

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS

Vagner Miranda Portes

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA
MOLECULAR PARA DETECÇÃO E TRIAGEM DE
PATÓGENOS COM POTENCIAL ZONÓTICO
TRANSMITIDOS PELO LEITE BOVINO**

Florianópolis
2016

Vagner Miranda Portes

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA
MOLECULAR PARA DETECÇÃO E TRIAGEM DE
PATÓGENOS COM POTENCIAL ZOONÓTICO
TRANSMITIDOS PELO LEITE BOVINO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Portes, Vagner Miranda

Desenvolvimento de uma metodologia molecular para
detecção e triagem de patógenos com potencial zoonótico
transmitidos pelo leite bovino / Vagner Miranda Portes ;
orientador, Mário Steindel ; coorientador, Rubson Rocha. -
Florianópolis, SC, 2016.

146 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Diagnóstico molecular
- mPCR. 3. Produção leiteira. 4. Patógenos zoonóticos. 5.
Segurança do leite. I. Steindel, Mário. II. Rocha, Rubson.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

“Desenvolvimento de uma metodologia molecular para detecção e triagem de patógenos com potencial zoonótico transmitidos pelo leite bovino”

Por

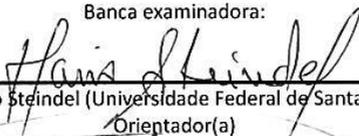
Vagner Miranda Portes

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (31/PPGBTC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.

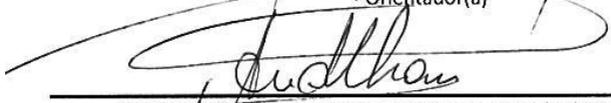


Prof(a). Dr(a). Mario Steindel
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

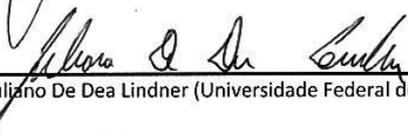
Banca examinadora:



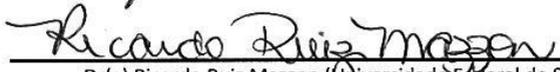
Dr(a) Mário Steindel (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



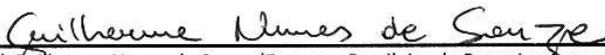
Dr(a) André Thaler Neto (Universidade do Estado de Santa Catarina)



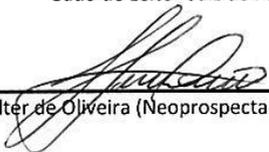
Dr(a) Juliana De Dea Lindner (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Ricardo Ruiz Mazzon (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Guilherme Nunes de Souza (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Gado de Leite - Juiz de Fora)



Dr(a) Luiz Felipe Valter de Oliveira (Neoprospecta - Microbiome Technologies)

Florianópolis, 31 de Outubro de 2016.

Dedico este trabalho aos meus pais
João Francisco e Claudete Miranda
Portes, por vislumbrarem na educação
o alicerce do futuro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao prof. Mário Steindel, por aceitar o desafio desta proposta, pela orientação, paciência, confiança e oportunidade de aprendizado e trabalho em um universo científico nobre e cético. É uma honra ter recebido seus ensinamentos, exemplo de profissionalismo, dedicação e trabalho, proporcionando-me crescimento tanto acadêmico quanto pessoal.

Aos profs. Edmundo Grisard e André Báfica pelas oportunidades de aprendizado, pelas discussões científicas sempre voltadas a incitar o espírito crítico e por ajudar a trilhar um caminho com muita maturidade e sabedoria.

À profa. Patrícia Hermes Stoco pelas discussões científicas, permanente ajuda para o desenvolvimento deste trabalho e oportunidades de grande aprendizado. Fica minha grande admiração pelo seu trabalho.

Ao prof. Álvaro Menin, colega e grande irmão, pelas discussões científicas fundamentais para realização deste trabalho desde sua idealização. É uma satisfação poder conviver com uma pessoa tão focada e dedicada ao trabalho.

À Greicy, Ana Paula, Jair, Milene, Carine, Aninha, Lais e Carime pela ajuda permanente e compartilhamento de problemas na condução dos experimentos fundamental na realização deste trabalho. A todos que fazem parte ou tiveram sua passagem na “Equipe Proto”, pela ajuda e convivência. Pessoas fantásticas, que muito me auxiliaram e fizeram parte deste período tão enriquecedor, contribuindo para realização deste trabalho.

Aos meus pais Claudete e João, por toda a ajuda, carinho e amor, pela preocupação e palavras de apoio, mesmo de longe, pelas privações dos momentos de convivência necessárias nesta longa caminhada de formação profissional. Vocês são meu alicerce e maior exemplo de vida.

À minha noiva, Thaise, presente em todos os momentos desta caminhada, com compreensão e companheirismo. Por me confortar nos momentos difíceis. Pelo eterno sorriso e amor.

À minha irmã Vanessa, ao Lucas, e a pequena Luiza, pelo carinho, amizade, apoio e compreensão.

À Epagri, pela oportunidade de formação e realização profissional.

