

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES E MULTIRRESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
ISOLADOS DA HIGIENIZAÇÃO DE AMBIENTE DE ORDENHA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniela de Avila Silva Bohrz

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES E MULTIRRESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DA
HIGIENIZAÇÃO DE AMBIENTE DE ORDENHA**

Daniela de Avila Silva Bohrz

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Bioexperimentação** – Área de concentração em Higiene, inspeção, microbiologia e composição química de alimentos.

Orientadora: Prof^a Laura Beatriz Rodrigues

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES E MULTIRRESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLADOS DA HIGIENIZAÇÃO DE AMBIENTE DE
ORDENHA**

Elaborada por
Daniela de Avila Silva Bohrz

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Bioexperimentação

Comissão Examinadora

**Laura Beatriz Rodrigues, Dra., UPF
(Orientadora/Presidente)**

Luciana Ruschel dos Santos, Dra., UPF

Andrea Troller Pinto, Dra., UFRGS

**Passo Fundo, RS, Brasil
2015**

CIP – Catalogação na Publicação

B676f Bohrz, Daniela de Avila Silva
Formação de biofilmes e multirresistência a
antimicrobianos de staphylococcus aureus isolados da
higienização de ambiente de ordenha / Daniela de Avila Silva
Bohrz. – 2015.
84 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Laura Beatriz Rodrigues.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2015.

1. Leite – Higiene. 2. Leite – Produção. 3. Leite –
Qualidade. I. Rodrigues, Laura Beatriz, orientadora. II. Título.

CDU: 637.1

Catalogação: Bibliotecária Angela Saadi Machado - CRB 10/1857

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me guiar sempre e ter me concedido o dom de amar os animais e escolher a Medicina Veterinária como profissão.

Agradecimento especial ao meu companheiro, esposo Jeferson, que sempre me apoiou, frente ao cansaço, momentos de estresse, choro, crises de gastrite nervosa, mas sabia que, no final, eu conseguiria; e à minha filha, amada Joana, que me dá ânimo para buscar o melhor, sempre.

Aos meus familiares, em especial, mãe e vó, sem dúvida, tornam minha vida mais fácil.

Agradeço à minha sogra, que sempre me apoiou. Lamento não estar mais aqui, fisicamente, para comemarmos essa conquista.

À minha orientadora, Laura, escreveria capítulos sobre como aprendi a respeitá-la e admirá-la, não apenas como Dra., microbiologista e professora, mas como ser humano, como amiga. Obrigada.

Aos amigos, colegas de mestrado, estagiários e funcionários do laboratório, todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para que eu pudesse concluir esse importante trabalho.

Às minhas colegas de trabalho de Quinze de Novembro, que “seguraram as pontas” na minha ausência.

A realização desse trabalho somente foi possível com o apoio financeiro da CAPES/PROSUP/ UPF pela concessão da bolsa de estudos.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus amores: Joana, minha filha, e Jeferson, meu esposo.

EPÍGRAFE

“Era uma vez duas pulguinhas que passaram a vida inteira economizando e compraram um cachorro só pra elas...”.

(Mario Quintana)

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.2 A CADEIA LEITEIRA.....	17
2.2 CONTAMINANTES MICROBIANOS DO LEITE.....	18
2.3 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	20
2.3.1 Fatores de virulência de <i>S. aureus</i>	23
2.3.1.1 Resistência a antimicrobianos.....	25
2.3.1.2 Formação de biofilmes.....	28
2.4 HIGIENIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES NA PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA.....	30
3. CAPÍTULO 1. Quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i> e bactérias mesófilas aeróbias no processo de higienização de equipamentos de ordenha.....	35
RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MATERIAL E MÉTODOS.....	39
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
4. CAPÍTULO 2. Multirresistência antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> formadores de biofilme isolados de ambiente de ordenha.....	52
RESUMO.....	53
INTRODUÇÃO.....	54
MATERIAL E MÉTODOS.....	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	66
5. CONCLUSÕES	74
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
7. REFERÊNCIAS	77

LISTA DE FIGURAS**3. CAPÍTULO 1**

FIGURA 1. Pontos de coleta para a quantificação de bactérias mesófilas aeróbias e <i>Staphylococcus aureus</i>	50
--	----

LISTA DE TABELAS**3. CAPÍTULO 1**

TABELA 1. Contagem de bactérias mesófilas aeróbias e <i>Staphylococcus aureus</i> em teteiras e água do CIP em sala de ordenha mecanizada. Média das repetições.....	49
--	----

4. CAPÍTULO 2

TABELA 1. Distribuição do padrão de resistência e Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA) de 15 isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> oriundos de diferentes pontos do fluxograma da obtenção do leite cru.....	72
TABELA 2. Formação de biofilmes, perfil de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de diferentes pontos em sala de ordenha mecanizada.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

BAP	Proteínas associadas a biofilme
Cm	Centímetro
°C	Graus Celsius
Cl ₂	Cloro ativo
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
CE	Comunidade Européia
CIP	<i>Clean-in-Place</i>
CPP	Contagem padrão em placa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EES	Enterotoxinas estafilocócicas
EPS	Matriz de substâncias poliméricas extracelulares
FAO	Food and Agriculture Organization
FnBPs	Proteínas de ligação fibronectina
G	grama
IN	Instrução Normativa
µL	Microlitros
ml	Mililitros
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
MIC	Corrosão Microbiologicamente Influenciada
MRSA	<i>S. aureus</i> meticilina-resistente
OMC	Organização Mundial da Saúde
ORSA	<i>S. aureus</i> oxacilina-resistentes
pH	Potencial de hidrogênio
PIA	Polissacarídeos de adesão celular
PNMQL	Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SasG	Proteína G de superfície <i>S. aureus</i>
Spa	Proteína estafilococócica A
UFC	Unidade formadora de colônia
UPF	Universidade de Passo Fundo
VRSA	<i>S. aureus</i> vancomicina-resistentes

RESUMO

**Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

FORMAÇÃO DE BIOFILMES E MULTIRRESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DA HIGIENIZAÇÃO DE AMBIENTE DE ORDENHA

Autora: Daniela de Avila Silva Bohrz
Orientadora: Laura Beatriz Rodrigues
Passo Fundo, 09 de Setembro de 2015

O leite é um alimento de excelente valor nutricional e devido a sua composição constitui-se em substrato para a multiplicação de microrganismos, portanto uma carga microbiana elevada no momento da ordenha resultará em um produto final de baixa qualidade. A contaminação por microrganismos patogênicos e deteriorantes configura-se como um problema de saúde pública, além de causar prejuízos à indústria de laticínios. A presença de *Staphylococcus aureus* e de bactérias mesófilas aeróbias está entre os problemas mais comuns dentro das propriedades leiteiras devido, principalmente, à incidência de mastite bovina e às falhas nos processos de higienização de equipamentos de ordenha, podendo resultar na formação do biofilme. A patogenicidade dos *Staphylococcus* está associada aos mecanismos de adesão da bactéria, indicados como importantes fatores de virulência, como a formação de biofilmes e a resistência bacteriana. O presente estudo quantificou bactérias mesófilas aeróbias e *S. aureus* em teteiras, água do enxague dos equipamentos do sistema de limpeza *Clean-in-Place* (CIP), leite de conjunto e tanque de refrigeração em diferentes momentos, antes e após as ordenhas, avaliando o processo de detergentização e sanitização. Em relação à quantificação, houve redução nos níveis de *S. aureus* e bactérias mesófilas aeróbias nas teteiras, porém não houve diferença estatística em nenhum processo de higienização. Na água do CIP houve diferença significativa, com redução de 3,81 log¹⁰ das bactérias mesófilas aeróbias com o uso da detergentização 1 (D1) após a ordenha 1 (O1). A carga bacteriana após a detergentização 2 (D2) da ordenha 2 (O2), comparada com a obtida após o uso do sanitizante 2 (S2), 8 horas após a detergentização, demonstrou queda significativa (P=0,030), reduzindo 4,51 log¹⁰. Para *S. aureus* a detergentização D1 e D2 e a sanitização S2 diminuíram a contagem bacteriana em relação ao detectado após ordenha, porém não houve diferença estatística (P>0,05). O valor médio do leite de conjunto foi de 3,04 log¹⁰UFC.mL⁻¹ e 3,11 log¹⁰UFC.mL⁻¹ para *S. aureus* nas ordenhas 1 e 2. Não houve diferença significativa para bactérias mesófilas aeróbias e *S. aureus* entre os resultados antes e após a higienização do tanque de refrigeração. Foram selecionadas 15 cepas de *S. aureus* isoladas do ambiente de ordenha para realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos, capacidade de formação de biofilmes e outros fatores de virulência. Todas as amostras apresentaram perfil de multirresistência, com duas cepas resistentes a 100% dos fármacos, e as demais resistentes a pelo menos seis princípios ativos. Destas, 100% foram resistentes a penicilina G, 93,34 % resistentes a oxacilina, cefalexina, tetraciclina, cloranfenicol, amoxicilina + ácido clavulônico e sulfazotrim; 73,33% resistentes a doxiciclina e 80% gentamicina; 53,34% resistentes a ceftiofur, 33,34 % a neomicina. Os Índices de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA) variaram de 0,5 a 1,0. Quanto à formação de biofilmes em diferentes temperaturas de incubação (3°C, 9°C, 25°C, 36°C e 42°C), formaram biofilmes em pelo menos três temperaturas avaliadas, incluindo as

temperaturas de refrigeração. Nos demais fatores de virulência, 13 (86,7%) formaram cápsula, 9 (60%) demonstraram presença de protease, 4 (26,7%) expressaram o fator α -hemolisina e 2 (13,3%) β -hemolisina.

Palavras-chave: leite, ordenha, higienização, *Staphylococcus aureus*, biofilmes, resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

**BIOFILM FORMATION AND ANTIMICROBIAL MULTIDRUG RESISTANCE
OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM MILKING
HYGIENIZATION ENVIRONMENT**

Author: Daniela de Avila Silva Bohrz

Advisor: Laura Beatriz Rodrigues

Passo Fundo, 09 de Setembro de 2015

Milk is an excellent nutritional value food and because its composition is substrate for microorganisms multiplication, therefore a high microbial load at milking time will result in low quality final product. Pathogenic and spoilage microorganisms contamination appears as a public health problem, in addition of causing injury to dairy industry. Presence of *Staphylococcus aureus* and aerobic mesophilic bacteria are one of the most common problems in dairy farms, mainly because of bovine mastitis incidence and fails of cleaning processes of milking equipment, which can result in biofilm formation. *Staphylococcus* pathogenicity is associated with bacterial adhesion mechanisms, indicated as important virulence factors, such as biofilms formation and bacterial resistance. This study quantified aerobic mesophilic bacteria and *S. aureus* in liner, water from cleaning equipment system *Clean-in-Place* (CIP), and milk cooling tank at different times, before and after milking, evaluating the detergency and sanitizing process. On quantification, there was a reduction in levels of *S. aureus* and aerobic mesophilic bacteria in liners, but there was no statistical difference in any cleaning process. In CIP water was significant differences, with $3.81 \log^{10}$ reduction of aerobic mesophilic bacteria when using detergency 1 (D1) after milking 1 (O1). Bacterial load after detergency 2 (D2) of milking 2 (O2) when compared with what was obtained after the use of sanitizer 2 (S2), 8 hours after detergency, showed significant drop ($P = 0.030$), reducing $4.51 \log^{10}$. For *S. aureus*, detergency D1 and D2 and sanitization S2 diminished bacterial count in relation to detected after milking, however there was no statistical difference ($P > 0.05$). *S. aureus* average value of set milk was $3.04 \log^{10} \text{UFC.mL}^{-1}$ and $3.11 \log^{10} \text{UFC.mL}^{-1}$ for milking 1 and 2. There was no significant difference for aerobic mesophilic bacteria and *S. aureus* among the results before and after milk cooling tank cleaning. Fifteen *S. aureus* strains isolated from milking environment were selected in order to test antimicrobial sensitivity, biofilm formation capacity and other virulence factors. All samples showed multidrug resistance profile, with two 100% resistant strains to the drugs, and the others were resistant to at least six active principles. From these, 100% were penicillin G resistant, 93,34% resistant to oxacillin, tetracycline, chloramphenicol, cephalexin, amoxicillin + clavulonic acid and sulfazotrim; 73,33% resistant to doxycycline and 80% to gentamicin; 53,34% resistant to ceftiofur and 33,34% to neomycin. Multiple antimicrobials resistance indexing (IRMA) ranged from 0,5 to 1,0. For biofilm formation in different incubation temperatures (3°C, 9°C, 25°C, 36°C and 42°C), biofilms were formed on at least three evaluated temperatures, including refrigeration temperatures. On other virulence factors, 13 (86,7%) formed capsule, 9 (60%) have shown the protease presence, 4 (26,7%) expressed the α -hemolysin factor and 2 (13,3%) β -hemolysin.

Key-words: milk, milking, cleaning, *Staphylococcus aureus*, biofilms, antimicrobial resistance.

1. INTRODUÇÃO

A produção leiteira desempenha um relevante papel social, tendo importância para o agronegócio, com geração de empregos e renda para centenas de produtores, no entanto, mesmo o Brasil ocupando posição de destaque quando observados os índices de produção da pecuária leiteira mundial, ainda possui problemas relacionados à qualidade de produto e falta de profissionalização do setor. Como um país, em sua essencialidade, promotor da atividade agropecuária, fiscaliza as etapas de processamento do leite por meio de órgãos competentes, bem como enfermidades que acometam desde os animais até os consumidores, decorrentes de qualquer irregularidade de manejo e higiene(1).

Os agentes patogênicos podem estar presentes no leite e causarem graves problemas à saúde humana e, além de, terem reflexo econômico(2). Já a presença de agentes deteriorantes está relacionada a vida útil dos produtos lácteos, ao desenvolvimento de sabores indesejáveis no produto e a diminuição no rendimento industrial.

Contagens altas de bactérias mesófilas aeróbias indicam uma matéria-prima excessivamente contaminada, decorrente da limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção, e condições inapropriadas de tempo e temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos (3).

Staphylococcus aureus é um microrganismo presente na maioria dos animais domésticos, no leite cru, pele e úbere dos animais, equipamentos e ambiente de ordenha, e é estudado como importante causa de gastroenterite alimentar, devido a produção de uma ou mais enterotoxinas(4). O leite proveniente de animais com mastite estafilocócica também serve como veiculador do patógeno, sendo a infecção mais recorrente de rebanhos leiteiros no mundo e a mais difícil de erradicar.

A presença de genes de resistência e a pressão seletiva pelo uso constante de antimicrobianos na produção animal são fatores importantes ao aumento da resistência a antimicrobianos, trazendo consequências a humanos e animais. *S. aureus* tem a capacidade de produzir um grande número de fatores de virulência e acredita-se que estas características possam ser responsáveis pela capacidade de adaptação desse microrganismo aos diferentes nichos do organismo, contribuindo para que a bactéria invada as defesas fagocíticas do hospedeiro, facilitando sua aderência às células epiteliais e à colonização no tecido, favorecendo a sua persistência extracelular e garantindo assim êxito em sua instalação e manutenção nos tecidos do hospedeiro(5). Entre estes fatores

está a produção de um mucopolissacarídeo extracelular (“*slime*”), que parece ajudar na aderência e colonização do microrganismo ao epitélio glandular mamário. A habilidade dos *S. aureus* aderirem à superfície do epitélio tem sido associado à produção de biofilmes, que consiste na multiplicação de bactérias, fungos ou protozoários, de modo isolado ou em combinação, ligados por uma substância polimérica extracelular, presa a sólidos ou superfícies sólidas. Nesse microambiente são formadas microcolônias e canais de água utilizados para o transporte de nutrientes e produtos tóxicos(6).

Diversos fatores são responsáveis pela perda da qualidade microbiológica do leite, com destaque à ineficiência da higienização de utensílios e equipamentos, como os equipamentos de ordenha mecânica, latões e tanques de expansão(7). Para a higienização de equipamentos na indústria de laticínios e nas propriedades leiteiras pelo sistema *Clean in Place* (CIP), a limpeza e sanitização de tubulações ocorrem em circuito fechado, automatizado, sem desmontagem, utilizando produtos para a detergência e sanitização. Embora os detergentes diminuam a carga bacteriana das superfícies, o objetivo principal do seu uso é a remoção de resíduos orgânicos e minerais. A sanitização, que é a última etapa do procedimento de higienização, visa reduzir os microrganismos até níveis seguros, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária.

A presente dissertação é composta por esta introdução, revisão de literatura e dois artigos científicos. O Capítulo 1 “Quantificação de *Staphylococcus aureus* e bactérias mesófilas aeróbias no processo de higienização de equipamentos de ordenha” teve como objetivos quantificar *S. aureus* e bactérias mesófilas aeróbias em ambiente de ordenha e verificar a eficácia do processo de detergência e sanitização de equipamentos, foi submetido para a revista Ciência Rural. O Capítulo 2 “Multirresistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilme isolados de ambiente de ordenha” avaliou a resistência antimicrobiana, fatores de virulência e capacidade formação de biofilmes de 15 cepas de *S. aureus* isoladas do processo de ordenha.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CADEIA LEITEIRA

O mercado do leite atravessa um período de mudanças, uma vez que a remuneração deste produto pela indústria passa a ser realizada de acordo com as exigências referentes à qualidade do leite previstas nas novas legislações(8), afetando tanto o produtor quanto a indústria.

Em 2014, houve grande volatilidade no mercado mundial, com forte alta no início do ano, seguida de queda consistente até início de 2015. A produção de leite em 2015, no Brasil, deve aumentar em torno de 3% a 5% em relação a 2014(9).

O aumento na produção de leite foi notável em praticamente todas as regiões produtoras no mundo entre 2013 e 2014, respondendo à crescente demanda internacional. Na Oceania, o maior crescimento foi verificado na Nova Zelândia com 9%. A Austrália cresceu em cerca de 2%. No Mercosul, Argentina reduziu sua produção em 4,3% enquanto o Uruguai teve crescimento um pouco abaixo de 1%. A Europa (28 países membros) teve crescimento de 4,5%, um ganho substancial para o bloco Europeu cuja produção é de 140 bilhões de litros anuais. Os Estados Unidos tiveram aumento de 2,4% na produção. O Brasil, com um dos maiores ganhos de produção no mundo, teve aumento de mais que 7%, algumas indústrias apontam até 12% de aumento na captação, nos últimos dois anos, pois tem uma dinâmica distinta de outros mercados, possui um grande mercado interno e também grande produção de leite. As exportações brasileiras são, em geral, pouco competitivas, dependendo da situação do mercado externo(10).

