEY. **Somacount 300: Operator's manual**. Chasca. 1995.

BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Vet. Journal**, v.164, n.2, p.116-128, 2002.

BRASIL. Instrução Normativa 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... **Diário Oficial da União**, Seção I, p.13, 2002.

BRITO, J.R.F. e BRITO, M.A.V.P. Programas de controle das mastites causadas por micro-organismos contagiosos e do ambiente. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 1998. 25p. (**EMBRAPA-CNPGL. Documentos, 71**).

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T.; VEIGA, V.M.O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.51, p.129-135, 1999.

CARNEIRO, D.M.V.F. **Detecção microbiológica e molecular de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão – correlação com resíduos de antibióticos**. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista. 2009.

¹ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

CFSPH. The Center for Food Security and Public Health. Iowa State University. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections. 2009. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/e_coli.pdf>. Acesso em: 03/07/2011.

CHOTÁR, M.; VIDOVA, B.; GODANY, A. A development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. **Folia Microbiol.**, v.51, n.6, p.639-646, 2006.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Rev. Ed. Cont. CRMV-SP**, fasc.1, v.1, p.3-9, 1998.

COSTA, E.O. Uso de antibióticos na mastite. *In*: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M.. (Org.). Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 443-445, 2002.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Mol. Cel. Probes**, v.19, p.299-305, 2005.

CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; Malferrari, G.; Biunno, I.; VIMERCATI, C.; MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M. Technical Note: improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. **J. of Dairy Sci.**, v.89, p.163-169, 2006.

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

DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H.; PADOVANI, C.R.; LISTONI, F.J.P. Influência da mastite subclínica sobre a produção de leite. **Vet. Zootec.**, v.10, p.99-106, 1998.

DÖPFER, D.; BARKEMA, H.W.; LAM, T.J.G.M.; SCHUKKEN, Y.H.; GAASTRA, W. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.82, p.80-85, 1999.

DUNN, C. Acute coliform mastitis in a dairy cow. **Can. Vet. J.**, Ottawa, v.35, p.301-302, 1994.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Gado de leite. Demanda de produção de leite no Brasil. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0233.php>>. Acesso em: 26/06/2011.

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

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

FAGUNDES, H. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157:H7 em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo, 2007.** 101f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

FORSMAN, P.; TILSALATIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. **Microbiology-Uk**, v.143, p.3491-3500. 1997.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FOURNIER, C.; KUHNERT, P.; FREY, J.; MISEREZ, R.; KIRCHHOFER, M.; KAUFMANN, T.; STEINER, A.; GRABER, H.U. Bovine *Staphylococcus aureus*: association of virulence genes, genotypes and clinical outcome. **Res. Vet. Science**, v.85, n.3, p.439-448, 2008.

GANDRA, E.A. **Multiplex PCR para a detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado.** Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006. 81p.

GILLESPIE, B.E. and OLIVER, S.P. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction. **J. Dairy Sci.**, v.88, p.3510-3518, 2005.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; OSTERAS, O.; HOGVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. **Vet. Quart.**, v.29, n.1, p.18-31, 2007.

HORTET, P. e SEEGER, H. Calculated milk production losses associated with elevated somatic cells counts in dairy cows: review and critical discussion. **Vet. Res.**, v.29, n.6, p.497-510, 1998.

JAYARAO, B.M. e HENNING, D.R. Prevalence of food born pathogens in bulk tank milk. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.84, p.2157-2162, 2001.

KEEFE, G.P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. **Can. Vet. J.**, v.38, n.7, p.429-437, 1997.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. 1997. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.** J.B. Lippincott, Philadelphia, 1395p.

LANGONI, H.; SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.20, n.5, p.204-209, 1998.

LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. **Rev. Educ.Contin. CRMV-SP**, v.3, p.57-64, 2000.

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

MAXWELL, M.L.; GILLESPIE, B.E.; OLIVER, S.P. Real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of mastitis pathogens directly from milk. **NMC Annual Meeting Proceedings**, p. 212-213, 2008.

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

MOUSSA, I.M.; ASHGAN, M.H.; ALWATHNANI, H.A.; MOHAMED, KH.F.; ALDOSS, A.A. Multiplex polymerase chain reaction for detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC). **African J. Biotech.**, v.9, n.28, p.4356-4363, 2010.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J. O.; JORGENSEN, J. H. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 9.ed. ASM Press: Washington, 2v., 2007.

NICKERSON, S.C. Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis infections. **Vet. Med.**, abril, p.368-386, 1993.

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

OLIVEIRA, C.A.F.; FONSECA, L.F.L.; GERMANO, P.M.L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam na qualidade do leite. **Hig. Aliment.**, v.13, n.62, p.10-13, 1999.

PHUEKTES, P.; MANSELL, P.D.; BROWNING, G.F. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. **J. Dairy Sci.**, v.84, p.1140-1148, 2001.

PHUEKTES, P.; BROWNING, G.F.; ANDERSON, G.; MANSELL, P.D. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. **J. Dairy Res.**, v.70, p.149-155, 2003.

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

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 10^a ed. 2007.

RAMESH, A.; B. P. PADMAPRIYA, A. CHRASHEKAR AND M. C. VARADARAJ Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Mol. and Cel. Probes**, v.16, n.4, p.307-314, 2002.

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

SANT'ANA, A.S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D.R.P. Comparação entre os métodos rápidos Simplate TPC-CI e Petrifilm AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, 22 v.1, p.60-64, 2002.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**. Ed. Manole: Pirassununga-SP. 1a. Ed. 328p., 2007

SHALM, O.W.; CAROLL, E.I.; JAIN, N.C. **Bovine mastitis**. Lea and Febinger: Philadelphia, p. 369, 1971.

SILVA, N.; JUNQUEIRA V.C.A.; SILVEIRA N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2^a ed. São Paulo: Livraria Varela, 229p., 2001.

SILVA, M.A. **Utilização de PCR Multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. 2008. 32p.

SILVEIRA, T.M.L.; FONSECA, L.M.; LAGO, T.B.N.; VEIGA, D.R. Comparação entre o método de referência e a análise eletrônica na determinação da contagem de células somáticas no leite bovino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, São Paulo, v.57, n.1, p.128-132, 2005.

SILVENNOINEN, M.; HOLOPAINEN, J.; KOSKINEN, M.T. Pathoproof mastitis PCR assay and sensitivity validation of a new test kit for rapid identification of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Mycoplasma bovis* in bovine milk. **National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings** (2010). Albuquerque, New Mexico. p.240-241.

SOUZA, G.N.; FARIA, C.G.; RUBIALE, L.; MORAES, L.C.D. *Streptococcus agalactiae*: efeito sobre a contagem de células somáticas e eficiência da blitz terapia. **Panorama do Leite Online**. Ano 2, n.23, outubro de 2008. Disponível em: <<http://www.cileite.com.br/panorama/qualidade23.html>> Acesso em: 03/08/2011.

YAMAGISHI, N.; JINKAWA, Y.; OMOE, K.; MAKINO, S.; OBOSHI, K. Sensitive test for screening for *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis by broth cultivation and PCR. **Vet. Rec.**, v.161, n.11, p.381-383, 2007.

TODAR, K. *Staphylococcus*. *Todar's online textbook of bacteriology*. Disponível em <<http://www.textbookofbacteriology.net>> 23/05/2002. Acesso em: março de 2008.

TRABULSI, L. R.; ORDOÑEZ, J. G.; MARTINEZ, M. B. *Enterobacteriaceae*. In: Trabulsi, L. R.; Alterthum, F. **Microbiologia**. 4.ed. Atheneu: São Paulo, p.269-276, 2005.

ZOCHE, F.; BASTOS, C.P.; SILVA, W.P. Detecção de genes do *cluster egc* em *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal. **Ciência Rural Online**, v.40, n.5, 2010.

*A*NEXOS

ANEXO 1: Parecer da Câmara de Ética em Experimentação Animal

 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JULIO DE MESQUITA FILHO

 **fmvz - unesp**
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

ATESTADO

Atestamos para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa “Padronização da técnica de multiplex PCR para a detecção de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* em amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão”, Protocolo nº 133/2008-CEEA, de **Marcella Zampoli Troncarelli**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível Doutorado desta Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 10 de junho de 2008.


PROF. ASS. DR. LUIZ HENRIQUE ARAÚJO MACHADO
Presidente da CEEA da FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu

FMVZ/UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu/SP – 13818-000
☎/fax: 14-3811-6105 – ✉ ste@fmvz.unesp.br – 🌐 www.fmvz.unesp.br

*A*NEEXO 2: Questionário epidemiológico das propriedades

Nome da Propriedade

Município

Produção de leite (média diária em L)	
Nº médio de animais em lactação	
Nº de ordenhas / dia	
Nº de animais com mastite clínica	
Sistema de ordenha	() canalizado () balde ao pé () manual
Faz lavagem do teto antes da ordenha?	() sim () não
Seca o teto com pano ou papel toalha?	() pano () papel toalha () não seca
Realiza <i>pré-dipping</i> ?	() sim () não
Realiza <i>pós-dipping</i> ?	() sim () não
Qual desinfetante usa nos tetos?	() iodo () cloro () nenhum
Faz teste da caneca preta?	() sim () não
Faz CMT?	() sim () não
Qual o critério para o tratamento contra mastite?	() antibiograma () aleatório
Desinfeta teteiras após ordenha?	() sim () não
Qual o manejo pós-ordenha?	() animais se alimentam () animais repousam
Realiza terapia/profilaxia de vaca seca?	() sim () não
Realiza limpeza diária da sala e dos equipamentos de ordenha?	() sim () não
Realiza registro dos dados animais?	() sim () não
Há acompanhamento médico-veterinário?	() sim () não
Condições de higiene observadas	() boa () regular () ruim
Estrutura da sala de ordenha	() boa () regular () ruim

ANEXO 3:

Extração de DNA utilizando o Milk Bacterial DNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corporation)

Preparação do lisado (bactérias Gram negativas)

- a. Aliquotar 1 mL da amostra de leite em microtubo.
- b. Centrifugar a 14,000 x g (~14,000 rpm) durante 2 minutos.
- c. Deprezar o sobrenadante invertendo o microtubo e remover levemente o depósito de gordura na extremidade do microtubo, utilizando pipeta de 200 µL ou suabe. Assegurar que o pellet não foi destacado.
- d. Adicionar 400 µL de solução de lise e 10 µL de Proteinase K ao pellet celular e homogeneizar bem por vórtex.
- e. Incubar o lisado a 55°C durante 30 minutos.

