

**STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVO ISOLADO DE LEITE CRU DE  
TANQUES COMUNITÁRIOS**

Coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from raw milk tanks community

Fabíola Fonseca ÂNGELO<sup>1</sup>

Allan de Oliveira BARBOSA<sup>2</sup>

Tatiane Ferreira ARAÚJO<sup>3</sup>

1 Médica Veterinária, Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Professora Adjunta I da Universidade Federal da Paraíba. [fabiolangelo@yahoo.com.br](mailto:fabiolangelo@yahoo.com.br). Distrito Industrial de Mangabeira, Via Local, s/n. Quadra 252, Lote 501 58055-000-João Pessoa, PB-Brasil. Email:

2 Médico Veterinário Autônomo. [allnagrop@yahoo.com.br](mailto:allnagrop@yahoo.com.br)

3 Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos. [tatiane\\_bio@yahoo.com.br](mailto:tatiane_bio@yahoo.com.br)



## RESUMO

A presença de mastite bovina no rebanho, associada a falhas nas práticas de higiene, contribuem para a queda na qualidade do leite cru, bem como pode torná-lo impróprio para o consumo pela possível presença de enterotoxinas estafilocócicas. Neste trabalho, quantificou-se *Estafilococos* coagulase positivo (ECP) a partir dos leites de 210 produtores armazenados em sete diferentes tanques de refrigeração comunitários localizados em municípios da Zona da Mata Mineira. As amostras foram coletadas entre fevereiro e abril de 2009, seguindo plaqueamento em ágar Baird-Paker e incubação a 37 °C durante 48h. Cinco colônias apresentando características típicas para *Staphylococcus* foram isoladas e caracterizadas por métodos bioquímicos tradicionais. Os resultados mostraram que em todos os tanques avaliados (7/7) foram isolados ECP. Desses, contagens superiores a  $10^3$  UFC /mL foram encontradas em cinco tanques de expansão refrigerados, sendo que três ainda apresentaram contagens superiores a  $10^5$  UFC /mL. Estes níveis são alarmantes, uma vez que vários estudos têm demonstrado a capacidade de produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* spp. por mecanismos de detecção de quórum nas quantidades populacionais encontradas no presente trabalho. Esta alta pontuação indica problemas de contaminação de ECP no processo de ordenha, e também um indicativo de animais com mastite.

**Palavras-chave:** mastite bovina, enterotoxinas, intoxicação, estação chuvosa.

## ABSTRACT

The presence of bovine mastitis in herd, associated with failures in hygiene practices contribute to reduction in quality of raw milk, and may make it unsuitable for consumption by possible presence of staphylococcal enterotoxin. This work was quantified coagulase positive staphylococci (ECP) from the stored milk from 210 producers in seven different community cooling tanks located in cities in the Zona da Mata Mineira. Samples were collected between February and April 2009, following plating on Baird-Paker and incubation at 37 ° C for 48h. Five colonies with characteristics typical of *Staphylococcus* were isolated and characterized by traditional biochemical methods. The results showed that all tanks evaluated (7/7) were isolated ECP. Of these, counts above  $10^3$  CFU/mL were found in five expansion tanks analyzed,



and three still had counts greater than  $10^5$  CFU/mL. These levels are alarming, since several studies have demonstrated the capacity of production of enterotoxins by *Staphylococcus* spp. by quorum sensing mechanisms in the amounts found in this study population. This high score indicates contamination problems ECP milking process, and also indicative of animals with mastitis.

**Keywords:** bovine mastitis, enterotoxins, intoxication, rainy season

## 1. Introdução

O setor lácteo é um dos mais importantes do agronegócio brasileiro, empregando aproximadamente 3,5 milhões de pessoas somente na produção direta. Com a presença de mais de um milhão de propriedades rurais produtoras de leite no país, a produção anual atinge cerca de 32 bilhões de litros de leite (SANTOS et al, 2012).