O Brasil, em 2013, foi o quarto maior produtor de leite no mundo, estando atrás apenas dos Estados Unidos, Índia e China(11). Em 2011, a produção brasileira atingiu 32,1 bilhões de litros de leite fluido, sendo que 33% desse volume se trataram de leite não inspecionado (12).

Segundo o levantamento do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o consumo per capita anual brasileiro é de 172,6 litros por habitante, enquanto o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é de 200 litros ano/habitante(13).

A preocupação, no Brasil, com a qualidade dos alimentos de origem animal, como o leite e seus derivados, tomou forma de lei em 29 de março de 1952, com a aprovação do Decreto nº 30.691, sancionando o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de

Produtos de Origem Animal (RIISPOA), em vigor até os dias atuais. Esse regulamento sofreu algumas alterações no decorrer dos anos, sendo as mais importantes introduzidas em função da adesão do Brasil ao Tratado de Assunção, que criou o Mercado Comum do Sul – MERCOSUL(14).

Em setembro de 2002, foi emitida a Instrução Normativa nº 51 (IN 51), aprovando os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel(15). O Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL), a partir dos regulamentos técnicos estabelecidos na IN 51, representou o início do processo de melhoria da qualidade do leite brasileiro. Mudanças significativas ocorreram quanto ao modo de produção, refrigeração e transporte(16), pois tornou obrigatório a Contagem de Células Somáticas (CCS) e a Contagem Padrão em Placas (CPP) no leite cru, regulamentou a coleta a granel e estabeleceu prazos para tais modificações nas diferentes regiões do país(17). A atual IN 62(8) alterou os limites máximos de CCS e CPP para o leite cru refrigerado a valores inferiores em relação ao sugerido pela antiga instrução(16).

Para atender as exigências sobre os padrões mínimos de qualidade da legislação brasileira, os produtores vêm investindo em tecnologias, como ordenha mecânica, treinamento de mão de obra, limpeza adequada de equipamentos e ambiente. Dentro desta busca por melhorias, o armazenamento e o transporte do leite constituem fatores de importância para manutenção da qualidade(18).

2.2 CONTAMINANTES MICROBIANOS DO LEITE

Sob boas condições de manuseio e conservação, a microbiota do leite é predominantemente Gram positiva. Quando mantido sob temperaturas de refrigeração por muito tempo pode apresentar, principalmente, bactérias dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Oerskovia*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Listeria*, assim como alguns representantes dos gêneros dos coliformes(4).

As bactérias mesófilas aeróbias são constituídas, principalmente, por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, e também *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, entre outros(19). Contagens altas indicam uma matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção, e

condições inapropriadas de tempo e temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos(3).

Os microrganismos patogênicos apresentam grande importância, por possuírem relevância como causadores de doenças veiculadas por alimentos e, conseqüentemente, terem reflexo econômico. O processo de pasteurização elimina essas bactérias, com exceção de linhagens termodúricas, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e bactérias esporuladas do gênero *Bacillus* e *Clostridium*(2).

Dentre os microrganismos psicotróficos, espécies dos gêneros *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. são frequentemente isolados de amostras de leite cru refrigerado por estarem disseminadas no ambiente. Estas se destacam pela produção de enzimas extracelulares termoestáveis, principalmente proteases e lipases, as quais contribuem significativamente para a redução da qualidade do leite e produtos lácteos, mesmo após a aplicação de tratamentos térmicos(20).

A mastite é um dos principais problemas da pecuária leiteira, pois provoca redução na produção, alteração da composição do leite, aumento na contagem das células somáticas, descarte prematuro dos animais acometidos e prejuízos econômicos aos produtores rurais e à indústria de laticínios(21).

Dentre as diversas bactérias causadoras de mastite bovina, o *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, espécies de *Mycoplasma* e *Corynebacterium bovis* são consideradas extremamente contagiosas, e entre essas o *S. aureus* é o mais frequentemente isolado como patógeno em mastites clínicas e subclínicas ao redor do mundo(22). Os microrganismos contagiosos estão adaptados a sobreviver no organismo do hospedeiro(23).

Além dos microrganismos já mencionados, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, enterobactérias não coliformes, leveduras, *Enterococcus* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* são os principais agentes causadores da mastite ambiental(24), e atuam como invasores oportunistas da glândula mamária. Não são adaptados a sobreviver no organismo do hospedeiro, ficando preferencialmente no habitat da vaca, em locais que apresentam acúmulo de fezes, urina, barro e camas orgânicas. A pesquisa destes microrganismos, incluindo *E. coli*, indica as condições higiênicas e sanitárias do processo de obtenção e armazenamento do leite(25).

Quanto aos isolamentos das bactérias do gênero *Streptococcus*, destaca-se *S. agalactiae* que é um organismo altamente contagioso, capaz de causar fibrose e abscessos

na glândula mamária, além de elevar muito a CCS. Sua presença preocupa também pelo aspecto da saúde pública, pois é causa importante de meningites e septicemia neonatal(26). A presença de *S. agalactiae* no leite de conjunto é indicativo de mastite causada por esse patógeno, já que sua sobrevivência está associada ao tecido infectado. Já *S. dysgalactiae* se comporta de forma semelhante ao *S. agalactiae* na forma pela qual se dissemina em um rebanho(27) e, quando isolado de amostras de leite, especialmente de tanque resfriador, pode ser oriundo de outras fontes ambientais, como o solo e pelagem dos animais(2). O *S. uberis* encontra-se em todo ambiente de ordenha, devido à contaminação fecal das vacas que abrigam o organismo no rúmen. Este microrganismo torna-se um patógeno importante quando o úbere saudável entra em contato com ambientes contaminados(28). No tanque resfriador, junto de diversas outras espécies bacterianas, *S. uberis* não prevalece, pois não é um bom competidor(29). Desta forma, elevados níveis de *S. uberis* em leite com bom resfriamento são indicadores de problemas de mastite no rebanho. *S. bovis* é um agente que coloniza o trato gastrointestinal de ruminantes e também de humanos(30) e está no ambiente.

2.3 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

O gênero *Staphylococcus* possui 47 espécies e 23 subespécies, pode ser dividido em dois grandes grupos, com base na capacidade de produção da enzima coagulase, em staphylococci coagulase-positivo e staphylococci coagulase-negativo(31), as espécies coagulase positivas apresentam maior importância clínica devido aos seus fatores de patogenicidade. O *S. aureus* no homem ou animal sadio é considerado um microrganismo comensal das narinas, pele úmida, boca e intestino. Porém, estes microrganismos apresentam propriedades que lhes permitem uma rápida colonização e posterior invasão através de pequenas lesões na pele e mucosas, sendo que nas mastites as mãos dos ordenhadores são consideradas como principais vias de transmissão(32).

A maioria dos animais domésticos e o ser humano abrigam o *S. aureus*, que pertencem à família Micrococcaceae, são cocos Gram positivos, catalase positiva e oxidase negativa, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, coagulase positiva, formadores de grandes colônias em ágar sangue com pigmentação característica e produtores de hemólise(33).

O *S. aureus* é estudado como causa de gastroenterite alimentar, causada pela ingestão de alimentos que contenham uma ou mais de suas enterotoxinas(4). Segundo

Tirado e Schimidt(34), em se tratando do cenário epidemiológico mundial, estes microrganismos são considerados um dos mais relevantes causadores de doenças transmitidas por alimentos. As cepas patogênicas são preocupantes, devido a produção de enterotoxinas, favorecidas pelo número de microrganismos presentes em condições adequadas (10^5 a 10^7 UFC/g ou mL, sob temperatura de 37°C) no leite e derivados. O *S. aureus* é termolábil, mas sua toxina é termorresistente. Se houver condições de produção desta enterotoxina, esta não será destruída mesmo que o leite seja submetido a posterior processo de pasteurização(35). De acordo com Oulahal et al.(36), o *S. aureus*, embora seja um microrganismo mesofílico, ou seja, com temperatura ótima de desenvolvimento em torno de 37°C , é capaz de sobreviver em temperaturas empregadas na refrigeração de alimentos.

As infecções intramamárias causadas por *S. aureus* apresentam implicações importantes em saúde pública, tendo em vista que as toxinas podem ser excretadas no leite e permanecer estáveis nos produtos oferecidos ao consumo. O *S. aureus* é capaz de produzir mais de uma enterotoxina simultaneamente, aumentando os seus efeitos toxigênicos isolados, essa coprodução pode desempenhar papel importante na patogenia das infecções intramamárias produzidas por esses microrganismos(37).

As enterotoxinas estafilocócicas (EES) são proteínas solúveis em água, monoméricas, globulares, com peso molecular entre 26.000 e 29.000 daltons, ricas em lisina, ácido aspártico e glutâmico, com duas cisteínas formando ponte de dissulfeto(38). Apresentam-se relativamente resistentes ao calor e às enzimas proteolíticas tripsina, pepsina, renina e papaína o que permite sua passagem pelo trato gastrintestinal sem perda da atividade(39). Segundo Baird-Parker, apud Melo(40) para a inativação da toxina, seriam necessários de três a oito minutos a 121°C .

A mastite estafilocócica é bem conhecida em rebanhos leiteiros, e as chances de contrair intoxicação alimentar são grandes se o leite contaminado dessas vacas for consumido ou utilizado na fabricação de queijos(4). O *S. aureus* é um dos mais frequentes isolados como patógeno da mastite bovina(41) e inúmeras são as formas de contágio nas fazendas leiteiras. As cepas são isoladas da pele dos tetos sadios dos bovinos, equipamentos de ordenha e leite bovino, e da pele humana(42).

É difícil controlar a mastite por *S. aureus* e pode ser impossível erradicar essa enfermidade(43). Muitas infecções são causadas por linhagens resistentes(44). A forma mais comum de transmissão ocorre através da transferência de bactérias de uma glândula mamária infectada para uma glândula sadia através de fômites, como equipamentos de

ordenha, toalhas de tecido de uso comum para limpeza dos tetos ou as mãos dos ordenhadores. Em rebanhos onde não se pratica *back-flushing* permanece leite residual nas teteiras e, se a última vaca ordenhada possuir *S. aureus* infectando a glândula, a próxima vaca a utilizar o mesmo conjunto será exposta diretamente ao patógeno. Sendo as mãos dos ordenhadores, as toalhas de tecido ou as esponjas os veículos para a contaminação por *S. aureus* significa, então, que todos os animais do rebanho estão expostos diariamente ao risco de infecção(45).

A infecção da glândula mamária pode começar quando as células do *S. aureus* penetram o canal do teto durante a ordenha pois o esfíncter muscular está relaxado. Logo, as bactérias se multiplicam rapidamente no leite e aderem às células epiteliais. As que não se aderirem serão removidas na próxima ordenha. E, em caso de sucesso da colonização bacteriana, uma grande quantidade de bactérias pode ser encontrada no leite nas próximas 24 horas. Quatro dias após a infecção, o *S. aureus* ainda está presente no tecido intersticial e também no interior das células epiteliais. No início da infecção estafilocócica do úbere, apenas pequenas áreas da glândula podem estar envolvidas. Células do alvéolo e ductos, gradualmente, degeneram e inundam o revestimento da cisterna do teto e, em conjunto com as células somáticas ocluem os ductos mamários que drenam as áreas de produção de leite. Essa obstrução leva à involução das áreas funcionais restantes do alvéolo e à formação de tecido cicatricial. Ductos ocluídos podem reabrir, liberando patógenos a outras áreas da glândula. O processo então se repete, dando início a um ciclo contínuo de infecção em diferentes áreas do quarto mamário. Durante os estágios iniciais da infecção, os danos teciduais são mínimos e reversíveis e se tratada efetivamente, o quarto mamário irá retornar a uma produção semelhante à normal nas próximas lactações. Porém, se microrganismos permanecerem ocluindo áreas, abscessos podem surgir, aumentar significativamente e serem palpáveis no tecido do úbere(46).

A falha no controle do *S. aureus* na mastite pode ser explicada, em parte, pelo comportamento do microrganismo, visto que o úbere de vacas adultas não é seu único reservatório e a transmissão não é necessariamente limitada ao processo de ordenha. A melhor forma de controle da mastite por *S. aureus* é a identificação de vacas infectadas e a prevenção à exposição de glândulas mamárias sadias ao patógeno. A eliminação de infecções existentes é o ideal, através de terapia apropriada durante a lactação, tratamento completa de vacas secas e descarte de vacas com infecção crônica. Novas infecções podem ser prevenidas por procedimentos corretos de ordenha, *pós-dipping*, manutenção da qualidade da pele dos tetos e segregação de vacas infectadas(44).

2.3.1 Fatores de virulência do *Staphylococcus aureus*

Os microrganismos patogênicos se distinguem de outros de mesma espécie por possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, isto é, fatores que propiciam a colonização e ocorrência de diversos eventos que subvertem a fisiologia hospedeira(47), e os chamados “fatores de virulência clássicos” são os plasmídeos, toxinas, fímbrias, flagelos, etc(48). Também se destacam os sistemas de captação de ferro, os fatores que abalam as defesas do hospedeiro e também os genes que permitem a resistência às drogas antimicrobianas, sendo estes elementos adicionais ao arsenal de virulência das bactérias(47). Para a maioria das bactérias patogênicas, a virulência é um processo multifatorial que exige duas classes gerais de determinantes: genes que participam dos processos fisiológicos necessários para sobrevivência nos ambientes hospedeiros e não-hospedeiros, encontrados em organismos patogênicos e não patogênicos, e uma segunda classe de genes de virulência que são únicos para os organismos patogênicos(49).

A maior ou menor capacidade de um isolado microbiano em aderir a uma superfície e, posteriormente, formar e manter um biofilme se relacionam estreitamente a seu genótipo e fenótipo. Uma vez presentes alguns aparatos celulares, como pili, flagelos e fímbrias, algumas proteínas de superfície, bem como sistemas de comunicação célula-célula, percebe-se um incontestável diferencial à bactéria, no que se refere à adesão e à formação de biofilme(50). Além desses aspectos, também são consideradas de extrema relevância as propriedades físico-químicas da superfície microbiana, com ênfase na sua carga elétrica e hidrofobicidade(51).

A capacidade de colonização e patogenicidade de *S. aureus* são provenientes de seus fatores de virulência. Tais fatores permitem sua aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, invadem as defesas imunológicas e proporcionam a invasão celular, penetração tecidual ou adesão a superfície. Esses diferentes mecanismos de sobrevivência, que partem dos constituintes de parede celular e da produção de enzimas e toxinas oferecem proteção ao microrganismo e permitem sua disseminação(52).

S. aureus tem a capacidade de produzir enzimas extracelulares, como coagulase, termonuclease e lipase, consideradas fatores de virulência(53). Alguns componentes estruturais, toxinas e enzimas desse microrganismo agem como fatores de virulência, entre eles:

- Cápsula: inibe a quimiotaxia e a fagocitose, inibindo, assim, a proliferação de células mononucleares;
- Camada mucóide: facilita a aderência a corpos estranhos e inibe a fagocitose;
- Peptideoglicano: confere estabilidade osmótica, estimula a produção de pirogênio endógeno, quimiotáxico para leucócitos, inibe a fagocitose;
- Ácido tecóico: liga a fibronectina;
- Proteína A: inibe a eliminação mediada por anticorpos, quimiotáxico para leucócitos, anticomplementar;
- Adesinas: promovem a aderência às células do hospedeiro através da interação com receptores químicos (52);
- Citotoxinas: tóxicas para células como eritrócitos, fibroblastos, leucócitos, macrófagos e plaquetas;
- Toxinas esfoliativas: serina proteases que clivam as pontes intercelulares no estrato granuloso da epiderme;
- Enterotoxinas: superantígenos, estimulam a liberação de mediadores inflamatórios em mastócitos, aumentam o peristaltismo intestinal e a perda de fluídos, bem como náuseas e vômitos;
- Toxinas 1: da síndrome do choque tóxico: superantígeno, determina o extravasamento de líquidos ou destruição de células endoteliais;
- Coagulase: converte o fibrinogênio em fibrina;
- Hialuronidase: hidrolisa o ácido hialurônico no tecido conjuntivo, promovendo a disseminação dos estafilococos nos tecidos;
- Fibrinolisa: dissolve os coágulos de fibrina;
- Lipase: hidrolisa lipídios;
- Nuclease: hidrolisa DNA(54);
- Catalase: converte o peróxido de hidrogênio, tóxico ao *S. aureus*, em oxigênio e água(52).

Porém, o *S. aureus*, quando associado à mastite bovina, é caracterizado por apresentar uma alta variação de genes de virulência, bem como uma considerável diversidade populacional(55). A persistência na glândula mamária está relacionada à produção de mais de 30 fatores de virulência que podem ser expressos pelo microrganismo, destacando-se as toxinas citolíticas, como as hemolisinas alfa, beta e delta, que estão associadas às alterações patológicas observadas durante o curso de

infecções estafilocócicas, tais como a formação de abscessos, lesões hemorrágicas e necróticas(56).

As toxinas Alfa (α)-hemolisina, altamente ativa contra hemácias de coelhos, causando lise a 37°C, é moderadamente ativa contra hemácias de carneiros e inativa contra hemácias humanas. Praticamente todas as amostras de *S. aureus*, recentemente isoladas de infecções humanas produzem α -hemolisina, a síntese desta enzima é uma forte sugestão de patogenicidade, embora não seja conclusiva para fins de identificação, porque os *Streptococcus* também produzem esta enzima. Já, a Beta (β)-hemolisina age nas hemácias de carneiros, de gado e de seres humanos, é produzida tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas. Gama (γ) e Delta (δ)-hemolisina são isoladas e identificadas como produtos metabólicos de *Staphylococcus*, mas suas reações são bem diferentes das anteriores e não são tão bem conhecidas quanto as α e β -hemolisinas(56).

2.3.1.1 Resistência a antimicrobianos

As razões para a grande difusão de infecções intramamárias por *S. aureus* são obviamente relacionadas às características da bactéria, mas também aos fatores ainda incompreensíveis da epidemiologia destas infecções, levando a medidas ineficientes de controle(57). Uma das hipóteses mais convincentes para explicar a resistência à terapia é a habilidade dos *Staphylococcus* e outros microrganismos se multiplicarem e formarem biofilmes em tecidos infectados, desenvolvendo assim uma resistência inata à maioria dos agentes antimicrobianos(58).