Ao Centro de Pesquisa para Agricultura Familiar – Epagri/CEPAF pela logística para coletas a campo e conservação de amostras.

Ao colega Rubson Rocha, exemplo de profissionalismo e competência por me acompanhar neste período de pós-graduação como coorientador.

Aos companheiros Felipe, Zeno e Milto, pela amizade, parceria e por tornar viável as coletas no campo.

Ao Laboratório Vertá na pessoa da Carolina Reck e sua equipe, pela estrutura e auxílio na realização dos ensaios microbiológicos e sorológicos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo apoio financeiro ao projeto “Detecção e triagem de patógenos zoonóticos transmitidos pelo leite bovino no Oeste de Santa Catarina” (Edital Universal 04/2012 FAPESC), que possibilitou a condução desta pesquisa e ao CNPq pelo apoio financiamento.

À Embrapa, pela bolsa de auxílio concedida, através do sistema OEPAS.

As empresas de laticínio que oportunizaram a amostragem e aos produtores de leite que muito gentilmente autorizaram a realização da coleta de amostras em suas propriedades, essenciais para realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação Biotecnologia e Biociência e a UFSC pela oportunidade de formação profissional e crescimento científico.

A vocês e a todos que de uma forma ou outra colaboraram com o desenvolvimento desta pesquisa, meu profundo agradecimento.

Muito Obrigado!!!

“Pensar globalmente, agir localmente”.
(Frank Feather)

RESUMO

O leite se destaca como importante produto do agronegócio catarinense e brasileiro por sua importância econômica e social. A globalização do mercado promoveu investimentos em produtividade e qualidade composicional, mas ainda há negligência para com a biossegurança do leite como alimento. Na rotina da cadeia láctea não existe uma metodologia para identificação e triagem rápida de patógenos de importância em saúde pública e, os métodos tradicionais são laboriosos, demorados e pouco eficientes. Dados epidemiológicos sobre a circulação de agentes zoonóticos em rebanhos leiteiros são escassos, bem como informações sobre ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Neste contexto, desenvolvemos e avaliamos um método analítico via PCR multiplex para detecção simultânea de seis patógenos com potencial zoonótico, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., em leite. O método compreende uma etapa de concentração da amostra, posterior enriquecimento em cultura por 8 horas/ 37°C, seguido de tratamento térmico para extração do DNA e amplificação de genes espécie específicos. O limite de detecção analítica do método proposto foi 100 fg de DNA genômico purificado por reação e 10⁰ CFU.mL⁻¹ em leite contaminado, exceto para *B. abortus* (10⁴ CFU.mL⁻¹). A comparação do método desenvolvido com testes de referência para o diagnóstico de cada patógeno, em amostras de leite de tanques resfriadores, mostrou eficiência diagnóstica semelhante (p McNemar > 0,05) e concordância entre os testes, kappa de 0,81 a 1,00, para *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* (p > 0,0001), kappa de 0,61 a 0,80 para *L. monocytogenes* (p > 0,0001), kappa de 0,21 a 0,40 para *B. abortus* (p > 0,0001) e insignificante (kappa 0,00 a 0,20) para *Salmonella* spp., mostrando eficiência, rapidez e baixo custo do método proposto. A elevada ocorrência de *S. aureus* (86,3%) e *S. agalactiae* (39,2%) observada em leite de tanques (n = 102), pode ser o principal obstáculo para a não obtenção dos limites legais de qualidade do leite em muitas propriedades catarinenses. A identificação de *L. monocytogenes* em 11,8% das unidades de produção, alerta para o risco na saúde pública de uma enfermidade negligenciada. No levantamento epidemiológico de patógenos em vacas lactantes (n = 1077), realizado por metodologia de referência, *S. aureus* foi identificado como principal agente infeccioso com potencial zoonótico em circulação, enquanto que em 0,46% das vacas foram detectados anticorpos anti-brucelas lisas. Em conjunto, nossos resultados mostram que o método desenvolvido poderá ser uma

importante ferramenta na detecção de infecções com potencial zoonótico em bovinos leiteiros e contribuir para a implementação de estratégias racionais de vigilância e controle de patógenos de interesse no agronegócio do leite e na saúde pública.

Palavras-chave: Patógenos zoonóticos. Produção leiteira. Segurança do leite. Leite do tanque. Levantamento epidemiológico.