Preparação do lisado (bactérias Gram positivas)

- a. Aliquotar 1 mL da amostra de leite em microtubo.
 - b. Centrifugar a 14,000 x g (~14,000 rpm) durante 2 minutos.
 - c. Deprezar o sobrenadante invertendo o microtubo e remover levemente o depósito de gordura na extremidade do microtubo, utilizando pipeta de 200 µL ou suabe. Assegurar que o pellet não foi destacado.
 - d. Ressuspender o pellet em 100 µL de tampão de digestão. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Nota:** Assegurar que a lisosima foi adicionada ao tampão de digestão.
- e. Após incubação, adicionar 300 µL de solução de lise e 10 µL de Proteinase K reconstituída à mistura de digestão e homogeneizar bem por vórtex.
 - f. Incubar o lisado a 55°C durante 30 minutos.

2. Ligação da amostra   coluna

- a. Após incubac o, adicionar 40 µL de soluço de liga o e 180 µL de 96-100% etanol   mistura de lise e homogeneizar por vórtex.
- b. Centrifugar a amostra por 10 segundos a 14,000 x g (~14,000 rpm). Uma pequena camada lipídica poderá se formar na superfície da fase aquosa. Utilizando uma pipeta, cuidadosamente transferir a fase aquosa límpida para a coluna que deve estar montada no tubo de cole o.
- c. Centrifugar o sistema com a coluna durante 4 minutos a 5,200 x g (~8,000 rpm) para ligar o DNA bacteriano. Se todo o líquido não passar pela coluna, centrifugar por mais 1 minuto a 14,000 x g (~14,000 rpm).

3. Lavagem da coluna

- a. Aplicar 500 µL de soluço de lavagem 1   coluna e centrifugar por 3 minutos a 14,000 x g (~14,000 rpm).
- Nota:** Assegurar que apropriada quantidade de etanol foi acrescida   soluço de lavagem 1.
- b. Descartar o filtrado e remontar a coluna no tubo de cole o.
 - c. Aplicar 500 µL de soluço de lavagem 2   coluna e centrifugar novamente por 3 minutos a 14,000 x g (~14,000 rpm).
 - d. Assegurar que toda a soluço de lavagem 2 passou pela coluna e que a coluna está seca. Centrifugar por mais um minuto se necessário.
 - e. Descartar o tubo de cole o com o filtrado.

4. Elui o do DNA

- a. Transferir a coluna ao tubo de elui o de 1,7 mL.
- b. Aplicar 100 µL de tampão de elui o   coluna e centrifugar a 2,600 x g (~6,000 rpm) por 2 minutos.
- c. Centrifugar por mais 2 minutos a 14,000 x g (~14,000 rpm) para completar a elui o do DNA.

*T*RABALHOS *C*IENTÍFICOS

1 Seção 1

2 **TRABALHO CIENTÍFICO 1 A SER ENVIADO PARA A REVISTA**

3 **JOURNAL OF DAIRY RESEARCH**

4
5 **MANEJO DE ORDENHA E IMPACTOS SOBRE A QUALIDADE DO LEITE**

6
7 **MILKING MANAGEMENT AND IMPACTS ON MILK QUALITY**

8
9 **Marcella Z. Troncarelli¹, Helio Langoni²**

10
11
12
13 ¹DVM, PhD, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ Estadual Paulista, São Paulo,
14 Brazil. Corresponding author: (matroncarelli@yahoo.com.br).

15
16 ²DVM, Titular Professor, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ Estadual Paulista,
17 São Paulo, Brazil.

Resumo

Com o objetivo de normatizar a cadeia produtiva visando à melhoria da qualidade do leite no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento delineou a IN n° 51, em vigor desde julho de 2005. Em linha com estes parâmetros objetivou-se, no presente estudo, a avaliação de diferentes tipos de manejo de ordenha e seus reflexos na qualidade do leite. Foram visitadas 20 propriedades leiteiras do Estado de São Paulo, Brasil, com sistema de ordenha mecânica e tanque de expansão próprio. Aplicou-se questionário aos funcionários e/ou proprietários para obtenção de dados epidemiológicos e classificação das propriedades, segundo condições higiênico-sanitárias de ordenha. Amostras de leite dos rebanhos em lactação e dos tanques de expansão foram colhidas para a realização de cultivo microbiológico, CCS e CBT. 45% das propriedades foram classificadas como A (satisfatórias), 35% como B (regulares) e 20% como C (insatisfatórias). *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* foram isolados, em 30%; 10% e 40% das amostras de leite dos tanques de expansão, respectivamente. A CCS apresentou mediana de 395.000 células/mL, e 55% das amostras avaliadas resultou em valores de CBT satisfatórios para mesófilos. Verificou-se que em propriedades onde há realização da terapia/profilaxia da vaca seca nos rebanhos, não houve isolamento de *S. aureus* nas amostras de leite de tanque de expansão. Além disso, onde a estrutura da sala de ordenha era satisfatória, o agente não foi detectado no leite de mistura. Com relação à avaliação microbiana nas amostras de leite dos rebanhos, observou-se que quando ocorreu a lavagem dos tetos, não houve isolamento de *S. agalactiae* e quando houve a secagem dos tetos, principalmente com papel toalha, houve maior número de isolamentos de *S. aureus*.

Introdução

O reduzido volume de produção de leite, bem como a qualidade do produto enviado aos laticínios e oferecido para o consumo tem sido alvo de constante preocupação no Brasil. Verifica-se que, em muitas propriedades, ainda persistem problemas de manejo, condições deficientes de produção, mão-de-obra pouco qualificada, limitações de ordem genética dos rebanhos, nutrição inadequada dos animais e elevada prevalência de mastites (COSTA, 2002). Estas características interferem diretamente na qualidade do leite, que pode trazer sérios prejuízos, tanto à saúde pública, quanto à indústria. Com efeito, a avaliação científica de diferentes tipos de manejo de ordenha e sua relação com a qualidade final do leite é imprescindível, especialmente para o direcionamento de ações preventivas e de controle.

Material e Métodos

Propriedades

Foram visitadas 20 propriedades leiteiras de municípios do Estado de São Paulo, Brasil. Todas as fazendas contavam com sistema de ordenha mecânica e tanque de expansão próprio.

59 Amostras de leite**60 Dos animais**

61 Foram envolvidos no estudo preferencialmente os bovinos em período médio de lactação. As
62 amostras de leite foram colhidas assepticamente após anti-sepsia dos tetos com solução de iodo
63 glicerinado a 1%, e transportadas sob temperatura de refrigeração (4-8°C) para cultivo microbiano.

64

65 Dos tanques de expansão

66 As amostras de leite do tanque foram obtidas a partir do total de leite produzido por
67 propriedade no período máximo de 24 horas. De cada tanque de expansão foram colhidos 250 mL de
68 leite, após adequada homogeneização, e acondicionadas em frascos de vidro estéreis. As mesmas
69 foram transportadas sob refrigeração (4-8°C), em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, até o
70 Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites, da FMVZ UNESP/Botucatu-SP. Para a CCS,
71 amostras de leite obtidas dos tanques de expansão foram acondicionadas em triplicata, em frascos
72 plásticos contendo conservante bronopol.

73

74 Dados epidemiológicos

75 Foram colhidas informações epidemiológicas de cada propriedade, por meio da aplicação de
76 questionário, junto aos funcionários/proprietários das fazendas. Foram avaliadas as condições gerais
77 de manejo dos animais e higiene de ordenha, considerando os seguintes itens: produção leiteira
78 (média diária), tipos de equipamentos de ordenha e de armazenamento do leite, manejo de ordenha,
79 hábitos de higiene dos ordenhadores, medidas de diagnóstico e prevenção de mastite, prevalência de
80 mastite clínica e/ou subclínica, esquema de tratamentos antimicrobianos rotineiramente utilizados nos
81 animais com mastite (FAGUNDES, 2007).

82 Com as informações obtidas nos questionários, as propriedades foram classificadas de
83 acordo com os métodos e condições gerais de ordenha (Tabela 1).

84

85

86 TABELA 1. Características avaliadas em 20 propriedades leiteiras do Estado de São Paulo, Brasil,
 87 por meio de questionário aplicado ao(s) proprietário(s) e/ou funcionário(s), para classificação quanto
 88 às condições higiênico-sanitárias de ordenha.

Item	Característica
1	Mão-de-obra qualificada
2	Realização de <i>pré-dipping</i>
3	Realização de <i>pós-dipping</i>
4	Realização de teste da caneca telada (Tamis)
5	Realização do CMT
6	Manejo do rebanho pós-ordenha
7	Limpeza diária da sala de ordenha / equipamentos
8	Estrutura da sala de ordenha
9	Registro dos dados dos animais
10	Acompanhamento médico-veterinário

89 Classificação das propriedades (adaptada de FAGUNDES, 2007):

90 > 8 itens atendidos: A (condições satisfatórias de ordenha)

91 5-8 itens atendidos: B (condições regulares de ordenha)

92 < 5 itens atendidos: C (condições insatisfatórias de ordenha).

93

94 **Cultivo microbiológico**

95 O cultivo microbiológico foi realizado no Laboratório do NUPEMAS, no DHVSP – FMVZ
 96 UNESP/Botucatu-SP. Todas as amostras de leite foram semeadas nos meios de ágar sangue bovino
 97 (5%) e ágar MacConkey, mantidas a 37°C em aerobiose, por 72 horas. As linhagens de micro-
 98 organismos de origem bacteriana foram identificadas segundo as características morfo-tintoriais,
 99 bioquímicas e de cultivo (QUINN et al., 2005). As amostras de leite obtidas dos tanques de expansão
 100 foram diluídas em solução salina a 10⁻¹ e 10⁻², para facilitar a visualização das colônias. As amostras
 101 puras (10⁰) e suas respectivas diluições foram inoculadas nos meios de ágar sangue e MacConkey,
 102 espalhando-se com alça de Drigalski, e posteriormente incubadas a 37°C em aerobiose, por 72
 103 horas.

104

105 **CBT**

106 Para a contagem de micro-organismos aeróbios e anaeróbios facultativos mesófilos e
 107 psicrotróficos nas amostras de leite do tanque de expansão, foi utilizado o Petrifilm® (3M - EUA), a
 108 partir de três diluições, sendo 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ para mesófilos (48 horas de incubação a 35°C) e 10⁻²,
 109 10⁻³ e 10⁻⁴ para psicrotróficos (dez dias de incubação a 7°C). Foram realizadas duplicatas de cada
 110 diluição, para cálculo da média de contagem de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos.