Na prática, a ideia comum de que a taxa de cura em infecções por *S. aureus* é baixa é baseada muito mais nas impressões clínicas do que em evidências científicas. Uma vez que a taxa de cura encontrada em terapias durante a lactação pode variar entre 4-92%; um pouco menos, mas ainda com ampla variabilidade foi relatada também para a terapia de vacas secas por Leslie e Dingwell(59).

O debate recente sobre a elevada resistência microbiana observada na medicina humana e, particularmente de linhagens meticilina-resistentes de *S. aureus*, aumentou a preocupação sobre o uso de antimicrobianos na terapia de vacas de rebanho leiteiro, principalmente no momento da secagem. Os motivos para tal discussão são questionáveis, visto que existem relevantes evidências de que a antibioticoterapia utilizada para a mastite ou para terapia de vacas secas não estão associados ao desenvolvimento de linhagens meticilina-resistentes ou ao aumento da resistência a fármacos(60).

Desde 2013, o uso de antibióticos como aditivo foi suspenso pela Comunidade Européia embasado pelo princípio de precaução(61). O Brasil e demais países como Estados Unidos, Austrália, Japão, Argentina, China, Nova Zelândia e Canadá permitem o uso de alguns antimicrobianos como aditivos na alimentação animal, exceto para as substâncias anfenicóis, tetraciclina, beta- lactâmicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, quinolonas e sulfonamidas sistêmicas. Neste contexto, considera-se que o uso de antimicrobianos em medicina humana ou veterinária produz pressão seletiva que favorece a emergência de microrganismos resistentes que compromete gradativamente a antibioticoterapia(62).

Taxas de resistência antimicrobiana entre hospitais e sistemas de produção animal aumentaram consideravelmente durante as últimas décadas, tornando o tratamento das doenças ainda mais difícil(63). A resistência microbiana pode ser definida como a capacidade de alguns microrganismos em multiplicar-se na presença de determinados antibióticos. A resistência ao antibiótico é uma consequência natural da evolução e pode ser natural ou adquirida(64). De maior preocupação são os casos de resistência adquirida, em que as populações de bactérias sensíveis inicialmente tornam-se resistentes a um agente antibacteriano e proliferam e se espalham sob a pressão seletiva da utilização desse agente(65). Um conceito importante que deve ficar claro é que o antimicrobiano não induz a resistência e sim seleciona as bactérias mais resistentes existentes no meio de uma população(66).

O desenvolvimento de resistência bacteriana está invariavelmente ligada ao uso terapêutico dos agentes microbianos. Quando a penicilina foi introduzida para o uso clínico em 1941, as linhagens de *S. aureus* eram todas susceptíveis. Já em 1944, houve os primeiros relatos de linhagens de *S. aureus* penicilina resistentes, e em menos de uma década, inúmeros problemas de resistência foram observados em diversos países(67). Em 1960, um novo antibiótico β -lactâmico resistente à β -lactamases, a metilicina, primeira penicilina semi-sintética posta em uso clínico. Porém, 15 anos mais tarde emergiu a primeira linhagem de *S. aureus* metilicina-resistente (MRSA). Após isso, a vancomicina foi eleita a droga de eleição para tratar as infecções e finalmente, em 1996, linhagens vancomicina-resistentes (VRSA) foram relatadas no Japão(44). A vancomicina pertence à classe dos glicopeptídeos tricíclicos, e tornaram-se uma das poucas alternativas terapêuticas eficazes no tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA), porém, tem se descrito a emergência de cepas desta bactéria resistentes à vancomicina(68).

Hoje em dia, os *S. aureus* são um dos principais causadores de infecções nosocomiais em humanos, juntamente com *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonias aeruginosa*(44).

Os MRSA (*Staphylococcus* meticilina-resistentes) são frequentemente resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas. Um dos principais mecanismos de resistência dos *Staphylococcus* é codificado pelo gene *mecA*, responsável pela produção de uma proteína ligadora de penicilina adicional (PBP 2a), que possui baixa afinidade pelos agentes beta-lactâmicos(69).

A maior resistência das bactérias isoladas de leites pode estar relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos no tratamento de doenças como mastite. Para Masurani e Tavares(18), o uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos tem proporcionado o surgimento de resistência dos microrganismos aos fármacos de uso corrente.

De acordo com Krumperman(70) altos índices de múltipla resistência aos antibióticos indicam um risco para saúde pública, dificultando o tratamento de enfermidades de animais e humanos, alertando para a necessidade do uso racional destas drogas. Pois, como destacado por Bauer-Garland et al.(71), bactérias que apresentam múltipla resistência podem se disseminar mais rapidamente de um animal a outro e apresentar menor resposta ao tratamento com antimicrobianos quando infectam outros indivíduos.

Estudos “in vitro” demonstraram que as bactérias nos biofilmes tornaram-se 10-1000 vezes mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos quando comparadas com as células livres das mesmas estirpes(72). Os mecanismos responsáveis pela resistência dos microrganismos nos biofilmes aos agentes antimicrobianos são: demora na penetração de agentes antimicrobianos através das matrizes dos biofilmes, taxa de multiplicação alterada de organismos nos biofilmes e mudanças fisiológicas, incluindo as células persistentes.

2.3.1.2 Formação de biofilmes

Em relação à segurança alimentar e à degradação dos nutrientes, os biofilmes são importantes devido à sua formação em alimentos, utensílios e superfícies e à sua dificuldade de remoção; há uma correlação positiva entre a falha nos procedimentos de higiene e a formação de filmes bacterianos, que podem evoluírem para um biofilme(73).

Um biofilme consiste no crescimento de bactérias, fungos ou protozoários, de modo isolado ou em combinação, ligados por uma matriz extracelular, presa a sólidos ou superfícies sólidas. A adesão é facilitada pela excreção microbiana de uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). Nesse microambiente são formadas microcolônias e canais de água utilizados para o transporte de nutrientes e produtos tóxicos. As células microbianas suspensas em líquidos, que não estão em biofilmes, apresentam-se em estado de livre flutuação, denominado planctônico(4). Como etapas importantes para a sua formação, são descritas as adesões iniciais, passando os microrganismos de seu estilo de vida planctônico ao sésil, a formação de microcolônias, a maturação e o destacamento de células, retornando estas a seu estilo de vida planctônico(74).

Uma vez constituídos, os biofilmes agem como pontos de contaminação constante, liberando células de microrganismos, como *S. aureus*, podendo comprometer, assim, a qualidade microbiológica de matérias-primas, produtos pré-acabados e acabados(75). Em condições naturais tendem a ser compostos por culturas mistas, e são considerados mais resistentes aos produtos utilizados comumente para limpeza e sanitização, predispondo a ocorrência de microrganismos patogênicos, os quais podem se aderir a essa superfície(4; 76). A negatividade de sua ocorrência também se relaciona à corrosão de equipamentos, usualmente designada pela expressão Corrosão Microbiologicamente Influenciada (MIC), e pela redução da capacidade da troca de calor entre superfícies(77).

A formação de biofilme por Staphylococci envolve a produção de polissacarídeos de adesão celular (PIA)(78). Esse polissacarídeo depende da expressão do operon de adesão intracelular (*icaADBC*), que codifica três proteínas de membrana (*icaA*, *icaD* e *icaC*) com atividade enzimática e uma proteína extracelular (*icaB*)(79). O gene local *icaADBC* também tem sido detectado em *S. aureus* e em uma grande variedade de outros *Staphylococcus* coagulase negativo(80; 70). Além do mais, diversas proteínas de superfícies estão envolvidas no processo de formação de biofilmes, incluindo proteínas associadas a biofilme (BAP)(81), proteína G de superfície *S. aureus* (SasG)(82; 83), proteínas de ligação fibronectina (FnBPs)(84; 36) ou proteína estafilocócica A (SpA). Sugere-se que a formação de biofilme sob a mediação de proteínas em condições *in vivo* é também um importante fator de virulência(85).

Além do mais, a formação de biofilme por *S. aureus* é influenciada por fatores do ambiente como a presença de açúcares (glicose e/ou lactose) ou presença de proteínas no

meio para crescimento, e depende, em particular, da genética do *S. aureus* isolado(86). De acordo com diversas pesquisas, conhecer o processo de formação do biofilme pode ser útil para entender a patogenicidade dos estafilococos. Os mecanismos de adesão são frequentemente indicados como cruciais fatores de virulência e considerados na caracterização de isolados clínicos em estudos de patogenicidade molecular e epidemiológica(87), além de características físico-químicas do material sobre o qual estão aderidos e expressão de fatores de virulência, como a produção de cápsula exopolimérica, fimbrias e síntese de adesinas fimbrias e não fimbrias(88).

A formação de biofilmes em ambientes de processamento de alimentos tem especial importância devido a seu potencial de agir como fonte de contaminação microbiana, podendo acarretar deterioração do alimento e veiculação de doenças. Os biofilmes bacterianos exibem crescente resistência a limpeza e sanitização(89). Na linha de produção da indústria de laticínios, a formação de biofilmes eleva a carga microbiana e, muitas vezes, contamina com patógenos os alimentos que ali circulam, devido ao eventual desprendimento de porções aderidas. Dessa forma, podem colocar em risco a saúde do consumidor, além dos microrganismos deteriorantes ocasionarem prejuízos financeiros a indústria, em virtude da diminuição da vida de prateleira dos produtos alimentícios (90; 88).

A capacidade do *S. aureus* de aderir e formar biofilmes aumenta sua sobrevivência e crescimento em plantas de processamento de alimentos, proporcionando uma vantagem fisiológica para *S. aureus* como agente etiológico de doenças transmitidas por alimentos(91).

Em relação a mastite, as adesões dos *S. aureus* ao epitélio da glândula mamária são consideradas o primeiro ponto crítico na patogenia desta enfermidade, sendo que a maioria das estirpes dos *S. aureus* causadoras da doença são circundadas por uma camada espessa (*slime* - polissacarídeo extracelular), que auxilia na aderência e colonização dos microrganismos no epitélio da glândula mamária(92). A habilidade dos *S. aureus* aderirem à superfície do epitélio está associada à produção de biofilmes, compostos de multicamadas de células embebidas em uma matriz(93).

A mais eficiente forma de se impedir a formação de um biofilme e a conseqüente ocorrência de tantos malefícios corresponde à prática constante de adequados procedimentos de higiene industrial, contemplando, não só a remoção de resíduos mas também a eliminação de células indesejáveis, é através da sanitização(94). Além disto, a obtenção higiênica do leite e o atendimento a demais itens que compõem as boas práticas

de processamento de alimentos são imprescindíveis ao controle destes microrganismos na cadeia alimentar(74).

A sensibilidade das bactérias aos sanitizantes de uso comum em indústrias de alimentos, quando estas compõem um biofilme, muitas vezes difere da encontrada em testes com células planctônicas. Segundo Joseph et al.(4), somente o uso de sanitizantes em biofilmes íntegros não apresenta efeitos desejáveis na eliminação destes.

2.4 A IMPORTÂNCIA DA HIGIENIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES NA PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA.

A adoção de tecnologias que objetivam promover uma higienização eficiente dos equipamentos é uma necessidade das indústrias de laticínios(95). Do ponto de vista bacteriológico, a limpeza do equipamento consiste principalmente na eliminação da maior quantidade possível de resíduos de alimentos disponíveis para o desenvolvimento dos microrganismos e a sua sanitização consiste em destruir a maior parte dos microrganismos das superfícies(96), o que visa reduzir microrganismos deteriorantes e eliminar patogênicos até níveis seguros, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária(97), evitando-se ações dos fatores causadores da contaminação dos alimentos, que levam à perda das suas qualidades organolépticas e nutricionais, bem como a sua degradação, que pode ocasionar enfermidades de maior ou menor gravidade ao homem(98).

É irreal esperar que instalações de processamento de alimentos sejam estéreis. A compreensão dos riscos relativos da contaminação da planta industrial deve ser realizada através de acompanhamento e controle da contaminação presente. Diversas variáveis impactam esse risco, sendo as mais significantes a proximidade do alimento a nichos de crescimento microbiano, o número de nichos microbianos no ambiente de processamento, o relacionamento dos nichos com o produto, a população em tais nichos, o grau em que os nichos são rompidos e a exposição do produto ao nicho. O crescimento dos nichos microbianos ocorre quando há umidade adequada, nutrição e tempo em temperatura favorável de crescimento. A maioria das plantas das indústrias de alimentos possuem locais que suportam o crescimento de patógenos e microrganismos deteriorantes; esses microrganismos alocados podem se transferir diretamente ao produto ou se transportarem para formação de outros nichos. Fontes que aumentam o risco de contaminação microbiana ambiental podem ser agrupadas em três categorias básicas: condições

operacionais insalubres tais como limpeza e sanitização mal realizadas; práticas de manutenção e reparo ineficientes, e design de equipamentos que dificultam a limpeza. Além disso, matérias-primas, insetos e roedores podem ser fontes de contaminação ao ambiente e ao produto(99).

Na indústria de laticínios e nas propriedades leiteiras é frequente o uso do processo *Clean in Place* (CIP), que é um sistema automático, onde os equipamentos e tubulações são higienizados sem desmontagem. Normalmente, consiste em um pré-enxague com água a temperatura de 38°C a 46°C para a remoção de resíduos grosseiros, seguido pela circulação de solução alcalina à temperatura de 80°C, enxágue para remoção do alcalino, circulação de solução ácida a temperatura de 70°C, e novo enxague. A lavagem alcalina é realizada geralmente com hidróxido de sódio, ou também por compostos de sódio clorados como o hipoclorito de sódio, e a ácida com ácido nítrico ou fosfórico, produtos originalmente selecionados pela habilidade de remover resíduos orgânicos (proteínas e lipídios) e inorgânicos (fosfato de cálcio e outros minerais), respectivamente. Para melhorar o controle da contaminação microbiana, o sistema CIP pode ser complementado com sanificantes(100). Por meio de circulação dessas soluções podem ser higienizadas tubulações, válvulas, bombas, centrífugas, pasteurizadores, evaporadores, dentre outros. Estudos demonstram a eficácia do processo CIP na presença de resíduo de leite(101; 102).

Brasil(103) estabelece que os princípios ativos dos produtos desinfetantes em uso na indústria de alimentos devem ser aqueles que constam da lista do *Code of Federal Regulation* nº 21, e as da Diretiva nº 98/8/Comunidade Européia (CE).

Os detergentes alcalinos, álcalis, são usados como desinfetantes desde os tempos antigos. O mecanismo de ação relaciona-se com a concentração de íon hidroxila. Sabe-se que um pH superior a 9,0 inibe o desenvolvimento da maioria das bactérias. A maior parte do poder antisséptico dos sabões, se deve ao seu conteúdo de álcali. Possuem um amplo espectro de ação, entretanto, não tem efeito sobre os esporos bacterianos. São recomendados para desinfecção de pisos e paredes das instalações. São tóxicos, corrosivos e irritantes, e não biodegradáveis(104).

O hidróxido de sódio, ou soda cáustica, é a substância detergente que apresenta o maior teor em alcalinidade cáustica, apresentando um pH próximo a 13, quando em solução a 1%. Suas características principais são as seguintes: ótima ação contra gordura e proteínas, uma baixa ação de molhagem, nenhuma eficácia para eliminar a dureza, poder corrosivo muito forte contra alumínio, cobre e superfícies galvanizadas. Não ataca o aço inoxidável e absorve facilmente a umidade e o gás carbônico, devendo ser armazenado

em lugar seco, bem fechado e em recipiente impermeável, para não perder parcialmente sua eficiência(105).

No Brasil, os hipocloritos, são amplamente usados na indústria de laticínios e nas propriedades produtoras de leite para desinfecção de equipamentos, utensílios de ordenha e higienização do úbere dos animais antes da ordenha. O hipoclorito de sódio é o mais usado, na forma líquida com teores de 1 a 15% de cloro ativo, expresso em Cl_2 (104), possui amplo espectro de ação, incluindo esporos, apresenta baixo custo e pode ser utilizado em água de dureza elevada. Porém, é altamente corrosivo, atacando peças de borrachas natural ou sintética ou juntas, além de ser irritante a peles e mucosas, e é instável, age através da inativação das permeases da parede celular da bactéria, ligando-se a grupos nitrogenados da parede e membrana celular, formando cloraminas tóxicas e desnaturando proteínas celulares(106).

Os detergentes ácidos são compostos de ácidos orgânicos e inorgânicos, que podem ser combinados ou individuais. São utilizados quando existe a possibilidade de formação de incrustações minerais (água dura, depósitos calcários ocasionados por álcalis)(105; 108). Estas incrustações podem ocorrer em função do tipo de alimento e também da qualidade química da água industrial. Em termos de ação química, os ácidos orgânicos fracos e inorgânicos reagem com os sais insolúveis na água para torná-los solúveis, facilitando a remoção. Os ácidos utilizados isoladamente nas concentrações normais de uso não têm efeito considerável sobre os resíduos orgânicos. Observa-se, assim, que os ácidos preenchem uma lacuna no programa de higienização, devido ao fato de que os alcalinos não conseguem remover resíduos minerais(105).

Segundo Germano(75), o íon hidrogênio confere atividade aos ácidos, no entanto é extremamente corrosivo para metais (ferro galvanizado e aço inoxidável), por este motivo estes detergentes devem conter um inibidor de corrosão. Os ácidos fortes são divididos em inorgânicos, como os ácidos clorídrico, sulfúrico, nítrico e fosfórico; e orgânicos, como os ácidos láctico, glucônico, cítrico, tartárico, levulínico e hidroxiacético. Os ácidos orgânicos são mais caros e são utilizados em superfícies muito incrustadas, devendo ser manuseados com cuidado. Os detergentes ácidos devem conter em suas formulações agentes tensoativos, pois esta formulação apresenta eficiente ação de molhagem e também retardam o crescimento microbiano pela sua ação residual na superfície(106).

O ácido peracético, comumente, utilizado como sanitizante após o processo CIP, possui alto poder oxidante, promovendo oxidação dos componentes celulares, agindo

sobre a membrana citoplasmática, desativando as funções fisiológicas, por exemplo, a barreira osmótica. Possui amplo espectro de ação, atuando contra bactérias, fungos, vírus, algas e esporos, é ativo a baixas concentrações não sendo corrosivo ao aço inoxidável e não altera o sabor dos alimentos, não precisando de enxague. Como desvantagem é instável a presença da luz e matéria orgânica, e se puro é corrosivo à pele e irritante aos olhos e sistema respiratório, além de atacar borrachas de baixa qualidade e metais(107).