ABSTRACT

Milk stands out as an important agribusiness product for Santa Catarina and Brazil due to its economic and social importance. Market globalization promotes investments in productivity and composition quality. However there is lack of biosecurity scrutiny for milk as food. In the dairy chain routine there is no methodology available for rapid screening and identification of pathogens of public health importance, as traditional methods are laborious, time consuming and have low efficiency. Moreover, epidemiological data on the circulation of zoonotic agents in dairy cows, as well as information on the occurrence of milk-borne disease are scarce. In this context, we have developed and evaluated a multiplex PCR analytical method for simultaneous detection in milk of six pathogens with zoonotic potential, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. The method comprises a sample concentration step, culture enrichment for 8 hours/ 37°C, followed by heat treatment for DNA extraction and amplification of species-specific genes. The analytical limit detection of the proposed method was of 100 fg of purified genomic DNA per reaction and 10^0 CFU.mL⁻¹ in infected milk, except for *B. abortus* (10^4 CFU.mL⁻¹). The comparison of the proposed method with reference tests for the diagnosis of each pathogen in cooled milk tank samples showed similar diagnostic efficiency (p McNemar > 0.05) and concordance between tests, kappa 0.81 to 1.00, *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* (p < 0.0001), kappa 0.21 to 0.40 for *L. monocytogenes* (p > 0.0001), kappa 0.21 to 0.40 for *B. abortus* (p > 0.0001) and a nonsignificant (kappa 0.00 - 0.20) for *Salmonella* spp., showing efficiency, speed and low cost of the proposed method. The high incidence of *S. aureus* (86.3%) and *S. agalactiae* (39.2%) in milk tanks (n = 102), may be the main obstacle for not obtaining the legal limits milk quality in many farms in Santa Catarina. The identification of *L. monocytogenes* in 11.8% of the farms alerts for the public health risk of a neglected disease. In epidemiological survey of pathogens in dairy cows (n = 1077), by reference methodology assays, *S. aureus* was identified as the main infectious agent with zoonotic potential whereas 0.46% of cows were detected anti-smooth *Brucella* antibodies. Taken together, our results reveal that the proposed mPCR may be an important tool for detection of zoonotic pathogens infections in dairy cattle and contribute to the implementation of rational strategies for monitoring and control of pathogens of interest in the milk agribusiness and public health.

Keywords: Zoonotic pathogens. Multiplex PCR. Dairy production. Milk safety. Bulk tank milk. Epidemiologic survey.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Perfil etiológico da mastite bovina em rebanhos leiteiros do Oeste de Santa Catarina, 2010-2011. 38
- Figura 2 – Microrganismos de referência usados como controle em provas diagnósticas. A: Cepas ATCC em caldo BHI com 50% de glicerol para conservação - 20°C e - 80°C. B, C e D: Morfologia de colônia das cepas padrão em ágar sangue (24 horas, 37°C), sendo 1 - *Staphylococcus aureus*, 2 - *Streptococcus agalactiae*, 3 - *Escherichia coli*, 4 - *Listeria monocytogenes*, 5 - *Salmonella* spp. 6 - *Brucella abortus* Cepa S19. E: Colônias de *Brucella abortus* Cepa S19 em ágar sangue (72 horas, 37°C). 49
- Figura 3 – Mapa de localização mesorregional e georreferenciamento das unidades de produção leiteira amostradas entre 2015-2016 no Oeste Catarinense. 60
- Figura 4 – Procedimentos de coleta de material biológico: sangue total venoso através de punção da veia coccígea. 62
- Figura 5 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando a especificidade dos produtos amplificados via PCR usando como molde uma mistura de DNA genômico a 1,0 ng de cada uma das seis espécies bacterianas testadas. Canaletas: 1 - padrão de peso molecular (pUC digerido com *HaeIII* – Anexo A); 2 e 8 - *S. agalactiae*, 123 pb; 3 - *E. coli*, 468 pb; 4 - *L. monocytogenes*, 133 pb; 5 - *Salmonella* spp. 237 pb; 6 - *B. abortus*, 311 pb; 7 - *S. aureus*, 894 pb; 9 - controle negativo (água Milli-Q). 66
- Figura 6 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, representativo da sensibilidade dos iniciadores da PCR utilizando diferentes concentrações de DNA genômico, extraído de culturas puras. Canaleta: 1 - padrão de peso molecular (pUC digerido com *HaeIII*); 2 - 100 ng; 3 - 10 ng; 4 - 1,0 ng; 5 - 100 pg; 6 - 10 pg; 7 - 1,0 pg; 8 - 100 fg; 9 - 10 fg e 10 - 1,0 fg. 67
- Figura 7 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, representativo da otimização da reação de PCR multiplex para detecção dos seis patógenos zoonóticos de interesse, usando como molde uma mistura de DNA genômico a 1,0 ng de cada espécie bacteriana. Gel A, canaletas: 1 – controle negativo; 2 – padrão de peso molecular (100bp DNA *Ladder*) e 3 – mPCR identificando simultaneamente *S. aureus* produto de 894 pb, *E. coli* 468 pb, *B. abortus* 311 pb, *Salmonella* spp. 237 pb, *L. monocytogenes* 133 pb e *S. agalactiae* 123 pb. Gel B, canaletas: 1 e 4 – controle negativo; 2 – mPCR e 3 – padrão de peso molecular (pUC digerido com *HaeIII*). 69

Figura 8 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, representativo mostrando o efeito de diferentes aditivos na eficiência da reação de mPCR utilizando como molde o DNA extraído por fervura a partir de um cultivo de 8 horas em BHI, inoculado com 10 µL de leite contaminado com um mistura de 10³ UFC.mL⁻¹ de cada microrganismo. Canaletas: 1 – padrão de peso molecular (pUC digerido com *Hae*III); 2 – Q-solution (Betaína) 5X; 3 – mPCR sem aditivos; 4 – Formamida 1,25%; 5 – DMSO 5%; 6 – BSA 5%; 7 – Glicerol 5%; 8 – Controle positivo (DNA a 1 ng); 9 – Controle negativo..... 70