111

112

113

114 **CCS**

115 A contagem eletrônica de células somáticas das amostras de leite foi realizada por citometria
 116 de fluxo com equipamento Somacount 300® (BENTLEY, 1995; LANGONI, 2000) no Laboratório do
 117 NUPEMAS, DHVSP FMVZ-UNESP/Botucatu-SP. Foram consideradas indicativos de infecção
 118 amostras com contagens iguais ou superiores a 750.000 células/mL (BRASIL, 2002).

119

120

Resultados e Discussão121 **Avaliação do manejo de ordenha e dos dados colhidos por meio dos questionários**
 122 **epidemiológicos**

123 Na Tabela 2 estão apresentadas as características avaliadas nas 20 propriedades envolvidas
 124 no estudo.

125 TABELA 2. Resumo das principais características observadas entre as vinte propriedades leiteiras
 126 avaliadas, do Estado de São Paulo, Brasil.

Característica	Ocorrências
Condições satisfatórias de ordenha (Grupo A)	9 (45%)
Condições regulares de ordenha (Grupo B)	7 (35%)
Condições insatisfatórias de ordenha (Grupo C)	4 (20%)
Sistema de ordenha	16 (80%) canalizado 4 (20%) balde ao pé
Lavagem tetos antes ordenha	9 (45%) sim 11 (55%) não
Secagem tetos	2 (10%) não 15 (75%) papel toalha 2 (10%) jornal 1 (5%) pano
Pré-dipping	4 (20%) não 11 (55%) cloro 4 (20%) iodo 1 (5%) ácido láctico
Pós-dipping	4 (20%) não 14 (70%) iodo 2 (10%) cloro
Prova de Tamis	16 (80%) sim 4 (20%) não
CMT	6 (30%) sim 14 (70%) não
Tratamento mastite	17 (85%) aleatório 3 (15%) antibiograma
Desinfecção teteiras pós-ordenha	19 (95%) sim 1 (5%) não
Manejo pós-ordenha	15 (75%) alimentação 5 (25%) repouso
Terapia/profilaxia vaca seca	15 (75%) sim 5 (25%) não
Acompanhamento veterinário	16 (80%) sim 4 (20%) não
Higiene sala ordenha	3 (15%) insatisfatória 6 (30%) regular 11 (55%) satisfatória
Estrutura sala ordenha	2 (10%) insatisfatória 5 (25%) regular 13 (65%) satisfatória
Higienização tanque expansão	8 (40%) diária 12 (60%) em dias alternados
Limpeza diária sala ordenha	20 (100%) sim
Registra os dados dos animais	16 (80%) sim 4 (20%) não

127

128 Houve envolvimento, no presente estudo, de propriedades leiteiras das mais variadas
129 características, tanto estruturais, quanto de manejo. Foram avaliadas propriedades com 19 a 970
130 animais em lactação e, embora todas contassem com sistema de ordenha mecânico e tanque de
131 expansão próprio – pré-requisitos para inclusão na pesquisa – apresentavam diferentes sistemas de
132 ordenha e distintos níveis de tecnificação. Vale ressaltar que nem todas as propriedades com
133 elevados volumes de produção de leite apresentaram classificação A (satisfatória) ou B (regular), com
134 relação à higiene e estrutura de ordenha. Por outro lado, quatro propriedades classificadas como C
135 (insatisfatórias) apresentavam sistema de ordenha do tipo “balde ao pé”, com consideráveis falhas de
136 manejo, a saber: não realização da lavagem dos tetos antes da ordenha, limpeza direta dos tetos
137 com jornal ou pano, não realização de pré e pós-*dipping*, não realização das provas de Tamis e CMT,
138 ausência de critério para tratamento de mastite clínica, não realização de terapia/profilaxia da vaca
139 seca, ausência de controle dos dados dos animais, más condições de higiene na ordenha, mão-de-
140 obra não qualificada e estrutura física insatisfatória da sala de ordenha. Vale ressaltar que estas
141 quatro propriedades não eram acompanhadas por profissional Médico Veterinário, o que reforça a
142 importância da assistência técnica para a melhoria da qualidade do leite.

143 Como apresentado na Tabela 2, 45% das propriedades avaliadas apresentavam condições
144 satisfatórias de ordenha. Estes dados corroboram os de Fagundes (2007), que avaliou 42
145 propriedades leiteiras, em duas regiões do Estado de São Paulo, e verificou que 33,3% e 19,1%
146 delas apresentavam adequado manejo higiênico-sanitário de ordenha, respectivamente, na região 1
147 (São Carlos) e na região 2 (Ribeirão Preto). Por outro lado, em ambas regiões avaliadas, 47,6% das
148 propriedades apresentavam condições insatisfatórias de ordenha, diferindo dos resultados obtidos no
149 presente estudo, onde 20% e 35% das propriedades apresentavam manejo deficitário e regular,
150 respectivamente .

151 O sistema de ordenha canalizado mostrou-se predominante nas 20 propriedades avaliadas
152 no presente estudo, o que pode estar relacionado à média de produção de leite/animal, que foi de
153 18,3 litros/dia. Constatou-se que, para a região avaliada, o sistema balde ao pé é utilizado em
154 propriedades com menor volume de produção, embora uma delas apresentasse produção diária de
155 900 litros de leite. Estes resultados diferem dos obtidos por Fagundes (2007), que verificaram 57% e
156 67% de sistema canalizado, e 43% e 33% de sistema balde ao pé, respectivamente, nas regiões 1 e
157 2 avaliadas, que apresentaram média de produção de 1.000 L de leite/dia.

158 Em 55% das propriedades avaliadas, no presente estudo, a lavagem dos tetos antes da
159 ordenha é realizada. Constatou-se que onde se realiza esta prática, não se procede a lavagem total
160 do animal, nem do úbere, e sim somente dos tetos, de maneira a evitar a contaminação do leite e dos
161 equipamentos de ordenha, especialmente por micro-organismos ambientais. Já a secagem dos tetos
162 é uma conduta bastante freqüente nas propriedades, com a utilização de papel toalha em 75% dos
163 casos, demonstrando que felizmente o hábito de utilização de pano, jornal ou outros, está sendo
164 descontinuado.

165 Verificou-se ainda que a realização de pré e pós-*dipping* ocorre em 80% das propriedades
166 avaliadas. Foi constatado durante as visitas às propriedades que os produtores utilizam anti-sépticos

167 adequados, em concentrações corretas para este fim, demonstrando correto manejo preventivo de
168 mastite ambiental e contagiosa. A utilização de produtos à base de cloro no pré-*dipping* e de iodo no
169 pós-*dipping* é prática comum entre os produtores, embora em uma das propriedades o ácido láctico
170 tem sido utilizado no pré-*dipping*, com redução dos casos de mastite no rebanho e menores níveis de
171 CCS no leite de mistura, segundo o proprietário.

172 Ainda com relação ao manejo pré-ordenha, embora a prova de Tamis seja realizada em 80%
173 das propriedades, verificou-se que o CMT não é realizado em 70% delas, indicando que os
174 produtores não estão atentando ao diagnóstico de mastite subclínica nos rebanhos. Além disso, a
175 escolha do tratamento de mastite clínica é realizado de maneira aleatória, ou seja, não fundamentada
176 em isolamento microbiológico/antibiograma, em 85% das propriedades estudadas. Mesmo
177 considerando que há acompanhamento veterinário em 16 das 20 propriedades avaliadas, em
178 somente três propriedades assistidas pelo profissional o tratamento dos casos de mastite clínica é
179 fundamentado em cultivo e antibiograma. Este aspecto é preocupante, uma vez que durante as
180 visitas às propriedades, muitos produtores relataram insucesso no tratamento das vacas com mastite
181 clínica, que acabavam por apresentar cronicidade do quadro e/ou perda permanente da função do(s)
182 quarto(s) acometido(s).

183 95% dos produtores relataram realizar o procedimento de desinfecção das teteiras após a
184 ordenha. No entanto, verificou-se que em algumas propriedades este processo não é realizado
185 corretamente, podendo comprometer inclusive a qualidade do leite, por contaminação microbiológica.
186 Como exemplo, cita-se a imersão dos conjuntos de ordenha em baldes contendo solução de cloro
187 diluído em água, em proporções incorretas, a qual é mantida sem troca até o final da ordenha. O
188 procedimento incorreto de desinfecção é tão prejudicial quanto a não realização do mesmo. Em
189 estudo realizado por Amaral et al. (2004), a desinfecção das teteiras com hipoclorito de sódio durante
190 a ordenha não foi eficiente como método preventivo de redução de ação das teteiras como vias de
191 transmissão de micro-organismos para o úbere e para o leite. Os autores constataram que a prática
192 de desinfecção das teteiras não reduziu significativamente o número de coliformes e de
193 *Staphylococcus* spp., destacando que em algumas teteiras, após o uso do desinfetante, ocorreu
194 aumento do número de micro-organismos isolados.

195 Quanto ao manejo pós-ordenha, a maioria dos produtores (75%) sabe que as vacas devem
196 ser alimentadas, para que permaneçam em estação, de maneira a evitar a ocorrência de mastite
197 ambiental, e por isso praticam este manejo. Além disso, em 75% das propriedades, a conduta de
198 terapia/profilaxia da vaca seca é realizada, segundo informado pelos produtores. Outro dado
199 importante é que em 80% das propriedades existe acompanhamento de profissional veterinário e
200 registro dos dados dos animais, demonstrando novamente a marcante orientação técnica da
201 produção.

202 Embora 100% dos produtores tenham relatado que realizam limpeza diária da sala de
203 ordenha, constatou-se que em 30% delas a higiene estava regular e em 15% insatisfatória, assim
204 como em 25% das propriedades a sala de ordenha apresentava estrutura regular e em 10%
205 insatisfatória. Ressalta-se que as condições físicas (estruturais) da sala de ordenha são fatores que

206 podem contribuir ou prejudicar sua adequada higienização. Como exemplos, citam-se rachaduras nos
 207 pisos e/ou revestimentos; ressecamento e fissuras nas tubulações dos equipamentos de ordenha,
 208 entre outros, que podem acumular sujidades de difícil remoção.