A água é amplamente utilizada em indústrias de alimentos como veículo para aquecimento e resfriamento, limpeza e sanitização de equipamentos, além do seu uso como ingrediente ou como veículo para incorporar ingredientes. Deve atender aos padrões físicos, químicos e microbiológicos estabelecidos na legislação brasileira de acordo com a Portaria 2.914, do Ministério da Saúde(108), que determina, entre outras, as análises de metais pesados, pesticidas, solventes orgânicos, nitratos, nitritos e microrganismos patogênicos. Esses contaminantes são oriundos, por exemplo, de resíduos industriais ou contaminação fecal(8).

Para ser potável, a água deve-se encontrar dentro de certos requerimentos de qualidade. Já foram detectados cerca de 2.000 contaminantes diferentes na água, aproximadamente 700 encontrados em água potável. No caso de laticínios, incrustações, denominadas 'pedras', constituídas de minerais da água, principalmente aqueles responsáveis pela dureza, com cálcio e magnésio, minerais dos detergentes e sanitizantes, como sódio, fósforo e cloretos, resíduos de proteínas, gordura, açúcares e sais minerais do leite. Além disso, nessas incrustações podem se agregar microrganismos de origens diversas, que em condições favoráveis atingem números elevados, e ao se liberarem, contaminam os alimentos processados nessas superfícies incrustadas(100).

Nichos de crescimento microbiano podem se estabelecer quando a água é usada em ambientes de processamento de limpeza a seco não projetados para limpeza úmida, ou quando todos os pontos dos equipamentos não estão secos por completo(99).

A indústria leiteira nacional desenvolve atualmente grandes esforços para a implantação de programas de qualidade na área de sanidade, a fim de se adequar às exigências dos mercados externos, cada vez mais inflexíveis quanto a esse aspecto. Em âmbito nacional, se observa também uma conscientização crescente por parte do consumidor em relação às exigências de qualidade sanitária do leite e derivados lácteos.

Com base na relevância destes temas, o presente trabalho objetivou avaliar a contaminação de diferentes superfícies dos equipamentos utilizados na ordenha e a eficácia dos desinfetantes empregados no processo de limpeza e sanitização, através da

quantificação de *S. aureus* e bactérias mesófilas aeróbias, capacidade de formação de biofilme, resistência antimicrobiana e fatores de virulência de *S. aureus* isolados no ambiente de ordenha.

3. CAPÍTULO 1

Quantificação de *Staphylococcus aureus* e bactérias mesófilas aeróbias no processo de higienização de equipamentos de ordenha.

***Staphylococcus aureus* and mesophilic aerobic bacteria quantification in hygienization process of milking equipment.**

Daniela de Avila Silva Bohrz^{I*}, Bruna Webber^{II}, Edinara Silva de Lima^{II}, Carolina Griesang Schenkel^{II}, Rodrigo Santos da Silva^{III}, Fernando Pilotto^{II}, Luciana Daroit^{II}, Luciana Ruschel dos Santos^{II}, Laura Beatriz Rodrigues^{II}

(Artigo submetido para a Revista Ciência Rural)

^{I*} Programa de Pós Graduação em Bioexperimentação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), 99052-900, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: danibohrz@hotmail.com. Autor para correspondência.

^{II} Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

^{III} Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil.

RESUMO

Foi avaliada a eficácia da higienização de dois processos de ordenha através da quantificação de *Staphylococcus aureus* e bactérias mesófilas aeróbias, com coletas em teteiras e água do CIP após a ordenha; após a detergência; e após as sanitizações, sendo que na ordenha 1 a sanitização foi realizada imediatamente ao fim da detergência e, na ordenha 2, a sanitização foi feita 8 horas depois da detergência, antes da ordenha subsequente. No tanque de refrigeração as amostras foram coletados antes e após o processo de detergência; do leite de conjunto após as ordenhas. Nas teteiras houve redução nos níveis de *S. aureus* e bactérias mesófilas aeróbias, porém não houve diferença estatística em nenhum processo de higienização. Na água do processo CIP houve diferença significativa, com redução de 3,81 log¹⁰ das bactérias mesófilas aeróbias com o uso da detergência (D1), após a ordenha 1. A carga bacteriana após a detergência (D2) da ordenha 2, comparada com a obtida após o uso do sanitizante (S2), 8 horas depois da detergência, demonstrou queda significativa (P = 0,030), reduzindo 4,51 log¹⁰. Para *S. aureus* a detergência D1 e D2 e a sanitização S2 diminuíram a contagem bacteriana em relação ao detectado após ordenha, porém não houve diferença estatística entre os pontos (P>0,05). O valor médio do leite de conjunto foi de 3,04 log¹⁰UFC.mL⁻¹ e 3,11 log¹⁰UFC.mL⁻¹ para *S. aureus* nas ordenhas 1 e 2. Não houve diferença significativa para bactérias mesófilas aeróbias e *S. aureus* entre os resultados obtidos antes e após a higienização no tanque de refrigeração.

Palavras-chave: ordenha, leite, contaminação, bactérias, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Effectiveness of two milkings higienization process were evaluated by quantifying *Staphylococcus aureus* and aerobic mesophilic bacteria, with samples in

liners and water from *Clean-in-Place* process (CIP) after milking, after detergency and after sanitizing, wherein at milking 1 the sanitization occurred immediately at the detergency's finish, and at milking 2, sanitization was made 8 hours after detergency, before following milking. Coolink milk bulk tank was collected before and after detergency, and milk set after milkings. In liners there was reduction in *S. aureus* and mesophilic aerobic bacteria levels, but there was no significant statistically difference in any process of cleaning. In CIP water's there was significant difference, with 3,81 log¹⁰ reduction to aerobic mesophilic bacteria with the use of detergency (D1), after milking 1. The bacterial load after detergency (D2) of milking 2 compared with the obtained after the sanitizer's use (S2), 8 hours after detergency, showed significant lower (P = 0,030), reducing 4,51 log¹⁰. For *S. aureus*, the detergency D1 and D2 and sanitizing S2 decreased bacterial count when related to what was found after milking, but there was no statistical difference between points (P>0,05). *S. aureus* average milk set value were 3,04 log¹⁰UFC.mL⁻¹ and 3,11 log¹⁰UFC.mL⁻¹ for milkings 1 (O1) and 2 (O2). There was no significant difference for mesophilic aerobic bacteria and *S. aureus* among results before and after cleaning the cooling milk bulk tank.

Key-words: milking, milk, contamination, bacteria, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

A composição do leite o torna um excelente substrato para a multiplicação de microrganismos que, quando patogênicos, podem causar graves problemas à saúde humana e, conseqüentemente, terem reflexo econômico (BRITO et al., 2000). A presença de *Staphylococcus aureus* e de bactérias mesófilas aeróbias no leite está entre os problemas mais comuns dentro das propriedades leiteiras.

O *Staphylococcus aureus*, envolvido em infecções intramamárias de fêmeas em lactação, sendo o principal agente etiológico de mastite em bovinos (SABEDOT et al., 2014), é o microrganismo patogênico mais frequentemente isolado de leite cru (ZECCHONI & HAHN, 2000). Dentre as diversas formas de contágio características dessa bactéria, o *S. aureus* é onipresente nas fazendas leiteiras, podendo ser isolado na pele de animais sadios, pele humana, equipamentos de ordenha e leite bovino (PENGOV, 2006).

Contagens altas de bactérias mesófilas aeróbias indicam uma matéria-prima excessivamente contaminada. A contaminação do leite com essas bactérias se dá, geralmente, devido a falhas nos processos de higienização das tetas antes da ordenha e a falhas nos sistemas de limpeza e sanitização dos equipamentos de ordenha, tanque de refrigeração ou utensílios que entram em contato com o leite (BRITO et al., 2000).

Na higienização de equipamentos de ordenha comumente utiliza-se o sistema *Clean in Place* (CIP), onde a limpeza e sanitização de tubulações ocorre em processo fechado, automático, sem desmontagem, utilizando produtos para a detergência e sanitização (ANDRADE, 2008). Embora os detergentes diminuam a carga bacteriana das superfícies, o objetivo principal do seu uso é a remoção de resíduos orgânicos e minerais (HOFFMANN et al., 2002). Para melhorar o controle da contaminação microbiana, o sistema CIP pode ser complementado com sanitizantes, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária (ANDRADE, 2008).

Como a contaminação do leite pode ocorrer por via endógena (no caso de animais enfermos) ou exógena (após a saída do úbere), a saúde da glândula mamária, o ambiente de alojamento, a higiene da ordenha e dos equipamentos afetam diretamente a qualidade do leite cru (TRONCO, 2010). Com base na relevância destes temas, o objetivo deste trabalho foi verificar as condições higiênico-sanitárias de equipamentos de ordenha

através da quantificação de *Staphylococcus aureus* e bactérias mesófilas aeróbias, em teteiras, água do processo *Clean-in-Place* (CIP), tanque de refrigeração e leite do conjunto.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada em uma propriedade leiteira no norte do Rio Grande do Sul, com ordenha mecanizada e processo de limpeza com sistema automatizado *Clean in Place* (CIP). Foram acompanhados dois processos de ordenha para verificar a eficácia da higienização dos equipamentos, amostrando *swabs* de superfícies de teteiras de silicone e do tanque de refrigeração de aço inoxidável AISI 304, água do CIP e leite do conjunto, todos coletados com três repetições para cada ponto e etapa analisados.

Os procedimentos seguiram a recomendação do fabricante dos produtos químicos quanto ao tempo de exposição e concentração utilizados. Entretanto, foram testados diferentes tempos entre a etapa de detergência e de sanitização. Na ordenha 1 a sanitização foi realizada imediatamente ao fim da detergência e, na ordenha 2, foi seguida a recomendação do fabricante, com a sanitização sendo feita 8 horas depois da detergência, antes da ordenha subsequente. Para higienização das teteiras e tubulações pelo sistema automatizado CIP foram utilizados produtos comerciais à base de hipoclorito de sódio a 3,8% e de ácido fosfórico a 11,3% na etapa de detergência; e ácido peracético a 5% para sanitização. O tanque de refrigeração foi higienizado de modo automatizado com detergente alcalino a base de hipoclorito de sódio a 3,8%.

As superfícies das teteiras e do tanque de refrigeração foram coletados com *swab* em uma área de 4 cm², delimitada por molde estéril, transferidos para tubos com 1 mL de solução tampão-neutralizante estéril (COPAN^{TM1}). A água residual do CIP foi coletada em alíquotas de 100 mL, em frascos estéreis com neutralizante universal. O leite do

conjunto foi coletado após o término das ordenhas, em frascos estéreis, em alíquotas de 100 mL.

As amostras das teteiras (Tet) e da água do CIP (Cip) foram coletadas após a ordenha (O), com resíduos de leite; após a detergência (D); e após as sanitizações (S), sendo que na ordenha 1 (O1) a sanitização foi realizada imediatamente ao fim da detergência e, na ordenha 2 (O2), a sanitização foi feita 8 horas depois da detergência, antes (A) da ordenha subsequente. A água do CIP amostrada após as ordenhas era coletada após a primeira passagem pelos equipamentos, assim como a água após 8 horas do equipamento sem uso; nos momentos após detergências e sanitizações eram provenientes do último enxágue dos equipamentos. O tanque de refrigeração (Tq) foi coletado antes da higienização, sujo de leite; e após o processo de detergência. O leite do conjunto (L) foi coletado após o término das duas ordenhas. As coletas foram realizadas nas etapas e pontos descritos na Figura 1.

A contagem de *S. aureus* baseou-se na metodologia descrita por EVANCHO et al. (2001), através da inoculação de 0,1 mL de cada diluição em placas de Agar Baird-Parker (Laborclin^{®2}). Após o inóculo ser homogeneizado com uma alça de Drigalski, as placas foram incubadas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A leitura foi realizada após 48 horas de incubação. A confirmação das colônias de *S. aureus* se deu através de microscopia, coloração de Gram e provas bioquímicas: catalase, coagulase, DNase, teste de Voges-Proskauer. Os resultados foram expressos como \log_{10} UFC.cm⁻².

A contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios foi baseada em EVANCHO et al. (2001), onde inóculos de 0,1 mL foram depositados em placas de Petri estéreis com agar Padrão de Contagem (PCA) (HiMedia^{®3}). As placas tiveram o inóculo homogeneizado com uma alça de Drigalski, e incubadas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A leitura foi realizada após 48 horas de incubação, e os resultados expressos \log_{10} UFC.cm⁻².

Os resultados obtidos foram analisados por meio da análise de variância. A comparação das médias foi realizada com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliar os resultados obtidos nas teteiras, tanto para bactérias mesófilas aeróbias quanto para *Staphylococcus aureus*, não houve diferença estatística entre os pontos de coleta na ANOVA ($P = 0,05$), conforme Tabela 1. As teteiras com resíduos de leite da ordenha 1 (O1) e da 2 (O2) apresentaram, respectivamente, médias de 2,60 e 1,46 $\log^{10}\text{UFC.cm}^{-2}$ para *S. aureus*. Após o processo de detergência 1 (D1) e detergência 2 (D2) esses valores diminuíram para 0,43 $\log^{10}\text{UFC.cm}^{-2}$ e 0,0 $\log^{10}\text{UFC.cm}^{-2}$, porém, essas reduções não foram significativas. A utilização do sanitizante nas teteiras também não demonstrou ser eficiente. Após a sanitização 1 (S1) houve um aumento no número de *S. aureus* para 1,19 $\log^{10}\text{UFC.cm}^{-2}$. Ao avaliar a segunda ordenha, o ponto após a detergência 2, com as teteiras sem uso por 8 horas, coletado antes do sanitizante 2 (AS2) teve um aumento de *S. aureus* para 0,88 $\log^{10}\text{UFC.cm}^{-2}$. Depois do sanitizante 2 (S2), realizado antes da ordenha subsequente, houve uma redução da contaminação para 0,33 $\log^{10}\text{UFC.cm}^{-2}$. Apesar de haver redução nos níveis de *S. aureus* em relação à contaminação encontrada nas teteiras sujas de leite, não houve diferença estatística significativa por nenhum processo de higienização, nem detergência nem sanitização.

A utilização dos detergentes e sanitizantes nas teteiras também não foram consideradas eficazes para bactérias mesófilas aeróbias, pois não diminuiu a carga bacteriana presente após a ordenha. O uso do sanitizante (S1) logo após o uso dos detergentes alcalino e ácido na ordenha 1, ou a sanitização antes de um novo turno de ordenha, conforme a recomendação do fabricante (S2), não apresentaram diferença entre elas, e neste último houve um aumento da contagem após a sanitização.

GLESSON et al. (2009), destacaram as teteiras da ordenhadeira mecânica como a maior causa de contaminação entre as vacas. Em trabalho realizado por MIGUEL et al. (2012), a média de contagem de bactérias mesófilas aeróbias em teteiras após ordenha foi de 12,81 UFC.cm⁻² (1,11 log¹⁰UFC.cm⁻²) e após a higienização foi de 1,09 UFC.cm⁻² (0,04 log¹⁰UFC.cm⁻²). A higienização adequada reduz a contagem bacteriana das superfícies dos equipamentos de ordenha. Corroboram com esta afirmação resultados encontrados ao avaliar a eficácia dos procedimentos de higienização dos equipamentos de ordenha por CAVALCANTI (2005), que obteve como média de contagem bacteriana das teteiras higienizadas o valor de 1,8 UFC.cm⁻² (0,25 log¹⁰UFC.cm⁻²) e COSTA (2006), que testou equipamentos de ordenha manual e observou redução de 90% da contaminação. Porém, no presente estudo, a redução em teteiras, para bactérias mesófilas aeróbias, após a higienização com detergentes e sanitizantes, foi de apenas 23,76% após a ordenha 1 (O1) e de 21,45% para a ordenha 2 (O2).

Em relação aos resultados obtidos a partir da água coletada do processo CIP para bactérias mesófilas aeróbias, na ordenha 1, o uso da detergência (D1) apresentou 3,97 log¹⁰UFC.cm⁻², uma redução de 3,81 log¹⁰ após a ordenha (O1), com diferença significativa. Mas, após o uso do sanitizante, houve um aumento na contagem de bactérias (5,79 log¹⁰UFC.cm⁻²), conforme descrito na Tabela 1. Ao comparar a carga bacteriana após a detergência da ordenha 2 (D2: 8,30 log¹⁰UFC.cm⁻²) com a obtida após o uso do sanitizante, 8 horas depois da detergência da ordenha 2 (S2: 3,79 log¹⁰UFC.cm⁻²), houve queda significativa (P = 0,030), reduzindo 4,51 log¹⁰. De acordo com a norma EN 13697 de testes de superfícies da União Européia, a higienização deve realizar uma redução de no mínimo 4 log (MORETRO et al., 2009). Deste modo, esta etapa foi a única que pode ser considerada eficaz. Para *S. aureus* a detergência D1 e D2, e a sanitização S2, diminuíram a contagem bacteriana em relação ao detectado após ordenha, com resíduos

de leite. Entretanto, não houve diferença estatística entre os pontos. O sistema CIP, mesmo com as possíveis deficiências e resistências aos desinfetantes, é comumente utilizado para garantir segurança alimentar e recuperação da planta industrial (ALVAREZ et al., 2010). A resistência aos desinfetantes é preocupante, visto que pode resultar em resistência a agentes antimicrobianos, a resistência cruzada pode ocorrer se dois agentes antibacterianos usarem o mesmo mecanismo de ação ou de resistência (LANGSRUD et al., 2003).

Os valores encontrados na superfície do tanque de refrigeração após a ordenha (O2), ainda com resíduos de leite, foram de $4,5 \pm 2,28 \log^{10}\text{UFC.cm}^{-2}$ de bactérias mesófilas aeróbias e $2,8 \pm 0,73 \log^{10}\text{UFC.cm}^{-2}$ de *S. aureus*. Após a detergência D2, obteve-se $4,7 \pm 3,46 \log^{10}\text{UFC.cm}^{-2}$ de bactérias mesófilas aeróbias e $2,2 \pm 2,75 \log^{10}\text{UFC.cm}^{-2}$ de *S. aureus*. Não houve diferença significativa entre os resultados obtidos antes e após a higienização, com aumento da contagem de mesófilos após a detergência. Destaca-se que os valores superiores a $2,0 \text{ UFC.cm}^{-2}$ ($0,3 \log^{10}\text{UFC.cm}^{-2}$) indicam higiene inadequada das superfícies que entram em contato com alimentos, segundo a American Public Health Association – APHA, (EVANCHO et al., 2001). Assim, os resultados obtidos demonstram que o processo de limpeza automatizado no tanque de refrigeração da propriedade estudada foi ineficaz.