Figura 9 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando os resultados de amplificação dos genes de interesse em PCR individual e mPCR a partir de leite contaminado. DNA extraído por lise térmica foi usado como molde. Canaletas: 1 – padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder); 2 - *S. aureus*, 894 pb; 3 - *E. coli*, 468 pb; 4 - *B. abortus*, 311 pb; 5 - *Salmonella* spp., 237 pb; 6 - *L. monocytogenes*, 133 pb; 7 - *S. agalactiae*, 123 pb; 8 – mPCR identificando simultaneamente os 6 patógenos; 9 - controle negativo (água Milli-Q) e 10 - controle positivo (DNA 1,0 ng). 71

Figura 10 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando os resultados da mPCR em leite contaminado experimentalmente com diferentes misturas de bactérias padrão. A reação foi realizada conforme descrito anteriormente. Canaleta 1 – padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder); 2 – 11 leite contaminado com diferentes misturas bacterianas, sendo: 2 – *S. aureus* (894 pb), *E. coli* (468 pb), *B. abortus* (311 pb), *Salmonella* spp. (237 pb), *L. monocytogenes* (133 pb), *S. agalactiae* (123 pb); 3 – *E. coli*, *B. abortus*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. agalactiae*; 4 – *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. agalactiae*; 5 – *S. aureus*, *B. abortus*, *L. monocytogenes*; 6 – *E. coli*, *L. monocytogenes*; 7 – *E. coli*; 8 – *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*; 9 – *L. monocytogenes*, *S. agalactiae*; 10 – *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. agalactiae*; 11 – *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. agalactiae*; 12 – Controle negativo (água Milli-Q); 13 – Controle positivo (DNA a 1,0 ng). 72

Figura 11 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando a sensibilidade analítica da mPCR, a partir de DNA genômico extraído de culturas puras, em diluições de 10 ng – 1,0 fg. Canaletas: 1 – padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder); 2 – 10 ng; 3 – 1,0 ng; 4 – 100 pg; 5 – 10 pg; 6 – 1,0 pg; 7 – 100 fg; 8 – 10 fg; 9 – 1,0 fg de DNA de cada microrganismo; 10 – Controle negativo..... 73

Figura 12 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando a sensibilidade analítica da mPCR a partir da concentração de células bacterianas sem extração prévia de DNA. Diluições de uma mistura de quantidades equivalentes das seis bactérias estudadas, sem extração de DNA, foram usadas como molde. Canaletas: 1 – padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder); 2 - 8 diferentes concentrações bacterianas, sendo: 2 – 10^5 ; 3 – 10^4 ; 4 – 10^3 ; 5 – 10^2 ; 6 – 10^1 ; 7 – 10^0 ; 8 – 10^{-1} bactérias. μL^{-1} ; 9 – controle negativo e 10 – controle positivo (DNA 1,0 ng). 74

Figura 13 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando a sensibilidade analítica da mPCR em leite contaminado. Canaleta 1 – padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder); canaletas 2 a 9 - leite contaminado, sendo: 2 – 10^6 UFC. mL^{-1} ; 3 – 10^5 UFC. mL^{-1} ; 4 – 10^4 UFC. mL^{-1} ; 5 – 10^3 UFC. mL^{-1} ; 6 – 10^2 UFC. mL^{-1} ; 7 – 10^1 UFC. mL^{-1} ; 8 – 10^0 UFC. mL^{-1} ; 9 – 10^{-1} UFC. mL^{-1} de cada bactéria; 10 – controle negativo (CN) da reação; 11 – controle positivo (CP) (DNA a 1,0 ng. μL^{-1}); 12 – CN do leite, 13 – CN do BHI; 14 – CN água Milli-Q; 15 – CP do inóculo. 75

Figura 14 – Curvas de crescimento bacteriano em caldo BHI. A – Curvas de crescimento das bactérias padrão em 24 horas. B – Curva de crescimento de uma cultura inoculada com concentrações iguais dos 6 patógenos em estudo. C – Média da curva de crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* em 24 horas. D – Curvas de crescimento de *B. abortus* em dois diferentes meios de cultura em 80 horas. 78

Figura 15 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando o tempo necessário de pré-enriquecimento em caldo BHI para iniciar a detecção por mPCR dos patógenos estudados. A reação foi realizada conforme descrito anteriormente. Canaleta 1 - padrão de peso molecular (pUC digerido com *HaeIII*); Canaletas 2 – 9: tempo de cultivo em BHI, 2 a 9 horas respectivamente; 10 – controle positivo do inoculo inicial 10^8 UFC. mL^{-1} de cada bactéria, 11 – controle negativo do meio de cultura (BHI); 12 – controle positivo (DNA a 1,0 ng); 13 – controle negativo da reação. 79