209

210 **Isolamentos microbianos nas amostras de leite individuais e compostas**

211 Com relação aos isolamentos microbianos nas amostras de leite dos quartos mamários
 212 (Tabela 3), ressalta-se que *S. aureus* foi o agente predominante, tendo sido isolado em praticamente
 213 todos os rebanhos (à exceção de um), com frequência geral de 3,7%. *S. agalactiae* e *E. coli*
 214 apresentaram menores frequências de isolamento (0,5% e 0,6%, respectivamente). *Corynebacterium*
 215 sp. foi o micro-organismo mais frequentemente isolado nos rebanhos (7,2%), seguido de
 216 estafilococos e estreptococos não hemolíticos.

217

218 TABELA 3. Frequências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos, frente ao total de isolamentos
 219 obtidos a partir de amostras de leite de vacas em produção das 20 propriedades avaliadas, no Estado
 220 de São Paulo, Brasil.

221

Micro-organismo	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<i>Corynebacterium</i> sp.	437	32,0
<i>Staphylococcus</i> sp.	292	21,4
<i>Streptococcus</i> sp.	262	19,3
<i>S. aureus</i>	227	16,6
Outros*	60	4,4
<i>E. coli</i>	38	2,7
<i>S. agalactiae</i>	36	2,6
Leveduriformes	12	0,8
TOTAL	1.364	100

222 *Demais micro-organismos não-alvos, tais como outras espécies de enterobactérias, *Pseudomonas*
 223 sp., entre outros.

224

225 Estudos indicam que, em rebanhos controlados, onde a frequência de mastites é baixa,
 226 especialmente por *S. aureus*, o isolamento de *Corynebacterium* sp. é significativo. Alguns autores
 227 chegaram a considerar este agente como micro-organismo comensal da glândula mamária. Apesar
 228 disso, não há relação entre a maior frequência de isolamento de *Corynebacterium* sp. nos rebanhos,
 229 com os resultados de isolamento nas amostras de leite dos tanques de expansão, na medida em que
 230 este micro-organismo foi isolado em somente uma das 20 amostras de leite de mistura avaliadas.
 231 Este fato pode ser explicado pela possível inibição da multiplicação de *Corynebacterium* sp., pela
 232 presença massiva de outros microrganismos, especialmente enterobactérias, que apresentam
 233 multiplicação rápida e abundante, competindo pelos nutrientes do meio de cultura.

234 Ressalta-se o freqüente isolamento de micro-organismos não-alvos nas amostras de leite dos
 235 tanques de expansão avaliados (Tabela 4), como outras espécies de enterobactérias, *Pseudomonas*
 236 sp., etc., embora estes micro-organismos tenham sido isolados com reduzida freqüência nos
 237 rebanhos (1,0%). Estes resultados indicam possível contaminação da tubulação do sistema de
 238 ordenha e/ou do tanque de expansão por estes agentes, ou ainda utilização de água contaminada na
 239 higienização dos equipamentos.

240
 241 TABELA 4. Freqüências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos, frente ao total de isolamentos
 242 obtidos a partir de amostras de leite de tanque de expansão de 20 propriedades do Estado de São
 243 Paulo. Botucatu-SP, 2011.

Micro-organismo	Freqüência absoluta	Freqüência relativa (%)
Outros*	16	28,5
<i>Streptococcus</i> sp.	12	21,4
<i>Staphylococcus</i> sp.	9	16,0
<i>E. coli</i>	8	14,2
<i>S. aureus</i>	6	10,7
<i>S. agalactiae</i>	2	3,5
Leveduriformes	2	3,5
<i>Corynebacterium</i> sp.	1	1,7
TOTAL	56	100

245 *Demais micro-organismos não-alvos, tais como outras espécies de enterobactérias, *Pseudomonas* sp., entre outros.

246
 247 Os estreptococos e estafilococos não-hemolíticos, semelhante ao que ocorreu nos rebanhos,
 248 foram isolados com maior freqüência nas amostras de leite dos tanques de expansão, reforçando a
 249 importância destes patógenos bacterianos causadores de mastite contagiosa, que determinam
 250 prejuízos à qualidade final do leite de mistura.

251 252 **CCS e CBT**

253 O resultado médio de CCS nas amostras de leite dos 20 tanques de expansão avaliados foi
 254 de 442.400 células/mL, com mediana de 395.500 células/mL, valores bastante satisfatórios e muito
 255 próximos ao limite permitido pela IN no. 51 do MAPA. Apesar de quatro propriedades terem sido
 256 classificadas como C (insatisfatórias), com relação às condições de manejo e higiene de ordenha, os
 257 valores de CCS das amostras de leite dos tanques de expansão, nestas propriedades, variaram de
 258 11 mil a 400 mil células/mL. Estes resultados são inesperados, uma vez que em propriedades com
 259 manejo insatisfatório, o leite de mistura apresenta CCS acima de 800 mil células/mL, como verificado
 260 por Fagundes (2007).

261 A maioria das amostras de leite dos tanques de expansão avaliadas – 13/20 (65%) –
 262 apresentou CCS até 500.000 células/mL. Se for considerada a mediana, que foi de 395.000
 263 células/mL verifica-se que a maior parte destas propriedades já estaria atendendo ao limite máximo
 264 de 400.000 células/mL para leite de mistura, em vigor desde 01/07/2011, determinado pela IN 51 do
 265 MAPA (BRASIL, 2002). Por outro lado, quando se considera o valor máximo vigente durante a

266 realização do estudo, ou seja, de 750.000 células/mL, constata-se que três das 20 propriedades
267 avaliadas (15%) ainda estariam em desacordo com a legislação.

268 O limite máximo permitido para mesófilos no leite de mistura, de acordo com a IN 51
269 (BRASIL, 2002), é da ordem de 10^5 UFC/mL. Nove das 20 propriedades avaliadas (45%)
270 apresentaram resultados insatisfatórios quanto à contagem de mesófilos. Ressalta-se ainda que,
271 apesar de não haver limite de contagem de psicotróficos, pela legislação vigente, considerando
272 como 10^5 o limite para contagem destes micro-organismos, seis fazendas avaliadas (33,3%) também
273 apresentariam resultados insatisfatórios. Os micro-organismos psicotróficos, por apresentarem
274 multiplicação mesmo em temperaturas de refrigeração, geralmente entre 4-8°C, são especialmente
275 importantes no caso de leite de mistura, uma vez que permanecem viáveis e determinam prejuízos à
276 qualidade do leite, com conseqüente redução do rendimento industrial.

277

278 **Características epidemiológicas dos rebanhos e relação com resultados de cultivo** 279 **microbiológico a partir de amostras de leite dos tanques de expansão**

280 Utilizando o teste χ^2 de independência ($P < 0,05$), para verificar a relação entre o isolamento
281 dos patógenos estudados (*S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*) com as técnicas diagnósticas utilizadas
282 (cultivo microbiano a partir das amostras de leite dos tanques de expansão e dos rebanhos),
283 verificou-se que a ocorrência destes três micro-organismos independeu do sistema de ordenha, da
284 lavagem e secagem dos tetos, da utilização de pré e pós-*dipping*, da realização da prova de Tamis,
285 do CMT, do tipo de tratamento usado para mastite (baseado em antibiograma ou realizado
286 aleatoriamente), da desinfecção das teteiras, do tipo de manejo pós-ordenha (repouso ou
287 alimentação), da profilaxia/terapia da vaca seca, do acompanhamento veterinário, das condições de
288 higiene, da higienização dos tanques de expansão e da classificação da propriedade ($P > 0,05$), para
289 os métodos diagnósticos utilizados.

290 Verificou-se, por outro lado, que quando se realizou a terapia/profilaxia da vaca seca nos
291 rebanhos, não houve isolamento de *S. aureus* ($P = 0,0283$) nas amostras de leite de tanque de
292 expansão. Além disso, onde a estrutura da sala de ordenha era satisfatória, o agente não foi
293 detectado no leite de mistura. Estes dados corroboram os amplamente relatados na literatura, uma
294 vez que *S. aureus* é agente contagioso de mastite.

295 Com relação à avaliação microbiana nas amostras de leite dos rebanhos, observou-se que
296 quando ocorreu a lavagem dos tetos, não houve isolamento de *S. agalactiae* ($P = 0,0006$), e quando
297 houve a secagem dos tetos, principalmente com papel toalha, houve maior número de isolamentos de
298 *S. aureus* ($P = 0,0375$). A prática de lavagem dos tetos está especialmente voltada à redução do
299 número de patógenos ambientais, no manejo pré-ordenha, embora também possa contribuir para a
300 redução de micro-organismos contagiosos presentes na pele dos tetos. A secagem dos tetos com
301 papel toalha, individualmente por teto é recomendada, pois a utilização de panos ou outros materiais
302 contribuem para a veiculação de agentes contagiosos e/ou ambientais de mastite. A relação entre o
303 maior número de isolamentos de *S. aureus* e a secagem dos tetos com papel toalha permite inferir
304 que o procedimento esteja sendo realizado de maneira inadequada nas propriedades avaliadas. No

305 entanto, estes dados têm que ser vistos com cautela, pois é possível a existência de outros
306 parâmetros epidemiológicos que estejam interferindo nestas observações, e que não foram avaliados
307 no presente estudo.

308

309 **Agradecimentos**

310

311 À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da
312 bolsa de doutorado (Processo 04125-4) e auxílio à pesquisa (Processo 2008/11362-2).

313

314 **Referências**

315

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

318

319 BENTLEY. **Somacount 300: Operator's manual**. Chasca. 1995.

320

321 BRASIL. Instrução Normativa 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e
322 qualidade do leite tipo... **Diário Oficial da União**, Seção I, p.13, 2002.

323

324 COSTA, E.O. Uso de antibióticos na mastite. *In*: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M.. (Org.). **Farmacologia**
325 **Aplicada à Medicina Veterinária**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 443-445, 2002.

326

327 FAGUNDES, H. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O 157:H7 em rebanhos leiteiros do Estado de**
328 **São Paulo, 2007**. 101f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo,
329 Pirassununga, 2007.

330

331 LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células
332 somáticas. **Rev. Educ.Contín.** CRMV-SP, v.3, p.57-64, 2000.

333

334 QUINN, P.J.; MARKEY, B.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças**
335 **Infecciosas**. Ed. Artmed. Porto Alegre, 2005. 512p.