O leite do conjunto apresentou $2,34 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ($5,37 \log^{10}\text{UFC.mL}^{-1}$) no final da ordenha 1 (O1) e $1,5 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ($5,17 \log^{10}\text{UFC.mL}^{-1}$) no final da ordenha 2 (O2) para bactérias mesófilas aeróbias, e $1,1 \times 10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ($3,04 \log^{10}\text{UFC.mL}^{-1}$) e $1,3 \times 10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ($3,11 \log^{10}\text{UFC.mL}^{-1}$) para *S. aureus* nas ordenhas 1 e 2, respectivamente. Os valores encontrados neste estudo para mesófilos aeróbios no leite do conjunto não ultrapassaram as recomendações da IN 62 (BRASIL, 2011) para o ano de 2015, que é de $3,0 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ($5,47 \log^{10}\text{UFC.mL}^{-1}$). Porém, ao considerarmos o valor estabelecido

pela IN 62 (BRASIL, 2011), a partir de 2016, para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, estariam acima do limite máximo, que será de $1,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ ($5 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹) para contagem padrão em placas (CPP), ou seja, quantificação de bactérias mesófilas aeróbias. Valores inferiores ao estabelecido pela legislação também foram encontrados por RECHE et al. (2015) que, ao avaliar a contagem bacteriana total do leite do conjunto de 19 tanques refrigerados de expansão direta, encontraram valores médios de $4,96 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹. LARANJA DA FONSECA & SANTOS (2000) citaram que 95% dos problemas com altas contagens de microrganismos mesófilos aeróbios são originários de insuficiências na higiene da ordenha, como lavagem e sanitização inadequada de utensílios e sistema de ordenha deficitária, os quais podem estar associados a mau resfriamento do leite, mas que raramente a vaca é fonte de problema.

GARCIA et al. (2014), em experimento com leite de conjunto de produção orgânica, obtiveram, em média, $5,4 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹ de aeróbios mesófilos e $2,95 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹ de *S. aureus*. Ao quantificar *S. aureus* de leite cru coletados de tanques de refrigeração, PICOLI (2014) obteve a média de $3,68 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹, a partir de 274 amostras analisadas e, PICOLI et al. (2006), encontraram média de $3,93 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹, na região de Porto Alegre, RS. Os valores para *S. aureus* se assemelham ao encontrado no presente experimento, sendo inferiores a 10^5 UFC.mL⁻¹ ($5 \log^{10}$ UFC.mL⁻¹), que segundo BERGDOLL (1990), a partir desse valor o leite já contém microrganismos em quantidade suficiente para sintetizar enterotoxinas.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse estudo são preocupantes visto que há contaminação presente, inclusive por bactérias do gênero *S. aureus*, causadora de intoxicações de origem alimentar, mesmo após o processo de higienização CIP. A

diminuição da carga bacteriana entre as etapas de limpeza não foi considerada significativa, podendo os equipamentos, atuarem como um ponto de eliminação constante de microrganismos deteriorantes e patogênicos ao produto final obtido, o leite.

AGRADECIMENTOS

A Capes/Prosup/UPF por apoiarem esse estudo através da bolsa de estudos.

FONTES DE AQUISIÇÃO

¹COPAN Innovating Together™, Brescia, Italy.

²Laborclin® Produtos para Laboratório Ltda. Pinhais, PR, Brasil.

³HiMedia® Laboratories. Mumbai, Índia.

REFERÊNCIAS

ALVAREZ, N. et al. Recommendations for rationalizing cleaning-in-place in the dairy industry: Case study of an ultra-high temperature heat exchanger. **J. Dairy Sci.** v. 93, n. 2, p.808–821, 2010. Disponível em: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(10\)71525-3/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(10)71525-3/pdf). Acesso em: 22 jun 2015. doi: 10.3168/jds.2009-2760.

ANDRADE, N.J. **Higienização na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 412p.

BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning. In: CLIVER, D. O. **Foodborne diseases**. London: Academic, 1990. p. 87-106.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, n.251, p.6-11, seção 1, Brasília, 29 de dezembro de 2011.

BRITO, M.A.V.P. et al. Testando a qualidade do leite. In: DURÃES, M.C. et al. MINAS LEITE, 2, 2000, Juiz de Fora. Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000. p.83-94.

CAVALCANTI, E. R. C. **Construção do conhecimento sobre o potencial de contaminação em ordenhadeiras mecânicas após higienização**. 2005. 67f. Dissertação (Mestrado em Educação Agrícola) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.ia.ufrj.br/ppgea/dissertacao/Eliane%20Resende%20Costa%20Cavalcante.pdf>. Acesso em 03 junho 2015.

COSTA, F. F. da. **Interferência de práticas de manejo na qualidade microbiológica do leite produzido em propriedades rurais familiares**. 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/zoo/m/2665.pdf>. Acesso em 03 junho 2015.

EVANCHO, G.M. et al. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, p. 25-35, 2001.

GARCIA, M.E.T.A. et al. Leite orgânico produzido no Distrito Federal: avaliação da qualidade físico-química e microbiológica. **ASA**, São Paulo, v. 2, n. 3, p. 16-24, Set/Dez. 2014. Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/asa/article/view/25344>. Acesso em: 09 jun 2015. ISSN 2357-7614.

GLESSON, D. et al. Effect of pre-milking teat preparation procedures on the microbial count on teats prior to cluster application. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 62, n. 7,

p. 461-467, 2009. Disponível em: <http://www.irishvetjournal.org/content/62/7/461>. Acesso em: 09 jun 2015. doi: 10.1186/2046-0481-62-7-461.

HOFFMANN, F. L. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana "in vitro" de dois agentes sanitizantes de uso industrial. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 94, p. 62-67, 2002.

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

http://www.researchgate.net/publication/223728310_Bacterial_disinfectant_resistance_a_challenge_for_the_food_industry. Acesso em: 23 jun 2015. doi: 10.1016/S0964-8305(03)00039-8.

LARANJA da FONSECA, L.F.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Ed. Lemos. 2000, cap. 14, p. 151-161.

MIGUEL, P. R. R. et al. Incidência de contaminação no processo de obtenção do leite e suscetibilidade a agentes antimicrobianos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 403-416, jan./mar. 2012. doi: 10.5433/1679-0359.2012v33n1p403.

MORETRO, T. et al. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry T. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1005–1012, 2009.

PENGOV, A. *Staphylococcus aureus* - do we really have to live with it? **Slov Vet Res**, v. 43, n. 1, p. 41 -46, 2006.

PICOLI, S. U. et al. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 64-69, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612006000100011&script=sci_arttext. Acesso em: 04 maio 2015. doi: 10.1590/S0101-20612006000100011.

PICOLI, T. et al. Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de micro-organismos em leite cru. **Semina**: Ciências Agrárias, Londrina, v. 35, n. 4, suplemento, p. 2471-2480, 2014. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/15880>. Acesso em: 07 jun 2015. doi: 10.5433/1679-0359.2014v35n4Suplp2471.

RECHE, N.L.M. et al. Multiplicação microbiana no leite cru armazenado em tanques de expansão direta. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.5, p.828-834, maio 2015. ISSN 0103-8478. Disponível em: http://www.scielo.br/readcube/epdf.php?doi=10.1590/0103-8478cr20140542&pid=S0103-84782015000500828&pdf_path=cr/v45n5/0103-8478-cr-45-05-00828.pdf. Acesso em 07 junho 2015. doi: 10.1590/0103-8478cr20140542.

SABEDOT, M. A. et al. Isolamento de bactérias causadoras de mastite subclínica e correlação entre qualidade físico-química do leite e contagem de células somáticas. **Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ**, v. 1, n. 2, p. 099-106, 2014.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção de Qualidade do Leite**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2010. 203 p.

ZECCHONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin IDF**, v.345, p.15-18, 2000.

Tabela 1 – Contagem de bactérias mesófilas aeróbias e *Staphylococcus aureus* em teteiras e água do CIP em sala de ordenha mecanizada. Média das repetições.

Pontos de coleta	Mesófilos aeróbios (log ¹⁰ UFC.cm ⁻²)		<i>S. aureus</i> (log ¹⁰ UFC.cm ⁻²)	
	Teteiras	CIP	Teteiras	CIP
O1	4,42±2,59 a	7,78±1,43 ab	2,60±2,51 a	2,63±2,51 a
D1	3,38±2,91 a	3,97±1,53 b	0,43±0,75 a	0,00±0,00 a
S1	3,37±2,91 a	5,79±0,88 ab	1,19±2,07 a	0,67±1,15 a
AO2	1,56±2,28 a	5,63±1,53 ab	0,63±1,09 a	1,40±1,59 a
O2	5,13±1,91 a	5,73±1,69 ab	1,46±2,53 a	0,67±1,15 a
D2	2,80±3,38 a	8,30±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
AS2	3,95±2,90 a	5,53±1,26 ab	0,88±1,53 a	0,36±0,62 a
S2	4,03±2,51 a	3,79±2,31 b	0,33±0,58 a	0,00±0,00 a

As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

Legendas: **O1**: ordenha 1; **D1**: imediatamente após a detergência da ordenha 1; **S1**: após o sanitizante e imediatamente depois da detergência da ordenha 1; **AO2**: após o sanitizante 1, sem uso por 8 horas, antes da ordenha 2; **O2**: resíduos de leite da ordenha 2; **D2**: após a detergência da ordenha 2; **AS2**: após a detergência 2, sem uso por 8 horas, antes do sanitizante 2 e da próxima ordenha; **S2**: após o sanitizante, 8 horas depois da detergência da ordenha 2.

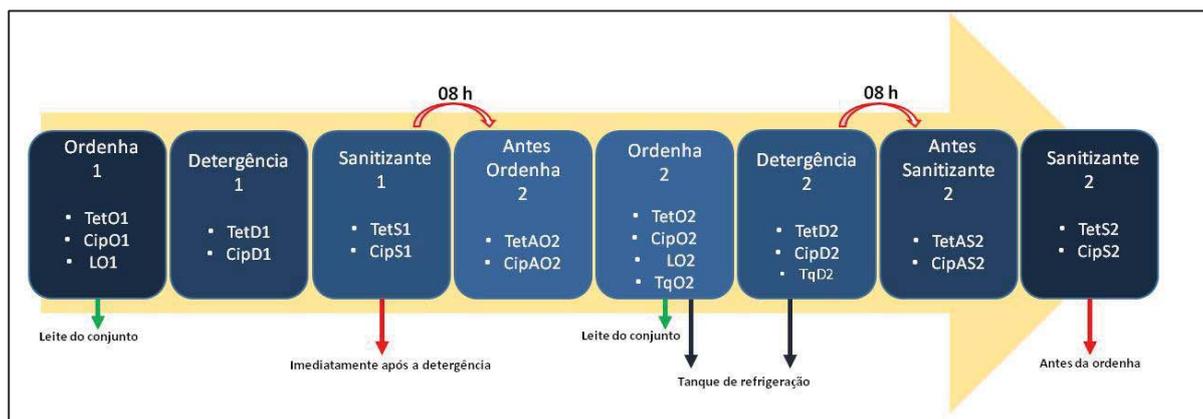


Figura 1 – Pontos de coleta para a quantificação de bactérias mesófilas aeróbias e *Staphylococcus aureus*.

Legenda:

TetO1: teteiras com resíduos de leite da ordenha 1; **CipO1**: água do primeiro enxágue do processo *Clean-in-Place* (CIP), após a ordenha 1; **LO1**: leite do conjunto da ordenha 1; **TetD1**: teteiras, imediatamente após a detergência da ordenha 1; **CipD1**: água do CIP após a detergência da ordenha 1; **TetS1**: teteiras, após o sanitizante e imediatamente depois da detergência da ordenha 1; **CipS1**: água do CIP após o sanitizante e imediatamente depois da detergência da ordenha 1; **TetAO2**: teteiras após o sanitizante 1, sem uso por 8 horas, antes da ordenha 2; **CipAO2**: água do enxágue da tubulação do CIP, após o sanitizante 1, sem uso por 8 horas, antes da ordenha 2; **TetO2**: teteiras com resíduos de leite da ordenha 2; **CipO2**: água do primeiro enxágue do processo CIP, após a ordenha 2; **LO2**: leite do conjunto da ordenha 2; **TqO2**: tanque com resíduos após a retirada do leite do conjunto da ordenha 2; **TetD2**: teteiras após a detergência da ordenha 2; **CipD2**: água do CIP após a detergência da ordenha 2; **TqD2**: tanque após a detergência, na ordenha 2; **TetAS2**: teteiras após a detergência 2, sem uso por 8 horas, antes do sanitizante 2 e da próxima ordenha; **CipAS2**: água do CIP após a detergência 2, sem uso por 8 horas, antes do sanitizante 2 e da próxima ordenha; **TetS2**: teteiras, após o sanitizante, 8 horas depois da detergência da ordenha 2; **CipS2**: água do CIP, após o sanitizante, 8 horas depois da detergência da ordenha 2.

onbehalfof+cienciarural+gmail.com@manuscriptcentr:
em nome de cienciarural@gmail.com

27/07/2015 19:44

para Daniela Bohrz, Meu Gmail

cc Daniela Bohrz, Meu Gmail, brunahw@hotmail.com, edinaralima0606@gmail.com,
carolisschenkel@gmail.com, rodrigasantosmv@gmail.com, fernandopilotto@upf.br,
ludaroit@upf.br, Luciana Ruschel Dos Santos, Laura Prof

Ciência Rural - Manuscript ID CR-2015-1071

27-Jul-2015

Dear Dr. Bohrz:

Your manuscript entitled "Quantificação de Staphylococcus aureus e bactérias mesófilas aeróbias no processo de higienização de equipamentos de ordenha." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the *Ciência Rural*.

Your manuscript ID is CR-2015-1071.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/cr-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the *Ciência Rural*.

Sincerely,
Ciência Rural Editorial Office

4. CAPÍTULO 2

Multirresistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilme isolados de ambiente de ordenha.

Daniela de Avila Silva Bohr^{I*} Bruna Webber^{II} Edinara da Silva Lima^{II} Sara Souza Gehlen^{II} Luciana Ruschel dos Santos^{II} Fernando Pilotto^{II} Laura Beatriz Rodrigues^{II}

(Artigo a ser submetido para a Revista Ciência Rural)

^{I*} Programa de Pós Graduação em Bioexperimentação, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), 99052-900, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: danibohrz@hotmail.com. Autor para correspondência.

^{II} Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil.

RESUMO

Staphylococcus aureus é o patógeno mais isolado da mastite bovina e um dos mais importantes causadores de doenças transmitidas pelos alimentos. Muitas infecções são causadas por linhagens de bactérias resistentes a diferentes antimicrobianos, sendo de extrema importância a preocupação com a resistência aos princípios ativos usados para tratamentos em humanos e animais, visto que tais fármacos podem gerar uma pressão seletiva. Outra característica importante dos *S. aureus* é a capacidade de formar biofilmes em superfícies biológicas e inertes. Na indústria, a formação de biofilmes tem implicações em saúde pública e pode reduzir a vida útil de equipamentos. Com foco nesse assunto, este experimento avaliou a resistência antimicrobiana, fatores de virulência e capacidade formação de biofilmes de 15 cepas de *S. aureus* isoladas do processo de ordenha. Todas as amostras apresentaram perfil de multirresistência, com duas cepas resistentes a 100% dos fármacos, e as demais resistentes a pelo menos 6 princípios ativos. Destas, 100% foram resistentes a penicilina G, 93,34 % resistentes a oxacilina, cefalexina, tetraciclina, cloranfenicol, amoxicilina + ácido clavulônico e sulfazotrim; 73,33% resistentes a doxiciclina e 80% gentamicina; 53,34% resistentes a ceftiofur, 33,34 % a neomicina. Das 15 cepas, 14 foram resistentes a oxacilina (*S. aureus* meticilina-resistentes - MRSA) e, destas, 05 (33,34%) também foram resistentes à vancomicina (*S. aureus* vancomicina-resistentes - VRSA), ou seja, MRSA e VRSA. O Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA) variaram de 0,5 a 1,0. As cepas também foram avaliadas quanto a formação de biofilmes em diferentes temperaturas de incubação (3°C, 9°C, 25°C, 36°C e 42°C) e formaram biofilmes em pelo menos três temperaturas avaliadas, incluindo as temperaturas de refrigeração. Em relação aos fatores de virulência, 13 (86,7%) cepas formaram cápsula, 9 (60%) demonstraram presença de protease, 4 (26,7%) expressaram o fator α -hemolisina e 2 (13,3%) β -hemolisina.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, mastite, múltirresistência, antimicrobianos, biofilme.

INTRODUÇÃO

A ocorrência do *Staphylococcus aureus* em alimentos como o leite e derivados, representa um risco potencial em termos de saúde pública, principalmente devido à produção de enterotoxinas, capazes de desencadear um processo de intoxicação (MARTIN, 2015). De acordo com os dados do Serviço de Vigilância Sanitária (SVS), do Ministério da Saúde (MS), *S. aureus* foi o segundo patógeno mais frequente em surtos com agente etiológico conhecido, representando 20% dos casos ocorridos nos últimos anos (BRASIL, 2013).

O *S. aureus* é um dos principais agentes das mastites consideradas contagiosas, apresentando elevada incidência na maioria dos rebanhos leiteiros em vários países. Dentre as características que tornam esse microrganismo um dos principais agentes causadores de mastite, destaca-se a alta capacidade de invasão, que permite a infecção de regiões mais profundas da glândula mamária. Adicionalmente, ocorre formação de tecido fibroso no foco da infecção, formando "bolsões" de bactérias que dificultam a ação dos antibióticos no local da infecção. Diversos fatores de virulência, como resistência à fagocitose, reconhecimento e ligação a proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, capacidade de metabolizar substratos presentes no leite, entre outros, contribuem para a diversidade genética de *S. aureus* e auxiliam no estabelecimento das infecções causadas pelo patógeno (SALIMENA, 2014).