Figura 16 – Perfil microbiológico de patógenos isolados de glândula mamária em rebanhos leiteiros no Oeste de Santa Catarina, 2015 – 2016. A – Frequência de amostras com e sem isolamento de microrganismos em 48 horas de incubação (n= 1077). B – Frequência relativa dos principais patógenos dentre os isolados positivos (n= 887). C – Prevalência estima dos principais patógenos isolados (n= 1077)..... 85

Figura 17 – Prevalência de animais com anticorpos anti-brucelas lisas em rebanhos leiteiros comerciais do Oeste Catarinenses, 2015 – 2016. A – Prevalência de animais positivos. B – Frequência relativa de rebanhos positivos. C – Percentual de animais positivos em rebanhos com a enfermidade..... 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Microrganismos de referência utilizados como controles em experimentos.	48
Tabela 2 – Conjunto dos iniciadores de PCR utilizados neste estudo... 51	
Tabela 3 – Discriminação da concentração de cada bactéria, por amostra (A-P), utilizada no experimento duplo-cego.	57
Tabela 4 – Amostragem de acordo com o número de vacas em lactação no rebanho.	61
Tabela 5 – Especificidade dos iniciadores na reação de mPCR frente ao DNA genômico de diferentes espécies bacterianas.....	76
Tabela 6 – Resultado da validação analítica da mPCR desenvolvida, por análise em duplo-cego de amostras de leite contaminadas (A – P) com diferentes combinações de concentrações (UFC.ml ⁻¹) dos patógenos investigados.....	80
Tabela 7 – Rendimento diagnóstico do teste multiplex PCR, comparado com o padrão-ouro para cada um dos patógenos alvo individualmente, utilizando 102 amostras de leite de tanques de expansão de unidades produtoras comerciais do Oeste Catarinense, 2015-2016.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius
µg – Micrograma
µL – Microlitro
2-ME – 2 Mercaptoetanol
A – Adenina (DNA e RNA)
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC – American Type Culture Collection
BHI – Caldo de Infusão Cérebro e Coração
BLAST - Basic Local Alignment Search Tool
BSA – Albumina de Soro Bovina
C – Citosina (DNA e RNA)
CC – Cepas de Campo
CCS – Contagem de Células Somáticas
CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
Codex – Comissão do Codex Alimentarius
CPP – Contagem Padrão em Placa
D.O.600 – Densidade Óptica em comprimento de onda de 600 nm
DIVE-SC – Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
dNTP – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
DSe – Sensibilidade Diagnóstica
DSp – Especificidade Diagnóstica
DTAs – Doenças Transmitidas por Alimentos
ELISA- Ensaio de Absorção Imunoenzimático
FAO – Organização para Agricultura e Alimentação das Nações Unidas
fg – Femtograma
FIL – Federação Internacional de Laticínios
G – Guanina (DNA e RNA)
IgG – Imunoglobulina G
kV – Quilovolt
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg – Miligramas
min – Minuto
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
mM – Milimolar
mPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex
MRSA – *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina

NaCl – Cloreto de Sódio
ng – Nanograma
nm – Nanômetros
NMC – *National Mastitis Council*/ Conselho Nacional de Mastite dos Estados Unidos
OIE – Organização Internacional de Epizootias/ Org. Mundial de Saúde Animal.
OMC – Organização Mundial do Comércio
OMS – Organização Mundial de Saúde
pb – Pares de Base
PBS – Tampão Salina Fosfato
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
pg – Picograma
PIB – Produto Interno Bruto
pmol – Picomol
PNCEBT – Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina
qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA - Ácido Ribonucleico
RNase – Enzima Ribonuclease
RVN – Razões de Verossimilhanças Negativa
RVP – Razões de Verossimilhanças Positivas - Segundo
SAR – Soroaglutinação Rápida em Placa
SAT – Soroaglutinação Lenta
SCN – *Staphylococcus* Coagulase Negativa
SCP – *Staphylococcus* Coagulase Positiva
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
Se – Sensibilidade Analítica
SEN – *Streptococcus* Esculina Negativa
SEP – *Streptococcus* Esculina Positiva
Sp – Especificidade Analítica
T – Timina (DNA)
Taq DNA polimerase – DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*
TBE – Solução tampão de Tris, Ácido Bórico e EDTA.
TCLE – Tremo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSA – Ágar Triptona de Soja
TSB – Caldo Triptona de Soja
U – Unidade

UFC – Unidade Formadora de Colônia

USDA – *United States Department of Agriculture*/ Ministério da Agricultura dos Estados Unidos