336

337

338

1 Seção 2

2 **TRABALHO CIENTÍFICO 2 A SER ENVIADO PARA A REVISTA**

3 **JOURNAL OF DAIRY RESEARCH**

4
5
6
7 ***Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae e Escherichia coli: detecção por multiplex***

8 **PCR em amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão**

9
10 ***Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae e Escherichia coli: detection by multiplex***

11 **PCR in bovine Milk samples collected from bulk tanks**

12
13 **Marcella Z. Troncarelli¹, Helio Langoni²**

14
15
16
17 ¹DVM, PhD, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ Estadual Paulista, São Paulo,
18 Brazil. Corresponding author: (matroncarelli@yahoo.com.br).

19
20 ²DVM, Titular Professor, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Univ Estadual Paulista,
21 São Paulo, Brazil.

Resumo

Com o objetivo de normatizar a cadeia produtiva visando à melhoria da qualidade do leite no Brasil, o MAPA delineou a IN n° 51, em vigor desde julho de 2005. Em linha com estes parâmetros, objetivou-se, no presente estudo, padronizar o método de mPCR para a detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* em amostras de leite bovino obtidas de tanques de expansão, e avaliar esta técnica como possível recurso diagnóstico a ser empregado em programas de controle de qualidade do leite oferecido para consumo. Foram visitadas 20 propriedades leiteiras do Estado de São Paulo, com sistema de ordenha mecânica e tanque de expansão próprio, de onde foram colhidas amostras de leite para a realização da mPCR e cultivo microbiológico. *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* foram isolados, em 30%; 10% e 40% das amostras de leite dos tanques de expansão, respectivamente, e detectados pela mPCR em 0; 10% e 35%, respectivamente. A mPCR apresentou acurácia de 78,3%; sensibilidade de 37,5% e especificidade de 93,2% e limiar de detecção de 100 picogramas. Concluiu-se que a mPCR para a detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* foi padronizada com êxito no presente estudo, e pode ser indicada como método complementar aos utilizados na rotina diagnóstica de mastite bovina e qualidade do leite.

Introdução

A IN n°51 (BRASIL, 2002), em vigor desde julho de 2005, constitui um conjunto de normas técnicas de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite, elaboradas pelo MAPA, de maneira a melhorar a qualidade do leite produzido no País, orientando os diferentes elos da cadeia leiteira. Há demanda por métodos rápidos, com elevada sensibilidade e especificidade, custo acessível e aplicabilidade para o processamento de grande número de amostras de leite (GILLESPIE e OLIVER, 2005) visando à identificação de patógenos e a tomada de ações imediatas para o tratamento e controle de mastite nos rebanhos.

A biologia molecular tem contribuído significativamente na identificação de micro-organismos em amostras compostas ou individuais de leite e também em derivados lácteos, mesmo na presença de interferentes, que dificultam a detecção pelos métodos tradicionais de cultivo microbiológico. Ressalta-se a inibição da multiplicação bacteriana decorrente da presença de resíduos de antimicrobianos, o número reduzido de patógenos na amostra e a contaminação com micro-organismos ambientais (PHUEKTES et al., 2003).

Entre os métodos de diagnóstico molecular, assume destaque a PCR. Esta técnica requer pouco tempo para processamento e os resultados são caracterizados por elevados índices de sensibilidade e especificidade analítica. Pesquisas recentes utilizando diferentes protocolos de diagnóstico molecular para a detecção simultânea dos DNAs de mais de um agente bacteriano de mastite, denominados multiplex PCR, a partir de amostras de leite individuais ou compostas, têm apresentado excelentes resultados, contribuindo inclusive para estudos epidemiológicos e direcionamento de medidas de controle. Nesse contexto, a proposta do presente estudo foi padronizar a técnica de mPCR como método diagnóstico rápido e sensível para a detecção dos três

63 principais patógenos causadores de mastites (*S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*) em amostras de leite
64 coletadas em tanques de expansão, de forma a avaliar esta técnica como possível recurso
65 diagnóstico a ser utilizado em programas de monitoramento da qualidade do leite e controle de
66 mastites.

67

68

Material e Métodos

69

Propriedades

70

71

Foram visitadas 20 propriedades leiteiras de municípios do Estado de São Paulo, Brasil.
Todas as fazendas contavam com sistema de ordenha mecânica e tanque de expansão próprio.

72

73

Amostras

74

75

76

77

78

As amostras de leite do tanque foram obtidas a partir do total de leite produzido por
propriedade no período máximo de 24 horas. De cada tanque de expansão foram colhidos 250 mL de
leite, após adequada homogeneização, e acondicionadas em frascos de vidro estéreis. As mesmas
foram transportadas sob refrigeração (4-8°C), em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, até o
Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites, da FMVZ UNESP/Botucatu-SP.

79

80

Cultivo microbiológico

81

82

83

84

85

86

87

88

89

O cultivo microbiológico foi realizado no Laboratório do NUPEMAS, no DHVSP – FMVZ
UNESP/Botucatu-SP. Todas as amostras de leite foram semeadas nos meios de ágar sangue bovino
(5%) e ágar MacConkey, mantidas a 37°C em aerobiose, por 72 horas. As linhagens de micro-
organismos de origem bacteriana foram identificadas segundo as características morfo-tintoriais,
bioquímicas e de cultivo (QUINN et al., 2005). As amostras de leite obtidas dos tanques de expansão
foram diluídas em solução salina a 10^{-1} e 10^{-2} , para facilitar a visualização das colônias. As amostras
puras (10^0) e suas respectivas diluições foram inoculadas nos meios de ágar sangue e MacConkey,
espalhando-se com alça de Drigalski, e posteriormente incubadas a 37°C em aerobiose, por 72
horas.

90

91

Amostras bacterianas padrão

92

93

94

95

96

97

98

Foram utilizadas linhagens bacterianas padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 11229),
adquiridas da Coleção de Culturas do IAL de São Paulo, Brasil e linhagem padrão de *S. agalactiae*
(ATCC 13813), adquirida no INCQS do Rio de Janeiro, Brasil. Estas linhagens padrão foram
utilizadas como controles positivos nos testes e na determinação da sensibilidade analítica das
provas.

99 **mPCR**

100 Todos os procedimentos referentes ao diagnóstico molecular desse experimento foram
 101 realizados no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico de Zoonoses, DHVSP-
 102 FMVZ/UNESP – Botucatu-SP.

103

104 **Pesquisa dos materiais genômicos de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nas amostras de**
 105 **leite colhidas dos tanques de expansão**

106

107 **Extração de ácidos nucléicos**

108 As amostras de leite, que estavam congeladas, foram mantidas em temperatura ambiente até
 109 atingirem aproximadamente 20°C. A extração do DNA, tanto das amostras de leite, quanto das
 110 linhagens bacterianas de referência, foi realizada utilizando-se o kit comercial *Milk Bacterial DNA*
 111 *Isolation Kit* (Norgen Biotek Corporation, Ontario, Canadá), de acordo com as recomendações do
 112 fabricante.

113

114 **Desenho dos iniciadores**

115 Para identificação molecular de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* foram utilizados os
 116 iniciadores SAU1 e SAU2, SAGA1 e SAGA2, SIP3(F) e SIP4(R), Ecoli1 e Ecoli2, derivados de
 117 seqüências previamente publicadas (CHOTÁR et al., 2006). Os iniciadores amplificam regiões
 118 espécie-específicas do DNA codificadoras das regiões 16S e 23rRNA, baseado nas seqüências do
 119 banco de dados GenBank (Tabela 1).

120

121 TABELA 1. Iniciadores utilizados no estudo para a amplificação do DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e
 122 *E. coli* em amostras de leite bovino, pela técnica de mPCR. Botucatu-SP, 2011.

Cepas	Iniciadores	Seqüências dos iniciadores	Peso molecular do produto (pb)
<i>S. aureus</i>	SAU1	5'-GGA CGA CAT TAG ACG AAT CA -3'	1300
	SAU2	5'-CGG GCA CCT ATT TTC TAT CT -3'	
<i>S. agalactiae</i>	SAGA1	5'-CGT TGG TAG GAG TGG AAA AT - 3'	590
	SAGA2	5'-CTG CTC CGA AGA GAA AGC CT - 3'	
	SIP3(F)	5'-TGA AAA TGC AGG GCT CCA ACC TCA -3'	293
	SIP4(R)	5'-GAT CTG GCA TTG CAT TCC AAG TAT -3'	
<i>E. coli</i>	Ecoli1	5'-GCT TGA CAC TGA ACA TTG AG -3'	660
	Ecoli2	5'-GCA CTT ATC TCT TCC GCA TT -3'	

123 pb: pares de bases

(CHOTÁR et al., 2006)

Amplificação do material genético pela mPCR

Para cada reação, foram utilizados 17,5µL de água miliQ; 2,5µL de tampão de reação (10mM Tris HCl pH 8,0, 50mM KCl); 0,75µL de MgCl₂ (1,5mM); 0,5µL de dNTP (0,2mM); 2,0µL de cada primer (10µM); 0,5µL (0,2 unidades) de *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen - EUA), e 3µL de DNA genômico (10ng). As condições de termociclagem foram: 96°C por 5'; 30 ciclos de 96°C por 1', 55°C por 1'e 72°C por 2'; e último ciclo de 72°C por 8'. Os controles positivos da reação foram cepas de referência (ATCCs), provenientes da FIOCRUZ. Os controles negativos foram água MiliQ.

131

Visualização dos produtos amplificados

A visualização do material amplificado foi avaliada pela corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% adicionado de 1,0µL/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen -EUA). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 1X (89 nM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) com voltagem de 65V. O gel foi visualizado em transluminador de luz UV e a imagem capturada pelo sistema de documentação digital. Foram utilizados 8µL do material amplificado e como marcador de peso molecular 4 µL de 100pb ladder (Invitrogen - EUA). Para todas as amostras foram acrescentados 2 µL do tampão de corrida.

A diferença de peso molecular entre produtos da PCR (*S. agalactiae*: 293 e 590 pb, *E. coli*: 660 pb, *S. aureus*: 1300 pb) facilitou a identificação e distinção entre os DNAs dos micro-organismos-alvo à eletroforese.

143

Teste de sensibilidade analítica da mPCR

Linhas padrão de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* foram utilizadas para a determinação do limiar de detecção dos DNAs-alvo, pela técnica de mPCR. Para tanto, realizou-se o cultivo das amostras bacterianas de referência em ágar sangue a 10%, com incubação de aproximadamente 36 horas. As colônias foram transferidas com auxílio de alça de platina para tubo de vidro contendo solução salina estéril, até ser obtida turvação correspondente ao valor 1,0 da escala de MacFarland. Foram utilizados inóculos individuais de *S. aureus*, *E. coli* e *S. agalactiae* e um inóculo composto pelos três micro-organismos.