A eliminação da mastite estafilocócica é o ideal, através de terapia apropriada durante a lactação, tratamento completo de vacas secas e descarte de animais com

infecção crônica. Porém, o uso indiscriminado de antibióticos e outros fármacos, assim como a utilização de doses não indicadas ou contínuas, geram uma pressão seletiva. A resistência antimicrobiana é o principal efeito colateral desta prática, selecionando bactérias, modificando a estrutura de comunidades bacterianas e induzindo uma evolução acelerada com consequências imprevisíveis para a saúde humana e animal (EFSA, 2014).

Neste contexto, foram analisadas 15 amostras de *Staphylococcus aureus*, isoladas de diferentes pontos do ambiente de ordenha, quanto à resistência aos antimicrobianos, virulência e capacidade de formação de biofilme.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia e Micologia Veterinária do Hospital Veterinário da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (FAMV/UPF).

Amostras de Staphylococcus aureus

Foram analisadas 15 amostras de *S. aureus* isoladas de diferentes pontos do ambiente de ordenha, em uma propriedade leiteira no norte do Rio Grande do Sul, com ordenha mecanizada e processo de limpeza com sistema automatizado *Clean in Place* (CIP), sendo 6 amostras de teteiras; 5 amostras da água do processo CIP; 2 amostras do tanque de refrigeração; e 2 amostras do leite do conjunto. Também foi utilizada a cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Resistência aos antimicrobianos

As culturas bacterianas foram semeadas em Agar Muller Hinton¹, incubadas por 24 h e testadas pela técnica de disco-difusão (CLSI, 2012) frente aos seguintes princípios

ativos: Cefalexina 30 μg^4 , Gentamicina 10 μg^4 , Tetraciclina 30 μg^4 , Oxacilina 1 μg^4 , Neomicina 30 μg^4 , Sulfazotrim 25 μg^4 , Penicilina G 10 U⁴, Amoxicilina + Ácido Clavulônico 30 μg^4 , Vancomicina 30 μg^4 , Cloranfenicol 30 μg^5 , Doxiciclina 30 μg^5 , Ceftiofur 30 μg^6 .

Para tanto, os *S. aureus* em colônias puras foram incubadas em caldo BHI² a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 18 h. Uma suspensão equivalente a escala 0,5 de MacFarland³ foi obtida por diluição em caldo BHI² e utilizada para inoculação das bactérias-teste em Agar Mueller-Hinton¹. Após incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h foi realizada a leitura e interpretação dos halos de inibição conforme tabela específica. Utilizou-se o critério para multirresistência aos fármacos do National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS, 2012) que cita multirresistência como a resistência a três ou mais classes de antimicrobianos e também por fenótipos específicos. O índice de resistência múltipla antimicrobiana (IRMA) para cada amostra foi calculado conforme KRUMPERMAN (1983), onde $\text{IRMA} = \text{número de antibióticos resistentes} / \text{número total de antibióticos testados}$.

Produção de cápsula, hemolisina e protease.

No teste para evidenciar a produção de cápsula, os isolados foram inoculados em caldo triptona de soja (TSB⁷) e incubados por 37°C por 24 horas. Transcorrido o tempo, as amostras foram inoculadas em placas com agar Vermelho Congo - agar BHI⁹ suplementado com sucrose e tintura vermelho congo¹⁰ a 0,8 g.L⁻¹, a 37°C por 24 horas, conforme metodologia descrita por FREEMAN et al., 1989.

Para avaliação da produção de hemolisina, o teste foi conforme descrito por DIAS et al. (1994). As culturas bacterianas com 24 horas de incubação em ágar triptona de soja (TSA⁸) foram inoculadas em placas de agar sangue contendo 5% de sangue de carneiro estéril. Após, as placas foram inoculadas a 37°C , por 24 horas, re-incubadas e feita leitura

com 48 horas. A presença de zonas circulares de hemólise total (β) ou parcial (α), ao redor das colônias, indicaram resultado positivo para o teste.

A produção de protease foi testada segundo a metodologia descrita por BUDI et al. (2000), onde as culturas bacterianas com 24 horas de incubação em caldo TSB⁷, foram inoculadas em placas de agar Leite (agar base² adicionado de extrato de levedura 15g.L⁻¹ e leite em pós desnatado 100g.L⁻¹), e incubadas a 37°C por 48 horas. A presença de degradação, visualizada como um halo claro ao redor das colônias, indicava resultado positivo.

Formação de biofilmes

O método para detecção da formação de biofilme em superfície de poliestireno foi baseado em RODRIGUES et al. (2010). As cepas foram incubadas em ágar TSA⁸ com 4% de glicose por 24 horas a 36 °C. Após, foram cultivadas em 3 mL de caldo TSB⁷ com 4% de glicose e incubadas a 36 °C por 24 horas. Após este período, realizou-se a diluição da suspensão bacteriana de cada amostra em 1 mL de caldo TSB⁷ com 4% de glicose, até corresponder a escala 1 de MacFarland³. Inoculou-se 200 μ L da suspensão bacteriana de cada amostra, em três poços independentes, em placa de poliestireno de 96 poços com fundo chato. Foi inoculada uma placa para cada temperatura de incubação 42 \pm 1°C, 36 \pm 1°C, 25 \pm 1°C, 9 \pm 1°C e 3 \pm 1°C por 24 horas. Como controle negativo utilizou-se caldo TSB⁷ não inoculado, também em triplicata.

Transcorrido o período, a suspensão bacteriana de cada poço da placa de poliestireno foi aspirada e lavada três vezes com 250 μ L solução de cloreto de sódio estéril a 0,9%. Após, as células bacterianas foram fixadas com 200 μ L de metanol p. a. por 15 minutos, com posterior remoção. As placas foram secas em temperatura ambiente, e coradas com 200 μ L de solução de cristal violeta de Hucker 2% durante 5 minutos,

lavadas e secas novamente a temperatura ambiente. Os procedimentos, desde a incubação até a preparação para a leitura das placas, foram realizados duas vezes. Deste modo, cada amostra originou 6 repetições para leitura, em cada temperatura avaliada.

A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA a 550 nm. O valor da absorbância de cada amostra (DOa) foi obtido através da média aritmética dos valores dos 6 poços. Esse valor foi comparado com a média da absorbância do TSB⁷ não inoculado (DO). Para determinar o grau de aderência foi utilizada a seguinte classificação: não aderente: $DOa \leq DO$; fracamente aderente: $DO < DOa \leq 2.DO$; moderadamente aderente: $2.DO < DOa \leq 4.DO$; fortemente aderente: $4.DO < DOa$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, todas as amostras de *Staphylococcus aureus* avaliadas apresentaram padrão de multirresistência aos antimicrobianos testados, conforme descrito na Tabela 1. Diante dos resultados, determinou-se o Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA), conforme descrito por KRUMPERMAN (1983), revelando alguns valores próximos ou iguais a 1,0.

Os isolados de teteiras demonstraram valores entre 0,66 a 1,0, e para água do CIP os valores variaram de 0,5 a 1,0. Os *S. aureus* oriundos do leite apresentaram valores de 0,83; nas amostras do tanque de refrigeração os valores foram de 0,66 e 0,83.

De acordo com KRUMPERMAN (1983), índices de resistência a antimicrobianos $IRMA \geq 0,2$ caracterizam o fenômeno da múltipla resistência, indicando um risco para saúde pública, dificultando o tratamento de enfermidades de animais e humanos. Como destacado por BAUER-GARLAND et al. (2006), bactérias que apresentam múltipla resistência podem se disseminar mais rapidamente de um animal a outro e apresentar menor resposta ao tratamento com antimicrobianos quando infectam outros indivíduos.

Segundo NEVES (2014) elevam a necessidade de altas concentrações do antibiótico para eliminar a bactéria e possível potencial para transferência horizontal de genes de resistência.

Os resultados encontrados nesse estudo para amostras de leite são superiores ao relatado por COSTA et al. (2013), onde o índice IRMA para *S. aureus* apresentaram variações de 0 a 0,26. Porém, o referido autor salientou que 18,15% das amostras testadas, oriundos de 24 entre os 35 rebanhos estudados, apresentaram índice IRMA $\geq 0,2$, caracterizando como fenômeno da múltipla resistência.

Em relação aos princípios ativos utilizados no teste, as 15 amostras foram resistentes a penicilina G, 93,34 % resistentes a oxacilina, cefalexina, tetraciclina, cloranfenicol, amoxicilina + ácido clavulônico e sulfazotrim; 73,33% resistentes a doxiciclina e 80% gentamicina; 53,34% resistentes a ceftiofur, 33,34 % a neomicina e a vancomicina.

A ideia comum de que a taxa de cura em infecções por *S. aureus* é baixa é baseada muito mais nas impressões clínicas do que em evidências científicas. Uma vez que a taxa de cura encontrada em terapias durante a lactação pode variar entre 4-92% (LESLIE & DINGWELL, 2003). Taxas de resistência antimicrobiana entre hospitais e sistemas de produção animal aumentaram consideravelmente durante as últimas décadas, tornando o tratamento das doenças ainda mais difícil (FRYE & JACKSON, 2013).

Desde 2013, o uso de antibióticos como aditivo foi suspenso pela Comunidade Européia embasado pelo princípio de precaução (SANTANA et al., 2011). O Brasil e demais países como Estados Unidos, Austrália, Japão, Argentina, China, Nova Zelândia e Canadá, permitem o uso de alguns antimicrobianos como aditivos na alimentação animal, exceto para as substâncias anfenicóis, tetraciclina, beta- lactâmicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, quinolonas e sulfonamidas sistêmicas. Neste contexto,

considera-se que o uso de antimicrobianos em medicina humana ou veterinária produz pressão seletiva que favorece a emergência de microrganismos resistentes que comprometem gradativamente a antibioticoterapia (DEMINICIS & MARTINS, 2014).

O debate recente sobre a elevada resistência microbiana observada na medicina humana e, particularmente, de linhagens meticilina-resistentes de *S. aureus*, aumentou a preocupação sobre o uso de antimicrobianos na terapia de vacas de rebanho leiteiro, principalmente no momento da secagem. Os motivos para tal discussão são questionáveis, visto que existem relevantes evidências de que a antibioticoterapia utilizada para a mastite ou para terapia de vacas secas não estão associados ao desenvolvimento de linhagens meticilina-resistentes (MRSA) ou ao aumento da resistência a fármacos (ERSKINE et al., 2004), mesmo a meticilina estando fora de produção, devido a utilização de penicilinas mais estáveis, como por exemplo a oxacilina, o termo MRSA ainda é usado para *S. aureus* resistentes a penicilinas.

No presente estudo, todas as cepas analisadas quanto à sensibilidade antimicrobiana foram resistentes à penicilina G (100%), e 14 (93,34%) apresentaram resistência à oxacilina, demonstrando característica de MRSA. As cepas resistentes a oxacilina também podem ser denominadas como ORSA (*S. aureus* oxacilina-resistentes). QUEIROZ et al. (2014), ao estudarem *Staphylococcus* sp. isolado de leite bovino e outros alimentos de origem animal, encontraram 100% das cepas sensíveis a oxacilina.

É importante salientar que 05 (05/15) cepas apresentaram perfil de resistência a VRSA (*S. aureus* vancomicina-resistentes) e a MRSA, concomitantemente. A vancomicina pertencente à classe dos glicopeptídeos tricíclicos, e é uma das poucas alternativas terapêuticas eficazes no tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA).

Conforme relatado por O'NEILL (2008), e encontrado no presente estudo, observa-se uma emergente resistência destas bactérias à vancomicina. A resistência à vancomicina já foi relatada na década de 90 como um problema crescente, particularmente em locais como hospitais. A vancomicina é um antibiótico de última geração para várias infecções por bactérias Gram positivas. A crescente resistência pode levar ao indesejado cenário de outrora, quando infecções bacterianas eram, em sua maioria, fatais (SMITH et al., 1999).

O desenvolvimento de resistência bacteriana está invariavelmente ligada ao uso terapêutico dos agentes microbianos. Quando a penicilina foi introduzida para o uso clínico, em 1941, as linhagens de *S. aureus* eram todas susceptíveis (HIRAMATSU, 2001). Em 1960, um novo antibiótico β -lactâmico resistente à β -lactamases, a meticilina, primeira penicilina semi-sintética posta em uso clínico, foi desenvolvido para lutar contra as infecções estafilocócicas. Porém, anos mais tarde emergiu a primeira linhagem de *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA). Após isso, a vancomicina foi eleita a droga de eleição para tratar as infecções e, em 1996, linhagens vancomicina-resistentes (VRSA) foram relatadas no Japão (PENGOV, 2006). Importante salientar que os MRSA são frequentemente resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas (SFACIOTTE et al., 2014).

LO TURCO (2013), em pesquisa com 21 cepas de *S. aureus* isolados de queijo minas frescal, também evidenciou perfis de sensibilidade e resistência antimicrobiana elevados. O perfil de resistência em ordem decrescente ficou distribuído da seguinte forma: 76% das cepas foram resistentes à penicilina, 42% à tetraciclina, 38% à eritromicina, 33% à estreptomicina e ácido nalidíxico, 23% à teicoplanina, ciprofloxacina e vancomicina, 19% à norfloxacina, gentamicina e cloranfenicol e apenas 14% à

imipenem. Em relação à penicilina, esta demonstrou ser o de menor eficiência contra o crescimento e evolução de cepas estafilocócicas, dado este que se assemelha ao encontrado neste estudo, onde 100% das amostras foram resistentes a penicilina. LO TURCO encontrou 61% de resistência a mais de dois antimicrobianos, demonstrando, assim, serem multirresistentes. Já o encontrado neste experimento foi de multirresistência a no mínimo seis antimicrobianos.

RESENDE et al. (2012), evidenciou que, em se tratando de *Staphylococcus* coagulase positiva isolados do leite de vacas com mastite, o antimicrobiano mais eficiente foi o ciprofloxacina com 100% de sensibilidade, seguido da gentamicina (95,45%), sulfazotrim (86,36%) e cloranfenicol (86,36%) e a maior resistência foi desenvolvida frente ao cefepime (95,45%) e penicilina G (81,82%). Resultados estes que divergem ao encontrado neste estudo para as amostras de *S. aureus*, que demonstraram 93,33% de resistência ao cloranfenicol e a sulfazotrim.

O ceftiofur, uma cefalosporina de terceira geração, e a única aprovada para animais de produção (WEBSTER, 2005), foi o antibiótico que apresentou maior sensibilidade (33,34%), 13,34% de sensibilidade intermediária e 53,34% de amostras resistentes nesta pesquisa. Este grupo de antimicrobianos impede a síntese da parede celular, estrutura encontrada apenas em microrganismos, responsável pelas funções de proteção, sustentação e manutenção da morfologia bacteriana (SPINOSA, 2006).

Para MASURANI & TAVARES (2007), o uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos tem proporcionado o surgimento de resistência dos microrganismos aos fármacos de uso corrente. A resistência microbiana pode ser definida como a capacidade de alguns microrganismos em crescer e multiplicar na presença de determinados antibióticos (TORTORA et al., 2012). Um conceito importante que deve ficar claro é que

o antimicrobiano não induz a resistência e sim seleciona as bactérias mais resistentes existentes no meio de uma população (ALTERTHUM, 2005).

A formação de biofilme nos diferentes pontos amostrados e os fatores de virulência estão descritos na Tabela 2.

Todas as amostras formaram biofilmes, nas diferentes temperaturas e em diferentes graus de aderência. Apenas uma amostra, oriunda do tanque de refrigeração após a detergentização (TqD2), não formou biofilme a 3°C, mas formou nas demais temperaturas. É importante salientar a formação de biofilme a 3°C, visto que esta temperatura é considerada segura para o transporte e conservação do leite na propriedade. Segundo a IN 62 (BRASIL, 2011), em se tratando de tanque de refrigeração por expansão direta, a temperatura para armazenamento do leite deve ser igual ou inferior a 4°C (quatro graus Celsius) no tempo máximo de 3h (três horas) após o término da ordenha.

Uma característica importante dos *S. aureus* é a sua capacidade de formar biofilmes em superfícies biológicas e inertes. Sendo assim, em muitos casos clínicos, a resposta imune do hospedeiro contra infecções persistentes é ineficaz, podendo levar a quadros de doenças crônicas (ARCHER et al., 2011).

Na indústria, a formação de biofilmes é um problema, pois além das implicações em saúde pública pela disseminação de patógenos via alimentos, os biofilmes podem reduzir a vida útil de equipamentos, causando perdas econômicas significativas. Somam-se a isso os problemas decorrentes do aumento da resistência bacteriana a sanificantes, o que agrava o problema de sua ocorrência no ambiente de processamento de alimentos (OLIVEIRA et al., 2013).

LEE (2012), ao estudarem a ocorrência de *S. aureus* produtores de biofilmes em ambiente de ordenha de propriedades no Estado de São Paulo, do total de isolados obtidos de leite, tanques, equipamentos e manipuladores, 41,9% foram considerados capazes de

produzir biofilmes em aço inoxidável. Os autores relacionaram a alta porcentagem de cepas-biofilmes positivas encontrada em tanques de expansão aos riscos de contaminação do produto, podendo os biofilmes formados constituírem um foco constante de disseminação da bactéria no leite e derivados. MARQUES et al. (2013) avaliaram a produção de biofilmes em amostras provenientes de vacas com mastite, e encontraram 84,3 % das cepas como produtoras de biofilmes.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al. (2014), ao avaliarem a eficácia de sanificantes na remoção de biofilmes de *S. aureus*, dentre eles o ácido peracético, cloreto de benzalcônio e hipoclorito de sódio, relataram que os biofilmes são mais resistentes a tais compostos do que quando comparados às células planctônicas. Também demonstraram a ineficácia dos sanificantes MEIRA et al. (2012), ao avaliarem a remoção de biofilmes de *S. aureus* em aço inoxidável e polipropileno por ácido peracético e hipoclorito de sódio, observaram redução da população bacteriana em ordem de $2 \log^{10} \text{UFC.cm}^{-2}$, considerando a redução insuficiente, visto que de acordo com a norma EN 13697 de testes de superfícies da União Européia, a higienização deve realizar uma redução de no mínimo 4 log (MORETRO et al., 2009).