UV – Radiação Ultravioleta

V – Volt

VNC – Viável, mas Não Cultivável

VPN – Valores Preditivos Negativo

VPP – Valores Preditivos Positivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DA LITERATURA	31
2.1	IMPORTÂNCIA DA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE	31
2.2	LEITE COMO VEÍCULO DE INFECÇÕES ZONÓTICAS	32
2.3	PATÓGENOS ZONÓTICOS E O IMPACTO NO SETOR PRODUTIVO DA CADEIA LÁCTEA.....	37
2.4	DIAGNÓSTICO DE AGENTES INFECCIOSOS ZONÓTICOS E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA	41
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVO GERAL:	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	47
4.2	MICROORGANISMOS E SOROS DE REFERÊNCIA	47
4.2.1	Cepas bacterianas, conservação e crescimento em cultura	47
4.2.2	Soros de referência	50
4.3	PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA MOLECULAR	50
4.3.1	Oligonucleotídeos iniciadores	50
4.3.2	Extração do DNA genômico bacteriano	51
4.3.3	Padronização da Reação de PCR individual.....	52
4.3.4	Avaliação da eficiência e do limite de detecção dos iniciadores de PCR.....	53
4.3.5	Confirmação da identidade dos produtos amplificados por PCR.....	53
4.3.6	Padronização e Otimização da Reação de PCR multiplex....	54
4.4	CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO DESENVOLVIDO	55
4.4.1	Avaliação da sensibilidade analítica da mPCR.....	55
4.4.2	Avaliação da especificidade analítica da mPCR.....	56
4.4.3	Determinação do tempo de pré-enriquecimento.....	56
4.4.4	Validação analítica experimental do sistema de diagnóstico molecular proposto.....	56
4.5	VALIDAÇÃO DO METODO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE CAMPO	58
4.6	TESTE DE REPRODUTIBILIDADE PRELIMINAR DA mPCR.....	59

4.7	DETERMINAÇÃO DOS AGENTES ZONÓTICOS CIRCULANTES.....	59
4.7.1	População estudada.....	59
4.7.2	Obtenção de amostras biológicas.....	61
4.7.3	Deteção dos agentes zoonóticos circulantes.....	62
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
5	RESULTADOS.....	65
5.1	DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	65
5.1.1	Avaliação dos iniciadores da PCR.....	65
5.1.2	Confirmação da identidade dos produtos de amplificação....	67
5.1.3	Padronização do método analítico (mPCR).....	68
5.1.4	Otimização da mPCR para deteção de patógenos em leite..	69
5.2	CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA.....	73
5.2.1	Sensibilidade analítica da mPCR.....	73
5.2.2	Especificidade analítica da mPCR.....	75
5.2.3	Tempo de enriquecimento prévio.....	77
5.2.4	Validação analítica do sistema de diagnose desenvolvido para patógenos em leite.....	79
5.3	CARACTERIZAÇÃO DIAGNÓSTICA DA mPCR EM AMOSTRAS DE CAMPO.....	81
5.4	LEVANTAMENTO DOS PATÓGENOS ZONÓTICOS CIRCULANTES.....	83
5.4.1	Perfil microbiológico de patógenos em leite.....	84
5.4.2	Prevalência de animais com anticorpos anti-brucelas lisas em rebanhos leiteiros.....	86
6	DISCUSSÃO.....	89
7	CONCLUSÕES.....	107
	REFERÊNCIAS.....	109
	APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	139
	APÊNDICE B – Organograma do isolamento e identificação microbiológica em leite bovino proveniente de tanque de expansão.....	142
	APÊNDICE C – Organograma do isolamento e identificação microbiológica de <i>salmonella</i> spp. em leite bovino proveniente de tanque de expansão.....	143

APÊNDICE D – Organograma do isolamento e identificação microbiológica em leite bovino	144
ANEXO A – Protocolo LMW - padrão molecular de baixo peso .	145
ANEXO B – Organograma das fases do desenvolvimento e validação de um novo teste diagnósticas - OIE (2014)	146

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio do leite ocupa espaço de destaque na economia global. O Brasil está entre os quatro maiores produtores mundiais de leite, apresentando produção crescente e acelerada há mais de uma década. Este sistema agroindustrial é um dos mais expressivos do país (CEPEA, 2011), marcado pela ênfase social, devido à característica de produção familiar, quadro este relevante no estado de Santa Catarina (EPAGRI, 2012). Além da importância para a economia nacional, destaca-se sua relevância na alimentação humana, com reflexos possíveis à saúde pública do país.

Em decorrência da globalização a busca por competitividade na cadeia láctea tem promovido investimentos constantes em produtividade e qualidade composicional, porém há negligência para com a biossegurança do leite como alimento. Cenários atuais convergem para um panorama no qual o Brasil tende a gerar excedentes na produção de lácteos. Neste contexto, a biossegurança dos alimentos em futuro próximo pode se tornar uma barreira sanitária para comercialização destes produtos (PORTES; THALER NETO; SOUZA, 2012), limitando o crescimento da produção de leite no país (MONARDES, 2004).