Visando a garantia da qualidade da produção e a posição de destaque do Brasil como país exportador de leite e derivados e devido a influência da globalização do setor lácteo com consequente competição internacional por mercados, implementou-se no país, o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNMQL) e em consequência criou-se a Rede Brasileira de Laboratórios Centralizados de Qualidade de Leite (RBQL).

A partir do PNMQL, o governo brasileiro publicou a Instrução Normativa nº 51/2002 (IN51), revogada pela Instrução Normativa 62/2011 (IN-62) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que estabelece regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade dos diferentes tipos de leite disponíveis no mercado nacional. Além disso, fornece regulamentos técnicos para a coleta e transporte do leite refrigerado, desde o momento da ordenha até sua chegada às unidades de beneficiamento (BRASIL, 2011).

Dentre os requisitos definidos na IN62, destaca-se a coleta do leite a granel. Nesse sistema, o leite cru armazenado em tanque de expansão a 4°C por até 48 horas, é transportado para a indústria beneficiadora em tanques isotérmicos. Esse processo visa reduzir o desenvolvimento da microbiota mesofílica, dentre as quais o gênero *Staphylococcus*, que se destaca como micro-organismo patogênico, potencialmente



reconhecido como produtor de toxinas (LAFARGE et al, 2004; ARCURI et al, 2006; CHARLIER et al, 2009; SANTOS et al, 2012).

A presença de *Staphylococcus* no leite, normalmente, deve-se a fontes diversas como as mãos do ordenhador, equipamentos de ordenha e casos de mastite bovina. Dentre as espécies conhecidas de *Staphylococcus*, as pertencentes ao grupo *Staphylococcus* coagulase positivo, especialmente *Staphylococcus aureus* é considerada um dos principais patógenos da mastite bovina, sendo transmitido facilmente de um animal para outro dentro de um rebanho, e sendo o seu isolamento no leite indicativo da presença de mastite bovina (BRAMLEY et al, 1996; ZSCHÖCK et al, 2000; BOEREMA et al, 2006; OLDE RIEKERING et al, 2006; SRINIVASAN et al, 2006; OLDE RIEKERING et al, 2010).

As culturas microbiológicas utilizando leites de tanque têm sido empregadas como método barato e prático para avaliar a qualidade do leite em uma propriedade. Trata-se, portanto, de uma ferramenta útil para estimar a prevalência de patógenos causadores da mastite (OLDE RIEKERING et al, 2006).

Neste trabalho avaliou-se a presença de Estafilococos coagulase positivo (ECP) em leites armazenados em tanques de refrigeração por expansão comunitários.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Obtenção e preparo das amostras

Foram coletadas amostras de leite de sete tanques de refrigeração por expansão comunitários, correspondente ao leite cru obtido de 210 produtores de municípios localizados na Zona da Mata Mineira. As coletas foram realizadas em duplicata no período de até 24 horas após a transferência de cada leite para o respectivo tanque de expansão, os quais indicavam temperatura entre 4 e 7°C. As coletas ocorreram entre o período de fevereiro a abril de 2009, meses que apresentaram índices pluviométricos elevados na região, com média pluviométrica de 161 mm (INMET, 2013).

Cada tanque foi identificado pelas letras A, B, C, D, E, F e G. A coleta nos respectivos tanques consistiu de 500 mL de leite, retirados da parte superior e central do tanque após a agitação por 10 minutos e utilizando coletores individuais de aço



inoxidável limpo e estéril de acordo com a National Mastitis Council (NMC). As amostras foram então transferidas para frascos esterilizados e acondicionadas em caixas isotérmicas até o laboratório de Microbiologia da Universidade Presidente Antônio Carlos, Campus VI, para realização das análises microbiológicas.

Antes das análises, as amostras foram agitadas e homogeneizadas. Alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada estéril a 0,1% (p/v), sendo realizadas diluições decimais seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) em duplicata. Todas as amostras foram inoculadas e incubadas no mesmo dia da coleta.