Uma alíquota de 1mL de cada solução foi transferida para microtubo livre de DNases e RNases, para a realização da extração de DNA.

As amostras de DNA extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare® - EUA). Para a calibração, foram utilizados 2 µL de água Milli Q estéril (branco) e, para a quantificação, 2 µL do DNA extraído. A partir da leitura em ng/µL, foi feita a diluição com água Milli Q estéril para ajustar a concentração em 1ng/µL. Foram preparados cinco microtubos contendo 90 µL de água Milli Q estéril cada. Da amostra contendo 1 ng/µL, retirou-se 10 µL que foram diluídos em 90 µL de água MiliQ contido no primeiro microtubo. A partir dele foram feitas diluições sucessivas, em base 10, nos demais. Desta forma, obteve-se as concentrações de DNA de 1 ng/µL, 100 pg/µL, 10 pg/µL, 1 pg/µL, 100 fg/µL, 10 fg/µL.

162 As soluções de DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, bem como suas respectivas
163 diluições, foram submetidas à mPCR, individualmente, e em conjunto. Foi considerado como limiar de
164 detecção para cada DNA-alvo a última diluição onde houve visualização de banda (produto de
165 mPCR) à eletroforese.

166

167 **Teste de especificidade analítica da mPCR**

168 Para testar a especificidade dos iniciadores (de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*) frente à
169 presença do material genômico de outras espécies bacterianas comumente encontradas em
170 amostras de leite, foram utilizados os DNAs de linhagens padrão de *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S.*
171 *uberis*, *S. dysgalactiae* e *P. aeruginosa*, adquiridas no INCQS do Rio de Janeiro.

172

173 **Teste de reprodutibilidade da mPCR**

174 A reprodutibilidade dos produtos da mPCR foi testada por meio da análise do DNA de cinco
175 amostras selecionadas ao acaso do total das estudadas, mais os DNAs das linhagens padrão de *S.*
176 *aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, utilizados como controles positivos. Foram realizadas reações de
177 amplificação durante cinco dias consecutivos para a avaliação da reprodutibilidade entre testes.

178

179

180 **Análise dos resultados**

181 A prevalência de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* nos rebanhos estudados foi obtida com
182 base nos resultados de cultivo microbiológico e mPCR.

183 O teste ajustado de χ^2 de McNemar (Phuektes et al., 2001) foi utilizado para o cálculo da
184 acurácia, sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos da técnica de mPCR
185 frente ao cultivo microbiológico. Probabilidades menores que 0,05 foram consideradas significativas.

186

187

187 **Resultados e Discussão**

188 Ressalta-se o freqüente isolamento de micro-organismos não-alvos nas amostras de leite dos
189 tanques de expansão avaliados (Tabela 2), como outras espécies de enterobactérias, *Pseudomonas*
190 sp., etc., embora estes micro-organismos tenham sido isolados com reduzida freqüência nos
191 rebanhos (1,0%). Estes resultados indicam possível contaminação da tubulação do sistema de
192 ordenha e/ou do tanque de expansão por estes agentes, ou ainda utilização de água contaminada na
193 higienização dos equipamentos.

194

195

196 TABELA 2. Frequências (absoluta e relativa) de isolados bacterianos, frente ao total de isolamentos
 197 obtidos a partir de amostras de leite de tanque de expansão de 20 propriedades do Estado de São
 198 Paulo. Botucatu-SP, 2011.

Micro-organismo	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
Outros*	16	28,5
<i>Streptococcus</i> sp.	12	21,4
<i>Staphylococcus</i> sp.	9	16,0
<i>E. coli</i>	8	14,2
<i>S. aureus</i>	6	10,7
<i>S. agalactiae</i>	2	3,5
Leveduriformes	2	3,5
<i>Corynebacterium</i> sp.	1	1,7
TOTAL	56	100

200 *Demais micro-organismos não-alvos, tais como outras espécies de enterobactérias, *Pseudomonas* sp., entre outros.

201
 202 Os estreptococos e estafilococos não-hemolíticos, semelhante ao que ocorreu nos rebanhos,
 203 foram isolados com maior frequência nas amostras de leite dos tanques de expansão, reforçando a
 204 importância destes patógenos bacterianos causadores de mastite contagiosa, que determinam
 205 prejuízos à qualidade final do leite de mistura.

206
 207 TABELA 3. Ocorrência de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* nas 20
 208 amostras de leite de tanques de expansão avaliadas, pelos métodos de cultivo microbiológico e
 209 multiplex PCR (mPCR). Botucatu-SP, 2011.

Micro-organismo	Cultivo microbiológico		mPCR	
	Positivos	Ocorrência (%)	Positivos	Ocorrência (%)
<i>S. aureus</i>	6/20	30	0	0
<i>S. agalactiae</i>	2/20	10	2/20	10
<i>E. coli</i>	8/20	40	7/20	35

211

212

213 TABELA 4. Ocorrência de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* nas
 214 amostras de leite dos rebanhos e dos 20 tanques de expansão avaliados no Estado de São Paulo,
 215 Brasil, e resultados da multiplex PCR para a detecção do DNA destes três patógenos.

Propriedade	<i>S. aureus</i>			<i>S. agalactiae</i>			<i>E. coli</i>		
	MR (%)	MTQ	mPCR TQ	MR (%)	MTQ	mPCR TQ	MR (%)	MTQ	mPCR TQ
1	3,2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2,7	0	0	0	0	0	1,0	1***	0
3	4,5	0	0	3,6	0	0	1,2	1***	1
4	2,8	0	0	0,2	0	0	0	0	0
5	0,5	0	0	0,5	0	1	0	0	1
6	2,7	0	0	0	0	0	0	0	0
7	2,8	0	0	0	0	0	0	0	0
8	2,6	0	0	0,9	1***	0	0	0	0
9	3,1	1***	0	0	0	0	0	0	0
10	24,1	1***	0	0	0	1	2,8	1***	1
11	3,8	0	0	0	0	0	0,4	0	0
12	3,3	0	0	0,3	1**	0	3,3	1***	1
13	3,3	1***	0	0,3	0	0	0	1***	1
14	21,0	1**	0	0	0	0	0	0	0
15	22,5	1**	0	0	0	0	0	1***	0
16	0,6	0	0	0	0	0	0,3	0	0
17	4,6	0	0	0	0	0	2,0	0	0
18	0	0	0	3,7	0	0	0,2	1***	1
19	2,2	1**	0	0,5	0	0	0,5	1*	1
20	4,4	0	0	2,6	0	0	0	0	0

MR= cultivo micrológico amostras de leite do rebanho (prevalência em %)

MTQ= cultivo microbiológico de amostra de leite do tanque de expansão [0: negativo, 1*: isolamento de reduzido número de colônias (1-10 UFC/mL), 1**: isolamento de moderado número de colônias (11-20 UFC/mL), 1*** crescimento de grande número de colônias (>21 UFC/mL)]

mPCR TQ= multiplex PCR de amostra de leite do tanque de expansão (0: negativo, 1: positivo)

216
 217 TABELA 5. Limiares de detecção dos produtos das PCRs individuais e da mPCR para a pesquisa do
 218 DNA de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, utilizando os iniciadores SAU1 e SAU2, SIP3 e SIP4 e
 219 Ecoli1 e Ecoli2, a partir do material genético extraído de cepas de referência.
 220

	SAU1 e SAU2	SAGA1 e SAGA2	SIP3 e SIP4	Ecoli1 e Ecoli2
PCR individual	100pg	100pg	1ng	10pg
mPCR*	100pg	NA	100pg	100pg
mPCR**	100pg	NA	100pg	100pg

221 *cepas de referência separadas

222 **cepas de referência juntas

223 NA: não utilizados, devido aos produtos de mPCR para *S. agalactiae*, utilizando os iniciadores SAGA1 e SAGA2, apresentarem
 224 590pb, muito semelhantes aos produtos para *E. coli* (660pb), o que poderia dificultar a identificação à eletroforese.

225 pg: picograma; ng: nanograma

226 A ausência de resultados positivos para *S. aureus* pela técnica de mPCR (Tabela 3) reforça a
227 questão amplamente divulgada na literatura de que a sensibilidade e especificidade de métodos
228 moleculares para a detecção de agentes bacterianos em amostras de leite estão estreitamente
229 relacionadas, tanto às características dos micro-organismos – como complexidade de parede celular,
230 que podem dificultar a lise durante o processo de extração do DNA (CREMONESI et al., 2006) –
231 como também aos tipos de iniciadores utilizados.

232 Em estudo realizado por Carneiro (2009), foram avaliadas 100 amostras de leite de tanques
233 de expansão de 50 propriedades no Oeste de Santa Catarina, pela técnica de PCR utilizando os
234 iniciadores Sa442-1 e Sa442-2, para a detecção de *S. aureus*. A técnica não apresentou limiares de
235 sensibilidade (53,8%) e especificidade (36,5%) que justifiquem sua utilização como método de
236 detecção do agente em amostras de leite de tanque, quando comparado ao cultivo microbiológico em
237 Baird-Parker (técnica de referência), que identificou 42% de amostras positivas para a presença do
238 micro-organismo.

239 A grande variedade de espécies isoladas nas amostras de leite de mistura, especialmente de
240 enterobactérias, também pode ter interferido na detecção de *S. aureus* pela técnica molecular.
241 Verificou-se ainda que não houve relação entre as frequências de isolamento de *S. aureus*, *S.*
242 *agalactiae* e *E. coli* nas amostras de leite individuais (quartos mamários) com o isolamento destas
243 mesmas espécies nas amostras de leite dos respectivos tanques de expansão, sequer com a
244 detecção do DNA destes patógenos pela mPCR. Estes dados reforçam que a maior concentração de
245 micro-organismos alvo nas amostras individuais não necessariamente implica em melhor detecção
246 dos agentes no leite de mistura, tanto pela técnica de cultivo convencional, quanto por técnicas
247 moleculares. Com efeito, as análises de amostras do leite de mistura constituem métodos
248 diagnósticos complementares ao monitoramento da mastite nos rebanhos, bem como da qualidade
249 do leite, não devendo substituir as análises de amostras individuais obtidas dos quartos mamários.