Atualmente, cerca de um terço do leite produzido no Brasil não passa por tratamento que promovam redução de riscos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012), e há escassez de informações sobre a epidemiologia das doenças transmitidas por alimentos (SANTANA et al., 2010). Embora não existam dados epidemiológicos consistentes e sistematizados, vários surtos de toxinfecções alimentares nos quais leite ou derivados estavam envolvidos, foram registrados na literatura (CÂMARA, 2002; CATÃO; CEBALLOS, 2001; FAPEMIG, 2002; MARTINS VIEIRA et al., 1998; RUEGG, 2003; VAN DER POEL, 2001). Resultados de estudos alertam para os potenciais riscos à saúde da veiculação de microrganismos zoonóticos pelo leite não pasteurizado e seus derivados (ARCURI et al., 2010; GUIMARÃES; LANGONI, 2010; HOFFMANN et al., 2014; LAW et al., 2015; ROCHA et al., 2014; SELEEM; BOYLE; SRIRANGANATHAN, 2010; SILVA, M. R. et al., 2007; SILVA, M. R. et al., 2013; WENDLANDT; SCHWARZ; SILLEY, 2013).

Na cadeia do leite não existe um monitoramento de patógenos zoonóticos, pois os métodos tradicionais para sua detecção são trabalhosos e demorados, além de apresentarem baixa sensibilidade, visto que a maioria dos agentes são fastidiosos e têm crescimento prejudicado pela presença de resíduos de antibióticos e/ou pela ineficiência logística de uma rede laboratorial, além da possibilidade de não cultivabilidade ou

não viabilidade do momento celular (RADOSTITIS et al., 2000; SANTOS, M. V.; FONSECA, 2007; TAPONEN et al., 2009). Ademais, estudos buscando a detecção de patógenos em leite com enfoque em rebanho são escassos na literatura.

Apesar da crescente importância da cadeia produtiva do leite para o País e principalmente para o estado de Santa Catarina, pouco se tem evoluído no sentido de reduzir as perdas econômicas decorrentes de problemas sanitários nos rebanhos e garantir segurança alimentar para o produto ofertado ao consumidor. Estes fatos apontam para a necessidade urgente do controle de patógenos zoonóticos transmissíveis pelo leite, para garantir a biossegurança dos alimentos e competitividade da cadeia produtiva do leite em nível regional e nacional.

Em conjunto as evidências ressaltam a necessidade de uma ferramenta diagnóstica eficiente para identificação e monitoramento de patógenos de importância zoonótica em leite, permitindo estudar a circulação destes agentes na cadeia láctea, gerando informações úteis na tomada de decisão em vigilância e controle epidemiológico tanto em saúde pública quanto em sanidade animal, além de servir como instrumento de avaliação de risco na cadeia de produção de derivados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE

O agronegócio voltado à produção de leite ocupa destacado espaço na economia mundial e representa entre 8,5% e 10,5% do valor total da produção agrícola anual (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 2013). O setor leiteiro brasileiro conquistou lugar de destaque na cadeia pecuária e no cenário econômico do país, passando de uma produção de 15 bilhões de litros por ano no início dos anos 90, para 34,4 bilhões de litros em 2013, destacando-se como o quarto produtor mundial (EPAGRI, 2012; 2016; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2009).

A atividade leiteira é praticada em mais de um milhão de propriedades rurais, gerando mais de quatro milhões de empregos diretos na produção primária e agrega mais de 35 bilhões de reais à produção agropecuária nacional (CEPEA, 2011; EPAGRI, 2016; MÜLLER, 2002). O leite está entre os seis produtos mais importantes do agronegócio brasileiro, à frente de setores importantes como o da siderurgia e o da indústria têxtil (BARBOSA et al., 2002).

A produção de leite tem grande importância para a economia do Estado de Santa Catarina, especialmente para a pequena propriedade rural. Prova disso é o constante incremento da produção no Estado, que no período de 2000 a 2013 cresceu 191% (EPAGRI, 2012; 2016). Atualmente o Estado continua ganhando espaço no cenário nacional, sendo o 5º maior produtor, com aproximadamente 8,5% da produção brasileira (EPAGRI, 2014; 2016). A produção se caracteriza por pequenas propriedades, fazendo da atividade o principal pilar da agricultura familiar, em especial na região Oeste que é responsável por 73,9% da produção estadual de leite (EPAGRI, 2014).

O Brasil vem se consolidando como potencial exportador de alimentos, apresentando um crescimento médio de 4,1% na produção anual de leite nos últimos dez anos. Em Santa Catarina o crescimento deste índice é de 8,6%, incrementando os excedentes de produção de leite, normalmente destinados ao mercado de outros estados brasileiros (EPAGRI, 2014; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012). Este aumento, nos últimos anos foi absorvido pela elevação do consumo, em decorrência do aumento no poder aquisitivo da população, porém este fato está se alterando com a crise político-econômica em que se encontra o país. Portanto, não é possível estimar o limite do mercado interno em absorver a produção que cresce

em ritmo constante e acelerado. Neste sentido há uma exigência de que o país produza leite com segurança e qualidade, para ser competitivo no mercado globalizado.

Além da importância para a economia nacional, destaca-se a sua relevância na alimentação humana, com reflexos diretos na saúde da população (GUIMARÃES; LANGONI, 2010). O consumo médio dos brasileiros em equivalente leite fluido, foi de 171 litros em 2012, com um crescimento acumulado de cerca de 33% na última década (EPAGRI, 2014).