Estudo de LUPPENS et al. (2002) verificou que os materiais avaliados (vidro, aço inoxidável e poliestireno) não influenciaram na adesão bacteriana de *S. aureus*. No entanto, adesão pode variar em função do substrato de crescimento do biofilme e das condições de estudo empregadas (OULAHAL et al., 2008).

MARTIN (2015) verificou que, em períodos de 3 a 12 horas de incubação, a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo aumentou de $3,39 \log_{10}$ para $6,16 \log_{10} \text{UFC.cm}^{-2}$, representando um aumento de aproximadamente 600 vezes o número de células aderidas por cm^2 de superfície.

Em relação aos fatores de virulência, 13 cepas (86,7%) formaram cápsula, 9 (60%) demonstraram presença de protease, 4 (26,7%) expressaram o fator α -hemolisina e 2 (13,3%) β -hemolisina, conforme a Tabela 2. Apenas duas amostras (13,34%) foram positivas para os três fatores de virulência analisados, e percebe-se que estas formaram biofilmes fortemente aderentes nas temperaturas de 36°C e 42°C.

Algumas espécies estafilocócicas produzem hemolisinas que diferem de acordo com a ação lítica sobre os eritrócitos. As do tipo beta e alfa são as mais importantes na patogênese das infecções intramamárias. MARQUES et al. (2013) encontraram apenas 13,2% (33/250) *Staphylococcus* spp. hemolíticos. Destes, 48,5% (16/33) apresentaram hemólise total e 36,4% (12/33) hemólise parcial. A produção de hemolisinas está relacionada à patogenicidade das amostras de *Staphylococcus* spp. LARSEN et al. (2002) sugerem que cepas de *Staphylococcus* spp. produtoras de hemólise parcial são mais virulentas ao gado que cepas não hemolíticas. A hemólise parcial, em *Staphylococcus* spp., é representada pela beta-hemolisina, tóxica para vários tipos celulares apresentando grande importância nos casos de mastite uma vez que o úbere é rico em esfingomielina (COELHO et al. 2011). SILVA & CARDOSO (2000) apontaram que amostras não hemolíticas também podem ser isoladas de casos de mastite bovina.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados na avaliação de *Staphylococcus aureus*, neste estudo, denotam grande relevância devido ao risco das bactérias pesquisadas permanecerem no ambiente de ordenha e poderem contaminar animais ou humanos, através de contato direto ou via alimento, já que todas as cepas analisadas mostraram-se multirresistentes e formadoras de biofilmes.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- ¹ Oxoid® Microbiology Products. Hampshire, United Kingdom.
- ² HiMedia® Laboratories. Mumbai, Índia.
- ³ Escala de MacFarland® Nefelobac, Probac do Brasil. São Paulo, SP, Brazil.
- ⁴ Laborclin® Produtos para Laboratório Ltda. Pinhais, Paraná, PR, Brazil.
- ⁵ DME® Diagnósticos Microbiológicos Especializados, São Paulo, SP, Brazil
- ⁶ Cefar® Diagnóstica Ltda, Sensifar e Multifar. São Paulo, SP, Brazil.
- ⁷ Merck Millipore Corporation. Darmstadt, Alemanha.
- ⁸ Difco™ Microbiologia. Sparks, MD, USA.
- ⁹ BD Becton Dickinson GmbH. Heidelberg, Germany.
- ¹⁰ SIGMA-ALDRICH®. St. Louis, United States.

REFERÊNCIAS

- ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antimicrobianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 79-84.
- ARCHER, N.K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms – Properties, regulation and role in human disease. **Virulence**, v.2, n.5, p. 445-459, 2011.
- BAUER-GARLAND, J. et al. Transmission of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* in poultry with and without antimicrobial selective pressure. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.1301-1308, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – Abril 2013. Disponível em: <http://www.camara.leg.br>. Acesso em 22 jan 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62 de 29 de setembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e

Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e de seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 29 de dez. de 2011.

BUDI, S.W. et al. Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus sp.* strain B2 and the effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. **Applied Soil Ecology**, v.15, p.191-199, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second information supplement**. M100-S22. CLSI: Wayne, PA, USA. 2012.

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

COSTA, G.M. et al. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v.80, n.3, p. 297-302, 2013.

DEMINICIS, B.B., MARTINS, C.B. **Tópicos especiais em Ciência Animal III**. 1ª Edição. Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo. Editora: CAUFES. Alegre, ES. 2014. 372p.

DIAS, A.M.G. et al. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from blood and cerebrospinal fluid. **Revista de Microbiologia**, v.25, n.2, p.77-82, 1994.

ERSKINE, R.J. et al. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. In: **Anais ... 43rd NMC Annual Meeting**, Charlotte, pp. 400-414, 2004.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) & EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. **EFSA Journal**. v. 12, n. 3, 2014. 336 p.

FREEMAN, D.J. et al. New method for detecting slime production by coagulase negative Staphylococci. **J Clin Pathol.**, v. 42, p.872-874, 1989.

FRYE, J. G; JACKSON, C. R. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. Isolated from U.S. food animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 135, p. 1-22, 2013.

HIRAMATSU K. et al. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.** v. 9, p. 486-93, 2001.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 46, v. 1, 165-170, 1983.

LARSEN, H.D. et al. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and β -hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. **Vet. Microbiol.**, v. 85, p.61-67, 2002.

LEE, S.H.I. Identificação molecular de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilmes em ambiente de ordenha. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo- USP, Pirassununga – SP, 2012. 71p.

LUPPENS, S.B. et al. Development of a standard tests to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4194-4200, 2002.

LESLIE, K.E., DINGWELL, R.T. Background to dry cow therapy: what, where, why - is it still relevant? In: **Anais...**NMc Annual Meeting Fort Worth (TX), pp. 5-17, 2003.

LO TURCO, R.O. Quantificação e identificação genotípica do gene *coa* de *Staphylococcus aureus* a partir de queijos e embutidos. **Trabalho de Conclusão de Curso de graduação**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Londrina, PR. 2013.

MARTIN, J.G.P. Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de laticínios produtores de queijo Minas frescal. **Tese** (Doutorado). Universidade de São Paulo – USP. Piracicaba, SP. 2015. 102p.

MARQUES, V.F. et al. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus spp.* e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.2, p.160-170, 2013.

MASURANI, A.; TAVARES, L.C. Estudos de QSAR-3D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade frente a *Staphylococcus aureus* multirresistentes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.2, p.101-16, 2007.

MEIRA, Q.G.S. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, v.25, n.2, p.469-475, 2012.

MORETRO, T. et al. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry T. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1005–1012, 2009.

NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING SYSTEM (NARMS). 2012. “**Strategic Plan 2012-2016**”. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM236283.pdf>>. Acesso em 03 maio 2014.

NEVES, G. B. Diferenças na expressão gênica de isolados de campo e de frigorífico de *Salmonellas* resistentes aos antimicrobianos e desinfetantes. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina- UDESC. Lages, 2014. 104f.

OLIVEIRA, M.M.M. et al. Biofilmes em indústrias de laticínios: aspectos gerais e uso de óleos essenciais como nova alternativa de controle. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v.68, n.390, p.67-73, 2013.

OULAHAL, N. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* of two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three diferente dairy products. **Food Control**, v.19, p. 178-185, 2008.

PENGOV, A.. *Staphylococcus aureus* - Do we really have to live with it? Review Article. **Slov Vet Res**; v. 43, n.1, p. 41-6, 2006.

QUEIROZ, M.R.A. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.16, n.3, supl. I, p.737-743, 2014.

RESENDE, N.F.M. et al. Avaliação da resistência de bactérias do leite aos antimicrobianos. In: **Anais...Encontro de Iniciação Científica da UninCor**. 2012. Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações/MG.

RODRIGUES, L.B. et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1082-1085, 2010.

SALIMENA, A.P.S. Formação de biofilme na indústria de alimentos por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **CES Revista**, v. 28, n. 1. p. 88-102, jan./dez. 2014.

SANTANA, E. S. et al. **Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura**. Centro Científico Conhecer. 2011. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011a/agrarias/uso%20de%20antibioticos.pdf>>. Acesso em: 12 mar 2013.

SFACIOTTE, R.A.P. et al. Detecção fenotípica e genotípica de isolados de *Staphylococcus pseudointermedius* resistentes a meticilina (MRSP) multirresistentes isolados de pequenos animais. **Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ.**, v. 1, supl. 1, p. 079, 2014.

SMITH, T.L. et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. **N Engl J Med**, v. 340, n.7, p.493-501, 1999.

SILVA, N.; CARDOSO, H.F.T. Produção de toxinas hemolíticas por amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Vet. Notícias**, v.6, n.2, p.63-67. 2000.

SPINOSA, H. S. et al. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 897p.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D. et al. Biofilm-formin ability and resistance to industrial disinfection of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. **Food Control**, v.30, n.2, p.8-16.

WEBSTER, C. R. L. Antibióticos: Inibem a Síntese da Parede Celular, Interferem no metabolismo do DNA e Inibem a Síntese Protéica. In: WEBSTER, C. R. L. et al. **Farmacologia Clínica**. São Paulo: Rocca, p. 75-81, 2005.

Tabela 1 - Distribuição do padrão de resistência e Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA) de 15 isolados de *Staphylococcus aureus* oriundos de diferentes pontos do fluxograma da obtenção do leite cru.

Padrão de resistência aos antimicrobianos	Número de amostras	Perfil de resistência	IRMA
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Neo, Dox, Tet, Clo, Van, Amc, Sut, Ctf	2	1	1,0
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Neo, Dox, Tet, Clo, Amc, Sut	2	2	0,83
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Tet, Clo, Van, Amc, Sut, Ctf	1	3	0,83
Cfe, Oxa, Pen, Dox, Tet, Clo, Van, Amc, Sut, Ctf	1	4	0,83
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Dox, Tet, Clo, Van, Amc, Sut	1	5	0,83
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Dox, Tet, Clo, Amc, Sut, Ctf	1	6	0,83
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Dox, Tet, Clo, Amc, Sut	3	7	0,75
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Clo, Amc, Sut, Ctf	1	8	0,66
Cfe, Pen, Gen, Neo, Tet, Clo, Amc, Sut	1	9	0,66
Cfe, Oxa, Pen, Tet, Clo, Amc, Sut, Ctf	1	10	0,66
Cfe, Oxa, Pen, Dox, Tet, Clo	1	11	0,5

Cfe = Cefalexina 30 µg, Oxa= Oxacilina 1 µg, Pen= Penicilina G 10 U, Gen= Gentamicina 10 µg, Neo= Neomicina 30 µg, Dox= Doxiciclina 30 µg, Tet= Tetraciclina 30 µg, Clo= Cloranfenicol 30 µg, Van= Vancomicina 30 µg, Amc= Amoxicilina + Ácido Clavulônico 30 µg, Sut= Sulfa + Trimetropim 25 µg, Ctf= Ceftiofur 30µg.

Tabela 2- Formação de biofilmes, perfil de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* isoladas de diferentes pontos em sala de ordenha mecanizada.

Identificação da amostra	Origem	Aderência a 550 nm					Fatores de virulência			Perfil de resistência antimicrobiana
		3°C	9°C	25°C	36°C	42°C	Cápsula	Protease	Hemolisina	
ST1	TetO1	FRACA	FRACA	MODERADA	FRACA	MODERADA	+	+	-	P6
ST2	CipO1	MODERADA	FRACA	MODERADA	FORTE	FORTE	+	+	+β	P11
ST3	LO1	FRACA	MODERADA	MODERADA	FORTE	FORTE	+	-	+α	P4
ST4	TetD1	FRACA	FRACA	MODERADA	FRACA	FRACA	+	+	-	P1
ST5	TetS1	FRACA	FORTE	FRACA	FORTE	FORTE	+	+	+β	P8
ST6	CipS1	FRACA	FRACA	FRACA	FORTE	FORTE	+	-	+α	P1
ST7	TetAO2	FRACA	MODERADA	MODERADA	FORTE	FORTE	+	+	-	P3
ST8	CipAO2	FRACA	FRACA	FORTE	FORTE	FORTE	+	-	+α	P7
ST9	TetO2	FRACA	FRACA	MODERADA	FRACA	MODERADA	+	+	-	P7
ST10	CipO2	FRACA	FRACA	FRACA	FORTE	FORTE	+	-	+α	P9
ST11	LO2	FRACA	FRACA	FRACA	MODERADA	MODERADA	+	+	-	P2
ST12	TqO2	FRACA	FRACA	FRACA	MODERADA	MODERADA	+	+	-	P5
ST13	TqD2	NÃO ADERENTE	FRACA	MODERADA	MODERADA	FORTE	-	-	-	P10
ST14	TetAS2	MODERADA	MODERADA	FORTE	FORTE	FORTE	-	-	-	P7
ST15	CipAS2	FRACA	FRACA	MODERADA	MODERADA	MODERADA	+	+	-	P2

Legendas:

TetO1: teteiras com resíduos de leite da ordenha 1;

CipO1: água do primeiro enxágue do processo Clean-in-Place (CIP), após a ordenha 1;

LO1: leite do conjunto da ordenha 1;

TetD1: teteiras, imediatamente após a detergência da ordenha 1;

TetS1: teteiras, após o sanitizante e imediatamente depois da detergência da ordenha 1;

CipS1: água do CIP após o sanitizante, imediatamente depois da detergência da ordenha 1;

TetAO2: teteiras após o sanitizante 1, sem uso por 8 horas, antes da ordenha 2;

CipAO2: água do enxague da tubulação do CIP, após o sanitizante 1, sem uso por 8 horas,

TetO2: teteiras com resíduos de leite da ordenha 2;

CipO2: água do primeiro enxágue do processo CIP, após a ordenha 2;

LO2: leite do conjunto da ordenha 2;

TqO2: tanque com resíduos após a retirada do leite do conjunto da ordenha 2;

TqD2: tanque após a detergência, na ordenha 2;

TetAS2: teteiras após a detergência 2, sem uso por 8 horas, antes do sanitizante 2 e da próxima ordenha;

CipAS2: água do CIP após a detergência 2, sem uso por 8 horas, antes do sanitizante 2 e da próxima ordenha.

5. CONCLUSÕES

O estudo da presença de *Staphylococcus aureus* e bactérias mesófilas aeróbias em ambiente de ordenha, e a capacidade das cepas formarem biofilmes e terem multirresistência, é relevante para a saúde pública e para a indústria. Neste sentido, com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- a) Mesmo após os procedimentos de higienização via sistema CIP a contaminação por bactérias mesófilas aeróbias e *S. aureus* se manteve. Entretanto, houve redução de 3,81 log¹⁰ de bactérias mesófilas pela detergentia após a ordenha, com diferença significativa;
- b) A diminuição da carga microbiana das teteiras não foi significativa em nenhuma etapa do processo de limpeza ou sanitização;
- c) Os diferentes momentos de utilização do sanitizante, imediato ao processo de detergentia, ou anterior a ordenha subsequente, 08 horas após a detergentia, não demonstraram diferença quando foram comparados entre si;
- d) Todas as cepas analisadas, de *S. aureus* isolados do ambiente de ordenha, apresentaram padrão de multirresistência aos antimicrobianos testados, com Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA) variando de 0,5 a 1,0;
- e) Os *S. aureus* apresentaram 100% de resistência à penicilina G; 93,34 % à oxacilina, cefalexina, tetraciclina, cloranfenicol, amoxicilina + ácido clavulônico e sulfazotrim; 73,33% à doxiciclina; 80% à gentamicina; 53,34% ao ceftiofur e 33,34 % à neomicina e à vancomicina;
- f) Das cepas de *S. aureus* estudadas, 93,34% (14/15) são resistentes à meticilina (MRSA) ou à oxacilina (ORSA). E 33,34% (05/15) cepas são VRSA (*S. aureus* vancomicina-resistentes) e também MRSA;
- g) Houve formação de biofilmes por 100% dos *S. aureus*, nas diferentes condições de incubação (3°C, 9°C, 25°C, 36°C e 42°C), inclusive na temperatura de refrigeração. Apenas uma amostra, oriunda do tanque após a detergentia (TqD2), não formou biofilme a 3°C, mas formou nas demais temperaturas;
- h) Das 15 cepas de *S. aureus* 13 (86,7%) formaram cápsula, 9 (60%) demonstraram presença de protease, 4 (26,7%) expressaram o fator α -hemolisina e 2 (13,3%) β -hemolisina. Duas (13,33%) cepas formaram cápsula,

presença de protease e β -hemolisina, concomitantemente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O leite está entre os alimentos mais utilizados na alimentação humana. Porém, devido à baixa qualidade da matéria prima e derivados, pode estar envolvido em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). A contaminação na ordenha pode comprometer o produto final. O perigo desta contaminação nos faz ressaltar a grande relevância de nosso trabalho, por comprovarmos a persistência de *Staphylococcus aureus* e bactérias mesófilas aeróbias, em equipamentos de ordenha, mesmo após a higienização.

Estas superfícies podem atuar como um ponto de eliminação constante de microrganismos deteriorantes e patogênicos no alimento. Nossos resultados denotam a necessidade de mais pesquisas que impulsionem as estratégias de controle higiênico-sanitário dos equipamentos utilizados no processo de ordenha, e que auxiliem a cadeia leiteira a aprimorar a qualidade do produto final, o leite.

É de extrema importância a evidência de que os *S. aureus* estudados, isolados do ambiente de ordenha e do leite, foram multirresistentes a no mínimo 6 diferentes princípios ativos de antimicrobianos, com IRMA variando de 0,5 a 1,0. Além disso, estas cepas também foram determinadas como MRSA e VRSA, ou seja, resistentes à oxacilina (metecilina) e à vancomicina, drogas de eleição para tratamento de infecções em seres humanos. Salienta-se, ainda, que além da resistência, estas mesmas cepas foram capazes de formar biofilmes em diferentes temperaturas, incluindo as de refrigeração, e possuíam outros fatores de virulência. Estes isolados podem ser considerados um risco à saúde pública, baseando-se na caracterização obtida, e na grande possibilidade destes microrganismos contaminarem seres humanos por alimentos ou por contato.