250 Melhores resultados de sensibilidade para a detecção de *S. aureus* a partir de amostras de
251 leite são verificados quando se realiza a PCR simplex (convencional). Ymagishi et al. (2007)
252 avaliaram 106 amostras de leite colhidas de quartos individuais e do tanque de expansão em um
253 rebanho leiteiro no Japão. *S. aureus* foi detectado em nove amostras pela PCR convencional e
254 somente em três amostras pelo cultivo microbiológico, com limiar de detecção de 1 UFC/mL de leite.
255 Em outro estudo, realizado por Faccioli (2010), foram avaliadas 104 amostras de leite, obtidas de
256 tanques de expansão, pela técnica de PCR para a pesquisa do agente. A técnica apresentou
257 sensibilidade de 99%, com moderada concordância com o cultivo microbiológico, nas amostras
258 positivas, uma vez que o segundo deixou de detectar *S. aureus* em 176 (56,41%) amostras que a
259 PCR detectou. Há que se considerar que cerca de 50% das amostras de leite bovino cultivadas
260 resultam negativas, e que de 10 a 30% dos animais infectados por patógenos bacterianos de mastite
261 apresentam quadro autolimitante. Sendo assim, apesar dos micro-organismos não estarem viáveis,
262 seu material genético pode ser detectado pela PCR, mesmo com resultado negativo ao cultivo.

263 Ainda com relação à detecção de *S. aureus*, vale ressaltar que a lisostafina, uma peptidase
264 produzida por *S. simulans* que cliva uma ligação glicina-glicina de ponte cruzada interpeptídica

265 da parede celular de *S. aureus*, tem sido utilizada em protocolos de extração para facilitar a
266 exposição do DNA do agente, possibilitando sua melhor detecção por diversos métodos de PCR
267 (ZOCHE et al., 2010). No presente estudo, foi utilizado kit comercial para extração do DNA que,
268 apesar de ser específico para liberação do material genômico de bactérias, tanto Gram negativas
269 quanto positivas de amostras de leite, não apresentava lisostafina em sua composição, o que pode
270 ter prejudicado o rendimento final de DNA de *S. aureus*.

271 À exceção de *S. aureus*, quando se compara as ocorrências de *S. agalactiae* e de *E. coli*,
272 pelo cultivo microbiológico e pela mPCR, verifica-se valores muito semelhantes. No caso de *S.*
273 *agalactiae*, a mPCR apresentou elevados valores de especificidade (88%) e acurácia (80%). O
274 mesmo ocorreu para *E. coli*, e a técnica molecular apresentou sensibilidade de 75%, especificidade
275 de 91,7% e acurácia de 85%, além de boa concordância com o cultivo microbiológico. Estes
276 resultados foram semelhantes aos obtidos por Moussa et al. (2010), que padronizaram um protocolo
277 de mPCR para detecção e caracterização de cepas de *E. coli* shiga toxigênicas (ECST) em amostras
278 de leite e fezes de um rebanho bovino leiteiro na Arábia Saudita. A técnica de mPCR sorogrupos-
279 específica detectou o DNA de *E. coli* em todas as amostras que também resultaram positivas ao
280 cultivo bacteriológico. Além disso, quatro cepas (7,98%) O157:H7 e três cepas (5,36%) O111 de
281 amostras de fezes de animais com diarreia, bem como duas amostras (8,33%) O111 de animais
282 assintomáticos, que haviam sido negativas pelo cultivo microbiológico, resultaram positivas pela
283 mPCR. De maneira semelhante, uma amostra negativa ao cultivo foi positiva pela mPCR, no presente
284 estudo, comprovando a boa sensibilidade da técnica molecular para a detecção de *E. coli*.

285 Apesar da acurácia de 78,3% da técnica de mPCR em relação ao cultivo microbiológico, para
286 a detecção simultânea de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, a sensibilidade do método molecular foi
287 baixa (37,5%). Estes resultados são discordantes dos verificados por Phuektes et al. (2001), que
288 utilizaram a mPCR para detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis* em 117
289 amostras de leite de vacas com mastite subclínica. A mPCR foi significativamente mais sensível que
290 o cultivo microbiológico na detecção de *S. aureus* e *S. uberis*, apresentando limiares de detecção,
291 para cada micro-organismo, de 10^4 UFC/mL e 10^3 UFC/mL, respectivamente. No entanto, não houve
292 diferenças significativas entre a mPCR e o cultivo para a detecção de *S. agalactiae* e *S. dysgalactiae*.

293 A especificidade obtida pela mPCR, no presente estudo, foi de 93,2%, considerada muito
294 boa, comparável aos valores obtidos em outros estudos, variando de 96,3% a 100% (GILLESPIE e
295 OLIVER, 2005; MAXWELL et al., 2008; SILVENNOINEN et al., 2010).

296 Verifica-se que não houve diferença entre os limiares de detecção da PCR individual e da
297 mPCR para a detecção do DNA de *S. aureus* (Tabela 5). Estes resultados corroboram os de Riffon et
298 al. (2001), que utilizaram a técnica de mPCR para detecção de *S. aureus* e de mais cinco patógenos
299 bacterianos de mastites, em amostras de leite de quartos mamários. O limiar de detecção foi de $5 \times$
300 10^3 UFC/mL para todos os micro-organismos, tanto pela mPCR, quanto pela PCR individual. Em
301 outro estudo, Cremonesi et al. (2005) analisaram 93 amostras de leite para detecção de *S. aureus* e
302 de 10 genes codificadores de toxinas estafilocócicas. O limiar de detecção, tanto pela PCR individual,
303 quanto pela mPCR, foi de 10 UFC/mL.

304 Para *S. agalactiae*, a mPCR apresentou melhor limiar de detecção do que a PCR individual.
305 Este resultado é discordante daqueles verificados na literatura (PHUEKTES et al., 2001; RAMESH et
306 al., 2002; SILVA et al., 2008). Já no caso de *E. coli*, a PCR individual foi superior à mPCR.

307 É importante ressaltar que, no caso da mPCR, os iniciadores e reagentes utilizados são
308 submetidos a temperaturas consideradas “não-ótimas”, ou seja, geralmente ajustadas para os
309 diferentes pares de iniciadores, distintas das temperaturas “ótimas” programadas nos protocolos de
310 PCR individuais. Este aspecto pode interferir na amplificação dos DNAs-alvo e, conseqüentemente,
311 na sensibilidade da técnica. Sendo assim, recomenda-se que sejam realizados testes de gradientes
312 de temperatura, para otimização do processo e melhores resultados de sensibilidade.

313 No presente estudo, não houve diferença nos limiares de detecção de *S. aureus*, *S.*
314 *agalactiae* e *E. coli* quando se realizou a mPCR com os DNAs extraídos das cepas de referência,
315 analisadas em conjunto ou separadamente. Este dado é importante, pois comprova que não houve
316 interferência de um agente em relação ao outro, mesmo considerando que nas amostras de leite
317 colhidas, as concentrações dos patógenos eram distintas.

318 Após a realização de cinco repetições do ensaio de especificidade da mPCR, utilizando cepas
319 de referência de *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* e *P. aeruginosa*, verificou-
320 se que não houve amplificação de DNA destes micro-organismos não-alvos, comprovando a
321 especificidade para detecção de material genético de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli*, por esta
322 técnica. Estes resultados corroboram os verificados por Riffon et al. (2001), que utilizaram a técnica
323 de mPCR para a detecção de *E. coli*, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* e *S.*
324 *uberis* em amostras de leite inoculadas com cepas padrão de cada micro-organismo, isoladas de
325 casos de mastite, utilizando sete pares de iniciadores espécie-específicos. Neste estudo, não houve
326 amplificações de DNAs não-alvos, como o de *P. aeruginosa*, que foram testados frente aos
327 iniciadores espécie-específicos utilizados.

328 Verificou-se que, após a realização de cinco repetições da técnica de mPCR para amostras
329 de leite aleatórias, os resultados foram idênticos, comprovando a reprodutibilidade do método. Este
330 dado é relevante, uma vez que possibilita a indicação da técnica como recurso diagnóstico
331 complementar para análise de grande número de amostras de leite.

332 Com base nos resultados obtidos na presente pesquisa, ressalta-se o êxito na padronização
333 da técnica de mPCR para a detecção de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* – principais patógenos
334 causadores de mastites e de especial relevância em saúde pública – em amostras de leite de mistura.
335 Destacam-se ainda as contribuições diagnósticas que esta técnica molecular poderá trazer, em
336 complementação aos métodos de rotina, para os programas de monitoramento de mastite e controle
337 da qualidade do leite, estando em linha com a IN no. 51 do MAPA e também com as mais recentes
338 pesquisas realizadas no mundo sobre este aspecto.

339
340

341 **Agradecimentos**

342 À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da
343 bolsa de doutorado (Processo 04125-4) e auxílio à pesquisa (Processo 2008/11362-2).

344

345 **Referências**

346

347 BRASIL. Instrução Normativa 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e
348 qualidade do leite tipo... Diário Oficial da União, Seção I, p.13, 2002.

349

350 CARNEIRO, D.M.V.F. Detecção microbiológica e molecular de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite bovino obtidas de
351 tanques de expansão – correlação com resíduos de antibióticos. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e
352 Zootecnia. Universidade Estadual Paulista. 2009.

353

354 CHOTÁR, M.; VIDOVA, B.; GODANY, A. A development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products
355 by PCR. Folia Microbiol., v.51, n.6, p.639-646, 2006.

356

357 CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; Malferrari, G.; BIUNNO, I.; VIMERCATI, C.; MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA,
358 M. Technical Note: improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. J. of Dairy Sci., v.89,
359 p.163-169, 2006.

360

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

364

365 GILLESPIE, B.E. and OLIVER, S.P. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*
366 *uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction. J. Dairy Sci., v.88, p.3510-3518,
367 2005.

368

369 MAXWELL, M.L.; GILLESPIE, B.E.; OLIVER, S.P. Real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of mastitis
370 pathogens directly from milk. NMC Annual Meeting Proceedings, p. 212-213, 2008.

371

372 MOUSSA, I.M.; ASHGAN, M.H.; ALWATHNANI, H.A.; MOHAMED, KH.F.; AL-DOSS, A.A. Multiplex polymerase chain reaction
373 for detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC). African J. Biotech., v.9, n.28, p.4356-4363, 2010.

374

375 PHUEKTES, P.; MANSELL, P.D.; BROWNING, G.F. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of
376 *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. J. Dairy Sci., v.84, p.1140-1148, 2001.

377

378 PHUEKTES, P.; BROWNING, G.F.; ANDERSON, G.; MANSELL, P.D. Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis
379 screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in
380 bulk milk samples. J. Dairy Res., v.70, p.149-155, 2003.