### 2.2 Análises microbiológicas

Para a contagem de ECP, retiraram-se alíquotas de 0,1 mL das diluições preparadas, seguido de semeadura em placa contendo ágar Baird-Parker (DIFCO) pelo método “*spread plate*”. Após a incubação a 37 °C por 48 horas foram contadas colônias típicas, as quais apresentam como características morfológicas padrão: coloração negra, presença de brilho, diâmetro < 2,0 mm, delimitadas e com dois halos ao seu redor. Essas características devem-se a capacidade do micro-organismo em reduzir telurito de potássio em telureto de potássio e produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas (BAIRD-PARKER, 1962; SILVA et al, 2007).

Em seguida, cinco colônias consideradas típicas de cada isolamento, foram selecionadas para realização da coloração de Gram, teste de produção das enzimas catalase, acetoina e coagulase (AOAC, 1992; SILVA et al, 2007).

## 3. Resultados e discussão

As médias dos resultados das contagens de ECP e de *Staphylococcus* em cada um dos tanques de expansão estão apresentadas na figura 1.



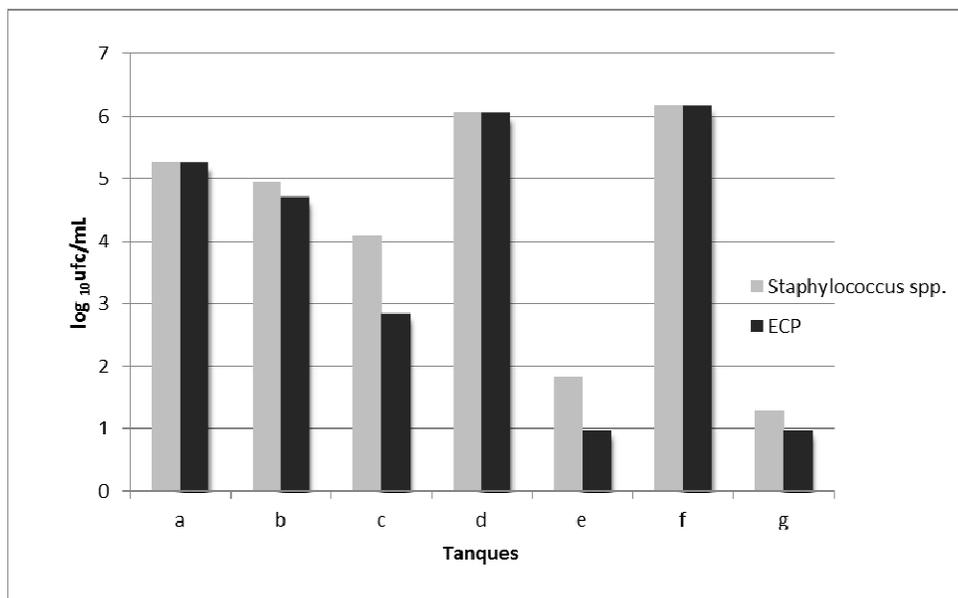


Figura 1. Contagem de *Staphylococcus* spp e estafilococos coagulase positivos (ECP) em tanques de expansão refrigerados comunitários.

Em todos os tanques de expansão avaliados (7/7), foram encontrados presença de ECP e *Staphylococcus* spp. Em estudos realizados na América do Norte e Europa a prevalência de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru variou de 31 até 100% (OLDE RIEKERING et al, 2006). No México, a presença de *Staphylococcus aureus* foi de 30% (MIRANDA-MORALES et al, 2008). Esses resultados sugerem que alguns animais do rebanho, no qual o leite foi obtido, estejam com mastite ou que haja deficiências no controle da infecção dentro do rebanho ou ainda, as vacas das quais retirou-se o leite encontram-se em condições inapropriadas de limpeza. Como as coletas das amostras foram realizadas em época quente e chuvosa, sugere-se a possibilidade dessas altas contagens serem em razão do maior desenvolvimento dessas bactérias em temperatura elevada, ou mais ainda, da impossibilidade em manter uma higiene mais adequada dos animais em virtude da grande quantidade de chuva característica da estação (MAKOVEC; RUEGG, 2003; OLDE RIEKERINK et al, 2007; ESMOLEMANY et al, 2010; ZUCALI et al, 2011).