Estudos futuros são necessários para desenvolver estratégias no controle da resistência aos antimicrobianos e da formação de biofilmes. Projetos devem ser desenvolvidos para avaliar a sensibilidade ou resistência a outros fármacos, a remoção de biofilmes da tubulação de equipamentos com o uso de outros tipos de detergentes e sanitizantes no sistema *Clean in Place* (CIP), e aprimorar a análise do leite de conjunto no momento de transporte para a indústria, ainda na propriedade e no caminhão transportador. Como perspectivas futuras deste trabalho também estão os testes de capacidade de formação de biofilmes dos *S. aureus* isolados em outras superfícies, como aço inoxidável, silicone, entre outros, em diferentes condições ambientais, para avaliar a variabilidade destas cepas, com intuito de suprir uma maior exigência da cadeia leiteira por produção de leite com qualidade, e resguardar a saúde humana.

7. REFERÊNCIAS

1. Menezes JS. Ação antimicrobiana in vitro de *Psidium guajava* L. contra *Staphylococcus aureus* isolados de leite mastítico. [Dissertação]. Alfenas: Universidade José do Rosário Vellano; 2013.
2. Brito MAVP et al. Testando a qualidade do leite. In: Durães MC et al. Minas Leite. Avanços tecnológicos para o aumento da produtividade leiteira. [Anais]. Juiz de Fora, 2: Embrapa Gado de Leite, 2000. 83-94.
3. Stepanovic S, Irkovic IC, Ranin L, Svabic'-Vlahovic M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Lett. Appl. Microbiol. 2004; 38:428-432.
4. Joseph B, Otta SK, Karunasagar I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. International journal of food microbiology. 2001; 64:367-372.
5. Coelho SMO, Pereira IA, Soares LC, Pribul BR, Souza MMS. Profile of virulence factors of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. J. Dairy Sci. 2011; 94(7):3305-3310.
6. Jay JM. Microbiologia de alimentos. Porto Alegre, 6 ed.: Artmed, 2005.
7. Oliveira MM. Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos: *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enteropatogênica. [Tese]. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2011.
8. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62 de 29 de setembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e de seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União, Brasília DF, 29 de dezembro de 2011.
9. Bighetti H. Previsão de preços estagnados em 2015 trava investimentos na produção de leite. Clichóje [Internet]. Disponível em: <http://www.clichóje.com.br/noticias/Agronegocio/Previsao-de-precos-estagnados-em-2015-trava-investimentos-na-producao-de-leite>. Acesso em: 14 maio 2015.
10. Food and Agriculture Organization - FAO. Statistics Data Base. Agriculture Data of the United Nations. [Internet]. Disponível em: <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture> Acesso em 05 mar. 2014.
11. Feijó LD, Pinheiro CA, Silva ACO, Cerqueira MMOP, Souza MR, Penna CFAM. Caminhões de Coleta a Granel: Monitoramento da Qualidade do Leite, da Higienização do Mangote e da Superfície do Caminhão Tanque. In: Congresso Nacional de Laticínios. 19. [Anais]. Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2002.
12. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Estatísticas do leite: produção total de leite, sob inspeção e vacas ordenhadas no Brasil. [Internet]. Disponível em:

<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0231.php>. Acesso em 20 jan 2015.

13. Montanaro L et al. Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. *Future Microbiol.* 2011; 6:1329-1349.

14. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelos decretos nº 1.255, de 25/06/62, nº 1.236, de 02/09/94, nº 1.812, de 08/02/96 e nº 2.244, de 04/06/97. Diário Oficial da União, Brasília, 05 de junho de 1997. Seção I, p. 11555-11558.

15. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, 20 de setembro 2002. Seção I, 13-22.

16. Carraro J et al. Adequação de sistemas de produção leiteiros frente à IN-62. *Vet. e Zootec.* 2013; 20(2 Supl 1) jun:228-229.

17. Tirado C, Schimidt K. WHO Surveillance programme for control of food-borne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater. *Europe Journal of Infection.* 2001;43(1):80-84.

18. Masurani A, Tavares LC. Estudos de QSAR-3D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade frente a *Staphylococcus aureus* multirresistentes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 2007; 43(2):101-16.

19. Cardoso ALSP, Tessari ENC, Castro AGM, Kanashiro AMI. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. *Arquivos do Instituto Biológico* [Internet]. 2000; 67(1). Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V67_1/pesquisa_salmonella.htm. Acesso em: 16 jun 2015.

20. Forsythe SJ. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002. 410p

21. Oliveira GA, Levy CE, Mamizuka EM. Estudo do perfil de resistência de 626 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de 25 hospitais brasileiros entre setembro de 1995 e junho de 1997. *J. Bras. Pat. Med. Lab.*2000; 36(2):147-56.

22. Zeconi A. *Staphylococcus aureus* mastitis: what we need to know to control them. *Israel Journal of Veterinary Medicine. Formerly: Refuah Veterinarith.* [Internet] 2010; 65(3). Disponível em: http://www.isrvma.org/imagetoarticle/files/vet_eng-sept-vol65-3.pdf. Acesso em: 04 jul 2015.

23. Bradley AJ. Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal.* 2002; 164 (2):116-128.

24. Gunduz GT, Tuncel G. Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2006; 89:329-336.

25. Milkpoint. Produção de leite no Brasil deve ser de 37 bilhões de litros em 2014. [Internet]. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo>. Acesso em: 05 mai 2015.
26. Tronco VM. Manual para inspeção da qualidade do leite. Santa Maria, 2ed.: Ed. da UFSM, 2003. 192p
27. Siqueira RS. Manual de microbiologia de alimentos. Brasília: EMBRAPA, 1995. 159 p.
28. Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay JM. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. J Dairy Sci. 1994; 77: 3354-64.
29. Dogan B, Boor KJ. Growth characteristics of *Streptococcus uberis* in UHT-treated milk. Journal of Dairy Science. 2004; 87(4): 813-815.
30. Barcelos AM, Teixeira MA, Alves LS, Vieira MA, Bedim ML, Ribeiro NA. Endocardite infecciosa por *Streptococcus bovis* em paciente com carcinoma colônico. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2010; 95 (3): 88-90. [Internet]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2010001300023&lng=en. Acesso em: 03 jul 2015.
31. Becker, K., Heilmann, C. & Peters, G. (2014b). Coagulase-Negative Staphylococci. Clinical Microbiology Reviews, 27(4), 870-926.
32. Madani NB, Greenland T, Richard Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. Veterinary Microbiology. 1998; 59:139-145.
33. Houben EH, Dijkhuizen AA, Van Arendonk JA, Huirne BB. Short- and long-term production losses and repeatability of clinical mastitis in dairy cattle. J Dairy Sci. 1993; 76:2561-78.
34. Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. São Paulo, 5 ed.: Atheneu, 2005. 780 p.
35. Van Asten AJAM, Van Dijk JE. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2005; 44:251-259
36. Oulahal N. et al. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. Food Control. 2008; 19(2):178-185.
37. Farias OAC. Perspectivas do Mercado Internacional de Leite. Milkpoint 2015. [Internet]. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/artigos-especiais/2015-perspectivas-do-mercado-internacional-de-leite-93297n.aspx>. Acesso em: 14 maio 2015.
38. Bergdoll MS. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle MP (Ed). Foodborne bacterial pathogens. INC, New York, 1989. 463-523

39. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Produção Animal - 1º Trimestre de 2013. Abate de animais, produção de leite, couro e ovos. [Internet]. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201301_2.shtm. Acesso em: 09 maio 2015.
40. Melo PDC, Ferreira LM, Nader-Filho A, Zafalon LF, Godoy Vicente HI. Phenotypic and molecular analysis of biofilm production by *Staphylococcus aureus* strains isolated of bovine. Bioscience Journal. 2012; 28(1). [Internet]. Disponível em: <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/12533>. Acesso em: 04 jul 2015.
41. Hui YH, Gorham JR, Murrell KD, Cliver DO. Foodborne diseases handbook: diseases caused by bacterias. New York: Marcel Decker Inc. 1994; 613p.
42. Rodrigues LB et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. Brazilian Journal of Microbiology. 2010; 41: 1082-1085.
43. Zecconi A. Contagious mastitis control program: the *Staphylococcus aureus* case. Cattle Practice. 2006; 14:67-76.
44. Rebhun WC. Doenças do gado leiteiro. São Paulo: Editora Roca, 2000. 642p.
45. Wilson DJ, Gonzalez RN, Sears PM. Segregation or use of separate milking units for cows infected with *Staphylococcus aureus*: effects on prevalence of infection and bulk tank somatic cell count. J Dairy Sci. 1995; 78:2083-85.
46. Bramley AJ. Mastitis: physiology or pathology. Flem Vet J. 1991; 63(1):3-11.
47. Watts JL, Owens WE. Prevalence of staphylococca species in four dairy herds. Res Vet Sci. 1989; 46:1-4.
48. Van Der Mei HC, Van Der Belt-Gritter B, Pouwels PH, Martinez B, Busscher HJ. Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins – a study in recombinant lactobacilli. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2003; 28:127-134.
49. Gruet P et al. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. Advanced Drug Delivery Reviews. 2001; 50(3):245-259.
50. Swanson KMJ, Petran RL, Hanlin JH. Culture methods for enumeration of microorganisms. In: Downes FP, Ito K. (Ed.) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, 4 ed.: American Public Health Association, 2001. 53-62.
51. Vergara-Irigaray, M et al. Relevant role of FnBPs in *Staphylococcus aureus* biofilm associated foreign-body infections. Infect. Immun. 2009; 77: 3978-3991.
52. Vieira MAM. Ilhas de Patogenicidade. O Mundo da Saúde. 2009; 33(4):406-414.

53. Mansfeld F. The interaction of bacteria and metal surfaces. *Electrochimica Acta*. 2007; 52(27):7670-7680.
54. Okura MH, Rigobelo EC, Ávila FA. Isolamento e identificação de patógenos em leite cru produzido nas microrregiões do Triângulo Mineiro, MG. *ARS Veterinária*. 2005; 21(3):324-331.
55. Marschal KC. Biofilmes: na overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *American Society of Microbiology*. 1992; 58:202-207.
56. Pacheco F. Microbiologia Online com foco em: Características do *Staphylococcus aureus*. 25 de novembro de 2009. [Internet]. Disponível em: http://microbiologiaonlineblog.blogspot.com.br/2009/11/microbiologia-online-com-foco-em_25.html. Acesso em 04 ago 2015.
57. Ziebhur W, Löbner I, Krimmer V, Hacker J. Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming staphylococci. *Methods Enzymol*. 2001; 336:195-203.
58. Melchior MB et al. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin resistance in Agr-type II strains. *Vet. Microbiol*. 2009; 137:83-89.
59. Leslie KE, Dingwell RT. Background to dry cow therapy: what, where, why - is it still relevant? In: NMc Annual Meeting Fort Worth. Texas. 2003.5-17.
60. Erskine RJ, Cullor J, Schaellibaum M, Yancey B, Zecconi A. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. In: 43rd NMC Annual Meeting, Charlotte. 2004; 400-414.
61. Sfaciotte RAP et al. Detecção fenotípica e genotípica de isolados de *Staphylococcus pseudointermedius* resistentes a meticilina (MRSP) multirresistentes isolados de pequenos animais. *Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ*. 2014; 1(1):079.
62. Deminicis BB, Martins CB. Tópicos especiais em Ciência Animal III.. Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo. Alegre, 1ª Ed: CAUFES. 2014. 372p.
63. Fuster-valls N et al. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*. 2008; 19(3):308-314.
64. Timm, CD, Oliveira DS. Nova legislação do leite no Brasil. *Ciência & Tecnologia Veterinária*. [aceito para publicação]. [Internet]. Disponível em: <http://fvvet.ufpel.tche.br/inspleite/documentos/prelo/legisla.pdf>. Acesso em 04 maio 2015.
65. Tortora G et al. Doenças microbianas do Sistema Digestório. In: Tortora G. et al. *Microbiologia*. Porto Alegre, 10 ed.: Artmed, 2012. 705-742.
66. Alterthum F. Mecanismo de ação dos antimicrobianos e mecanismos de resistência. In: Trabulsi L R et al. *Microbiologia*. São Paulo ,4. ed.: Atheneu, 2005. 79-84.

67. Hoffmann F L, Coelho AR, Mansor AP, Vinturim TM. Avaliação da atividade antimicrobiana "in vitro" de dois agentes sanificantes de uso industrial. *Higiene Alimentar*. 2002; 16(94):62-67.
68. O'neill E. A novel *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. *J. Bacteriol*. 2008;190:3835-3850.
69. Silva MVM, Nogueira JL, Passos CC, Ferreira AO, Ambrósio CE. A mastite interferindo no padrão de qualidade do leite: uma preocupação necessária. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. [Internet]. 2010; VIII(14). Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/ExJ4wrjaJDV2xTJ_2013-6-25-15-12-5.pdf. Acesso em: 04 jul 2015.
70. Krumperman PH. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983; 46(1):165-170.
71. Masurani A, Tavares LC. Estudos de QSAR-3D em derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos com atividade frente a *Staphylococcus aureus* multirresistentes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2007; 43(2):101-16.
72. Conley, J. et al. Biofilm formation by group A streptococci: is there a relationship with treatment failure? *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41:4043-4048.
73. Arcuri EF. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. *Revista Leite e Derivados*. 2000; 9:40-45.
74. Boari CA, Alves MP, Tebaldi,VMR, Savian TV, Piccoli RH. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2009 out-dez; Campinas, 29(4):886-895.
75. Germano PML, Germano MIS. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimento*. São Paulo, 1 ed: Varela. 629p.
76. Frye JG, Jackson CR. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. food animals. *Frontiers in Microbiology*. 2013; 4(135):1-22.
77. Marques VF et al. Análise fenotípica e genotípica da virulência de *Staphylococcus* spp. e de sua dispersão clonal como contribuição ao estudo da mastite bovina. *Pesq. Vet. Bras*. 2013 fev.; 33(2):161-170.
78. Zottola EA. Microbial attachment and biofilm formation: A new problem for the food industry? *Food Technology*. 1994; 48:107-114.
79. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol*. 2002; 68: 2950-2958.

80. Allignet J, Aubert S, Dyke KG, El Solh N. *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the ica operon involved in biofilm formation. *Infect. Immun.* 2001; 69(2):712-718. Disponível em: <http://iai.asm.org/content/69/2/712.long>. Acesso 03 jul 2015.
81. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades Jr BAPA. *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2001; 183:2888-2896.
82. Moraes MSV, Andrade NJ, Chaves JBP, Passos FJV, Gomide LAM. Isolament of aerobic mesofilic and thermofilic spores in equipments of poultry slaughter and their resistance against the chemists disinfectants. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 1997 Sept-Dec; 17(3):325-329.
83. Corrigan RM, Rigby D, Handley P, Foster TJ. The role of *Staphylococcus aureus* surface protein SasG in adherence and biofilm formation. *Microbiol.* 2007; 153:2435-2446.
84. Velázquez-Meza ME. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. *Salud Publica de Mexico.* 2005; 47(5):381-387.
85. Mezzadri FP. Análise da conjuntura agropecuária ano 2011/12. Curitiba: DERAL/SEAB, 2012. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/leite_2012.pdf. Acesso em: 06 jul 2015.
86. Melo PDC. Estudo epidemiológico, genotípico e fenotípico de estirpes de *Staphylococcus aureus* produtoras de biofilmes isoladas do ambiente de ordenha e de casos de mastite bovina. [Tese]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2011.
87. Campoccia D, Montanaro L, Arciola RC. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials.* 2006; 27:2331-2339.
88. Zottola EA, Sasahara KC. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology.* 1994; 23:125-148.
89. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews of Microbiology.* 2002; 56:187-209.
90. Martins AS et al. Influência do transporte do leite a granel sobre a qualidade microbiológica do leite cru refrigerado - correlação entre temperatura e contagem bacteriana total. *Vet. e Zootec.* 2013 jun; 20(2 Supl 1):94-95.
91. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2001; 9:486-93.
92. Aguilar B, Iturralde M. Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. *Veterinary Microbiology.* 2001; 82(2): 165-175. [Internet]. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113501003832>. Acesso em 03 jul 2015.

93. Merino N et al. Protein A- mediated multicellular behavior in *Staphylococcus aureus*. J.Bacteriol. 2009; 191:832-843.

94. Chmielewski RAN, Frank JF. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2003; 2(1):22-32.

95. Flach J, Grzybowski V, Toniazzi G, Corção G. Adhesion and production of degrading enzymes by bacteria isolated from biofilms in raw milk cooling tanks. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2014; 34(3):571-576.

96. Hogan JS, Cornetta A, Pankey JW. Comparison of four test procedures to identify *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections. Am. J. Vet. Res. 1986; 47:2017-9.

97. Morton RD. Aerobic plate count. In: Downes FP, Ito K. (Ed.) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, 4 ed: American Public Health Association, 2001. 63-67.

98. Pengov A. *Staphylococcus aureus* - Do we really have to live with it? Slov Vet Res.2006; 43(1):41-6.

99. APHA - American Public Health Association - Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. Washington: American Public Health Association, 2013. [Internet]. Disponível em: <http://ajph.aphapublications.org/doi/abs/10.2105/MBEF.0222.008>. Acesso em 03 jul 2015.

100. Andrade NJ. Higienização na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008. 412p.

101. Bremer PJ, Fillery S, McQuillan AJ. Laboratory Scale Clean-in-Place (CIP) studies on the effectiveness of diferente caustic and acid wash steps on the removal dairy biofilms. International Journal of Food Microbiology. 2006; 106(3):254-262.

102. Herrera JJR, Cabo ML, González A, Pazos I, Pastoriza L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. Food Microbiol. 2007; 24:585-591.

103. Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução – RDC n. 14 de 28/ 02/2007, Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana: âmbito do Mercosul através da Resolução GMC n° 50/ 06, que consta em anexo à presente Resolução. Diário Oficial da União, de 05 de março de 2007.

104. Domingues PF. Desinfecção e Desinfetantes. [Disciplina: Higiene Zootécnica]. FMVZ – UNESP – Botucatu. [Internet]. Disponível em:

<http://www.fmvz.unesp.br/paulodomingues/graduacao/aula5-texto.pdf>. Acesso em 04 maio 2015.

105. Andrade NJ, Macedo JAB. Higienização na Indústria de Alimentos. São Paulo, 1. ed.: Varela, 1996. 182p.

106. Contreras CJC, Bromberg R, Cipolli KMVA, Miyagusku L. Higiene e Sanitização na indústria de carnes e derivados. São Paulo: Varela, 2002. 182p.

107. Gibson H, Taylor JH, Hall KE, Holah JT. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of applied microbiology*. 1999; 87:41-48.

108. Brasil, Ministério da Saúde. Portaria 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial da União*, Brasília, 12 de dezembro de 2011.