381

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

384

385 RAMESH, A.; B. P. PADMAPRIYA, A. CHRASHEKAR AND M. C. VARADARAJ Application of a convenient DNA extraction
386 method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. Mol.
387 and Cel. Probes, v.16, n.4, p.307-314, 2002.

- 388
389 RIFFON, R.; SAYASITH, K.; KHALIL, H.; DUBREUIL, P. DROLET, M.; LAGACÉ, J. Development of a rapid and sensitive test
390 for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. J. Clin. Microbiol., v. 39, n.7, p.2584-2589, 2001.
391
392 SILVA, M.A. Utilização de PCR Multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina. Dissertação (Mestrado). Universidade
393 Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. 2008. 32p.
394
395 SILVENNOINEN, M.; HOLOPAINEN, J.; KOSKINEN, M.T. Pathoproof mastitis PCR assay and sensitivity validation of a new
396 test kit for rapid identification of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Mycoplasma bovis* in bovine milk.
397 National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings (2010). Albuquerque, New Mexico. p.240-241.
398
399 YAMAGISHI, N.; JINKAWA, Y.; OMOE, K.; MAKINO, S.; OBOSHI, K. Sensitive test for screening for *Staphylococcus aureus* in
400 bovine mastitis by broth cultivation and PCR. Vet. Rec., v.161, n.11, p.381-383, 2007.
401
402 ZOCCHÉ, F.; BASTOS, C.P.; SILVA, W.P. Detecção de genes do *cluster egc* em *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos
403 de origem animal. Ciência Rural Online, v.40, n.5, 2010.
404

*N*ORMAS PARA

*P*UBLICAÇÃO

Journal of Dairy Research

General

The *Journal of Dairy Research* publishes reports in English on all aspects of dairy science from any country. Material for publication should be sent to the Editor, Dr David Chamberlain, Journal of Dairy Research, Hannah Research Park, Mauchline Road, Ayr, KA6 5HL, UK. Receipt of all material will be acknowledged by email. Submission of a paper will be taken to imply that it reports original unpublished work, that it is not under consideration elsewhere, and that if accepted by the *Journal* it will not be published elsewhere in any language without the consent of the editors. Authors should indicate that they accept the conditions in these Directions to Contributors. Authors of accepted articles will be asked to assign their copyright, under certain conditions, to the *Journal* to help protect their material.

Submission of papers

Authors may submit the full paper in electronic form, or three printed copies of the manuscript may be sent. A single copy will be accepted from outside Europe. An electronic version of the summary should be included as a Word file suitable for distribution to potential referees. **Electronic submission** may be on disc or as an e-mail attachment (jdr@hannahresearch.org.uk). The format should be as a Word document (for the PC not MAC). Authors of accepted papers are required to supply a copy of the final version as a Word document.

Submitted manuscripts must be concise and limited in length to a maximum of 6000 words, including an allowance of 250 words per fig or Table. This is approximately the equivalent of a Word document of 18 A4 pages of double-spaced 12pt Times New Roman font.

Layout of papers

Papers should be presented with wide margins on one side of A4 or similar paper. Each page should be numbered in sequence, preferably with line numbering. Text should be double spaced throughout, including References, Figure Legends and Table headings and footnotes.

Papers should be written in English and should as far as possible be comprehensible to the non-specialist reader. They should be concise, but without omitting necessary material, and contain sufficient detail to allow repetition of the work. Spelling should be that of the *Concise Oxford Dictionary*, Oxford: Clarendon Press. Exceptions will be indicated during technical editing. Do not hyphenate words at the end of a line unless a hyphen is to appear in the printed text.

Authors should consult a recent issue of the *Journal of Dairy Research* to familiarize themselves with *Journal* conventions and layout. Attention to these and other details will speed publication.

The paper should generally be divided as follows. (a) **Cover sheet** should give the title of the article, names of the authors each with one forename, together with their affiliations in any non-Cyrillic European language, a shortened version of the title of not more than 45 letters and spaces suitable as a heading, and the name and address of the author to whom correspondence and proofs should be sent. (b) A **Summary**, preferably not more than 300 words, should encapsulate the whole paper, showing clearly

the new knowledge acquired. Individual results are rarely necessary. (c) The **Introduction**, which should not have a heading, should not contain a full review of the literature, but should help the non-specialist to understand why the subject of enquiry is interesting or important, and why the authors have chosen the approach described. (d) The **Materials and Methods** section should contain adequate descriptions of procedures or appropriate references; sources of all materials (including address, with postal code) and sources or strains of animals and microorganisms should be indicated. (e) **Results** should be as concise as possible, without repetition or inclusion of irrelevant material. Tables and illustrations should be used efficiently. (f) The **Discussion** should not repeat the results but discuss their significance. Refer to existing or accepted knowledge in the present tense and the authors' work in the past tense; the difference in tense should clearly show the authors' contribution. A separate conclusion is not necessary but authors should summarize their main conclusions briefly. **Acknowledgements** of financial support, technical assistance and so on are given in a separate paragraph without heading. It is the responsibility of the authors to ensure that individuals or organizations acknowledged as providing materials or otherwise are willing to be identified. (g) **References**. For some types of paper, other divisions may be preferable.

Reviews of dairy science

These are normally invited, but the editors are always interested to receive suggestions for topics, with or without possible authors.

References

References should be given in the text as Brown & Jones (1987) or (Schmidt, 1985; Nakamura *et al.* 1989); the first author with *et al.* is used for papers with three or more authors. Where necessary, papers are distinguished as Lenoir (1988a), (Litov *et al.* 1990a, b). When several references appear together in the text, cite them in chronological order, and alphabetically within years. The Reference list at the end of the paper, which should begin on a fresh page, is given in strict alphabetical order. Each reference should contain authors' names, with initials (in capitals), the year, the title of the paper, the name of the journal in full, the volume and the page range. Titles of articles originally published in another language should be given in English translation, and this indicated by the use of square brackets. References to books should include the town of publication and the publisher, with editor(s) and volume and edition number where appropriate. Authors should refer to the most recent issue for the format of references. (Note that the Journal uses the minimum of punctuation.) Unpublished work should be given in the text (use authors' initials and surname) and not in the Reference list. Authors are reminded that they are responsible for checking references.

Units

SI and metric units should be used whenever possible (see Quantities, Units, Conversion Factors and Nomenclature in Nutritional and Food Sciences, 1971 London: The Royal Society and Specification for SI units and recommendations for the use of their multiples and of certain other units, London: British Standards Institution publication BS 5555). Note that cm, 100 g and 100 ml do not form the basis of SI units. However, for the present solutions should be given in terms of molarity (M) rather than mol/l, e.g. 0.5 M-H₂SO₄. Give compositions based on mass or volume as (e.g.) mg/l or mg/kg and not percentage. Normality should not be used. Buffers should be given clearly, e.g. 30 mM-Tris--50mM-boric acid buffer, pH 8.

Microorganisms

The organism should be described unambiguously, with genus, species and subspecies (if any) in italic and strain number or source in roman. Usage should conform to current international rules. Shortened forms or synonyms may be used after the first mention if desired.

Chemical formulae

These should be unambiguous. It is permissible but not required to use symbols for inorganic formulae.

Enzymes

The recommendations of the International Union of Biochemistry (*Enzyme Nomenclature*, 1984, London: Academic Press) should be followed, and the EC number given where known.

Tables

Tables should be numbered and carry headings enabling them to be understood without reference to the text. Any abbreviations should be defined. Each Table should be typed on a separate sheet and not included in the text, but their approximate position should be indicated by a marginal mark: e.g. Table 1 near here. Symbols for footnotes should be in the order, †, ‡, §, ¶, ††. The use of *, **, etc, should be limited to indicating levels of significance.

Illustrations

Printed originals of figures and photographs should be provided as best possible quality. Figures such as graphs must be supplied in an editable file format, such as Excel. The use of histograms and bar graphs should be restricted, as the information can often be better presented in a table. In the presentation of results, curves or lines should not extend beyond the experimental points, which should be indicated by symbols, used in order: ○, ●, □, ▲, ◻, ■, ×, +. Scale marks should be on the inside of the axes. Each Figure should be provided with a legend such that with the Figure it is comprehensible without reference to the text. Figure legends should be typed on a separate sheet or sheets, beginning Fig. 1.

Photographs should be glossy black and white prints accompanied by a legend as above. Since the size is almost sure to be altered in printing, scale bars on the photograph should be used, not magnifications in the legend. Only one copy of each illustration is required, but authors should ensure that photocopies provided with the other copies of the paper are of adequate quality to allow referees to judge their value. Colour plates can be included but these will normally result in a charge to the authors.

Other nomenclature, symbols, abbreviations and conventions

Authors should consult a current issue for guidance. Useful information on biochemical nomenclature and permitted acronyms can be found in *Biochemical Journal* **169**, 11-14 and on nutrient nomenclature in the *British Journal of Nutrition*. If authors use other abbreviations or acronyms, they should be defined at first mention, and their number restricted to ensure that the text is readable. Always use Arabic numerals with units; otherwise use words for 1-10 and figures for more than 10, (e.g. 3 weeks, three cows, 34 sheep) but avoid mixed lists. Time should be given by the 24 h clock, e.g. 14.15, without h or hours.

Statistical treatment

Authors should, where possible, discuss their work with a statistician at an early stage and give attention to sample size. Individual results should not normally be given. The methods of statistical analysis should be clearly described; a suitable reference is adequate. Authors should make it clear whether they are quoting SED, SEM, SD, SE and so on. Any statement that two groups of values are different should be supported by the level of significance involved, as a single or range of *P* value: ($P=0.008$) or ($P < 0.01$). Differences should not be claimed or implied if $P > 0.05$.

Ethics of experiments

Authors are expected to adhere to the relevant codes covering human subjects and the use of animals (*British Medical Journal* (1964) **ii**, 177-178; *Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations* 1987 London: The Biological Council).

Revision of papers

If a paper is returned to authors for possible amendment or revision, a period of 6 months will normally be allowed. The editors are ready to consider a revised or rewritten paper at any time, but after 6 months it will be considered a new paper and given a new submission date.

Proofs

Authors will be advised when to expect proofs, which should be returned without delay to the appropriate editor. Proofs are sent for the correction of any printer's or editorial errors, not for addition of new material or revision of the text. Excessive alteration may have to be disallowed or made at the authors' expense, and may delay publication. Order forms for offprints are sent with proofs and should be returned directly to The University Press, Cambridge.
(Revised 12/10/07)