A alta contagem de ECP encontrada no presente trabalho, o que indica a possibilidade de mastite no rebanho, pode afetar qualitativa e quantitativamente, a



produção de leite, de acordo com o relatado por diferentes autores. Isso ocorre devido aos menores teores de lactose, caseína, gordura, cálcio e fósforo e um aumento nas concentrações de cloretos, sódio, células somáticas, imunoglobulinas e lipases frequentemente observados. Estas alterações podem estar relacionadas com a redução na atividade secretória das células mamárias e ao aumento da permeabilidade do epitélio mamário, o que pode levar a transferência de componentes do sangue para o leite, incluindo citratos, bicarbonatos e íons Cl e Na. Com estas alterações, o leite torna-se inadequado para o consumo e para a produção de derivados (SANTOS, 2003; OLDE RIEKERING et al, 2006; OGOLA et al, 2007).

A presença de *Staphylococcus* indica, ainda, risco de produção de enterotoxinas resistentes à pasteurização caso o leite não seja mantido à temperatura de refrigeração (FDA, 1992).

Segundo FDA (1992), a concentração de enterotoxinas capaz de causar sintomas de intoxicação alimentar ocorre quando a contagem de *S. aureus* é superior a  $10^5$  UFC/mL. No presente trabalho, três tanques A, D e F (42,8%) apresentaram contagens totais de *Staphylococcus* spp. e ECP acima de  $10^5$  UFC/mL, sugerindo a possibilidade de intoxicações caso o leite seja consumido ou processado.

Tebaldi et al (2008) no isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários, encontraram valores de ECP (maiores que  $10^5$  UFC/mL) similares ao presente estudo. Nessas concentrações, as estirpes produtoras de toxinas liberam sinais, que ao serem reconhecidos pela população adjacente, ativam uma série de reações em cascata, para expressão de genes de toxinas, em resposta às condições do ambiente. Esse mecanismo de comunicação bacteriano é denominado *quorum sensing*, no qual, o “quorum”, ou seja, a densidade populacional é extremamente importante na regulação de diferentes fenótipos (síntese de bacteriocinas, toxinas, fatores de virulência, entre outros) (CHARLIER et al, 2009).

A estocagem do leite em tanques comunitários, apesar de ser economicamente mais viável em comunidades mais carentes, não diferencia os leites de boa qualidade, daqueles com qualidade inferior ou até mesmo impróprios para o consumo. Assim, a caracterização precisa de patógenos envolvidos com a etiologia da mastite torna-se



essencial para a detecção de métodos de transmissão entre os animais, bem como para a detecção das principais fontes de contaminação. Acrescenta-se a isso a necessidade de estudos mais amplos envolvendo não só a identificação de *S. aureus* nos leites de tanques comunitários, mas a produção de fatores de virulência, como as enterotoxinas, por parte dos micro-organismos isolados, a fim de evitar intoxicações estafilocócicas e de criar condições favoráveis para a melhoria da qualidade do leite na região. (SOUZA et al., 2012)

### Conclusão

Todos os tanques de expansão apresentaram presença de ECP e *Staphylococcus* spp. Há a necessidade de um controle mais rígido, por parte dos produtores, principalmente na época das chuvas, período em que a contaminação pode ainda ser mais alta. Embora não tenha sido realizada análise para detectar enterotoxinas estafilocócicas, a alta contagem daqueles micro-organismos sugere a possibilidade de intoxicações alimentares.

### 4. Referências bibliográficas

AOAC - Association Of Official Analytical Chemistral. **Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 11. ed. Washington: AOAC, 1992. 1115 p.

ARCURI, E. F.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, 2006.

BAIRD-PARKER, A. C., An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive *staphylococci*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 25, p. 12-19, 1962.



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

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 20 de dezembro de 2011. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 30 de dez de 2011. Seção 1.

CHARLIER, C.; CRETENET, M. ; EVEN, S.; LE LOIR, Y. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 30–39, 2009.

ELMOSLEMANY, A. M.; KEEFE, G. P.; DOHOO, I. R.; WICHTELA, J. J.; STRYHNA, H.; DINGWELL, R. T. The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 95, p. 32–40, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Rockville, Maryland, 1992. p. 12-16.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). Climatologia mapas. [online]. <[www.inmet.gov.br/climato/mapclima.html](http://www.inmet.gov.br/climato/mapclima.html)>. Nov. 2013.



LAFARGE, V.; OGIER, J. C.; GIRARD, V.; MALADEN, V.; LEVEAU, J. Y.; GRUSS, A.; DELACROIX-BUCHET, A. Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5644-5650, 2004.

MAKOVEC, J. A.; RUEGG, P. L. 2003 Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3466–3472, 2003.

MIRANDA-MORALES, R. E.; ROJAS-TREJO, V.; SEGURA-CANDELAS, R.; CARRILLO-CASAS, E. M.; GUADALUPE, M.; GONZALEZ, S.; CASTOR, R. S.; TRIGO-TAVERA, F. J. Prevalence of Pathogens Associated with Bovine Mastitis in Bulk Tank Milk in Mexico. **Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1149, p. 300-303, 2008.

OGOLA, H.; SHITANDI, A.; NANUA, J. Effect of mastitis on raw milk compositional quality. **Journal of Veterinary science**, v. 8, p. 237-241, 2007.

OLDE RIEKERINK, R. G. M.; BARKEMA, H. W.; SCHOLL, D. T.; POOLE, D. E.; KELTON, D. F. Management practices associated with the bulk-milk prevalence of *Staphylococcus aureus* in Canadian dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 97, p. 20-28, 2010.

OLDE RIEKERINK, R. G. M.; BARKEMA, H. W.; VEENSTRA, S.; POOLE, D. E.; DINGWELL, R. T.; KEEFE, G. P. Prevalence of contagious mastitis pathogens in bulk tank milk in Prince Edward Island. **Canadian Veterinary Journal**, v. 47, p. 567-572, 2006.

SANTOS, L. G. V.; FERNANDES, E. N.; SANTOS, S. S. N. S. C.; BACCHI, M. A.; SARRIÉS, G. A.; JÚNIOR, F. B. Macro, minor and trace elements in bovine milk from



two Brazilian dairy regions. **Journal Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 291, p. 207-211, 2012.

SANTOS, F. G. B.; MOTA, R. A.; SILVEIRA-FILHO, V. M.; SOUZA, H. M.; OLIVEIRA, M. B. B.; JOHNER, J. M. Q.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P.; LEAL-BALBINO, T. C. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revista Nappama**. São Paulo, v. 6, n.1, p. 19-23, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; JUNQUEIRA, N. F. A.; TANIWAK, M. A.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, 3 Ed., São Paulo: Varela, 2007, 544 p.

SOUZA, V.; FILHO, A. N.; MELO, P. C.; FERRAUDO, G. M.; FERRAUDO, A. S.; CONDE, S. O.; FOGAÇA JUNIOR, F. A. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1646-1650, 2012.

SRINIVASAN, V. SAWART, A. A.; GILLERPIE, B. E.; HEADRICK, S. I.; CEASARIS, L.; OLIVER, S. P. Characterization of enterotoxin and toxic shock syndrome genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. **NMC Annual Meeting Proceedings**, 2006.

TEBALDI, V. M.; OLIVEIRA, T. L.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 753-60, 2008.

ZSCHÖCK, M.; BOTZLER, D.; BLÖCHER, S. ; SOMMERHÄUSEN, J.; HAMANN, H. P. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (t s t) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. **International Dairy Journal**, v.10, p.569-574, 2000.



ZUCALI, M.; BAVA, L.; TAMBURINI, A.; BRASCA, M.; VANONI, L.; SANDRUCCI, A. Effects of season, milking routine and cow cleanliness on bacterial and somatic cell counts of bulk tank milk. **Journal of Dairy Research**, v. 78, p. 436-441, 2011.