Em contraste, uma importante questão que vem preocupando autoridades, lideranças e pesquisadores, é a qualidade do leite produzido no Brasil. O leite sem qualidade e inocuidade¹ causa grandes perdas econômicas ao setor, representa um risco à saúde pública, inviabilizando a conquista de mercados mais lucrativos e compromete a credibilidade da cadeia produtiva como um todo (DÜRR; ANTONI; TOMAZI, 2005). Além disso, não se pode falar em qualidade de vida da população de um país, sem falar da qualidade dos alimentos que essa população consome.

Neste sentido, ter um rebanho sadio é uma das premissas para se produzir leite com qualidade (PORTES; THALER NETO; SOUZA, 2012). O levantamento e o monitoramento de informações epidemiológicas sobre agentes que impactam tanto na saúde pública, quanto na sanidade animal, é de suma importância para auxiliar na tomada de decisões na cadeia do leite, rumo ao incremento da produtividade e biosseguridade (PROGRAMA DE ZONÓSES - REGIÃO SUL, 2010)

2.2 LEITE COMO VEÍCULO DE INFECÇÕES ZONÓTICAS

O leite e os produtos lácteos representam uma das mais importantes fontes de nutrição e energia da humanidade e como a maioria dos produtos de origem animal, quando não biosseguro, pode ser veículo potencial para uma série de agentes infecciosos de caráter zoonótico com importante impacto na saúde pública.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) conceitua zoonose como doença infecciosa transmissível de animais vertebrados ao homem. Estudos recentes mostram que 62% dos 1.415 agentes infecciosos conhecidos podem ser transmitidos entre animais e seres humanos (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014a; WHO, 2002). A proteção ao estado de saúde animal e humano é um dever das nações

¹ Inocuidade é a característica ou propriedade dos alimentos de não causar dano a saúde do consumidor.

federativas para sustentabilidade do desenvolvimento global (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2013).

Leite e derivados são excelentes meios para o desenvolvimento tanto de microrganismos desejáveis, quanto de indesejáveis (patogênicos ou deteriorantes) (TEUBER, 1992), necessitando de cuidados específicos desde sua produção até o consumo (BELOTI, 2015a). A transmissão de patógenos zoonóticos para humanos, através do leite e derivados, pode decorrer do consumo de produtos lácteos crus, de erros na pasteurização, da contaminação de produtos lácteos por patógenos resistentes ao calor, da contaminação destes por patógenos zoonóticos pós-processamento ou até da adulteração fraudulenta do leite (RUEGG, 2003; RUUSUNEN et al., 2013; WHO, 2002). O animal infectado também é fonte potencial de infecção direta para humanos (GUIMARÃES; LANGONI, 2010; RUEGG, 2003). A emergência de resistência antimicrobiana em patógenos zoonóticos é outra ameaça potencial para a saúde humana (RUEGG, 2003). A alta prevalência de infecções intramamárias subclínicas (95%) em bovinos é um agravante que pode facilitar a veiculação de patógenos pelo leite.

Nas últimas décadas, o aparecimento e a tendência crescente de surtos mundiais envolvendo agentes zoonóticos que podem ser transmitidos através do leite e seus derivados, têm despertado atenção global e preocupação de autoridades (DAVIS; LI; NACHMAN, 2014; GLUCKMAN, 2015; WHO, 2002) e pesquisadores (FONSECA; SANTOS, 2000; GUIMARÃES; LANGONI, 2010; ROCHA et al., 2014; SILVA, M. R. et al., 2013; VAN DER POEL, 2001). Dentre os principais microrganismos, além dos causadores de epizootias clássicas como *Mycobacterium bovis* e *Brucella abortus*, destacam-se o *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxinas, *Escherichia coli* enteropatogênica e enterotoxigênica, *Streptococcus* sp., *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. (ANTOGNOLI et al., 2009; CATÃO; CEBALLOS, 2001; GUIMARÃES; LANGONI, 2010; LYNCH et al., 2012; MANNING et al., 2010; MARTINS VIEIRA et al., 1998; NING et al., 2013; RUEGG, 2003; SILVA, M. R. et al., 2013; VAN DER POEL, 2001; VAN KESSEL et al., 2013; WHO, 2002). Estes microrganismos são reportados como causadores de doenças sistêmicas em bovinos e isolados de mastites clínicas ou subclínicas. (LANGONI, 1997; LANGONI et al., 2000).

No Brasil, as informações epidemiológicas de doenças transmitidas por alimentos são escassas. Estima-se que apenas 10% do número real de surtos sejam reportados e confirmados, devido à deficiência dos serviços de vigilância epidemiológica, do diagnóstico

clínico e laboratorial insuficiente e da baixa conscientização da população diante do problema (GERMANO et al., 1993; SANTANA et al., 2010). Entretanto, foram registrados em passado recente, vários surtos de toxinfecções alimentares, nos quais leite ou produtos derivados estavam envolvidos (CÂMARA, 2002; FAPEMIG, 2002; LYRA DE FREITAS et al., 2009; MARTINS VIEIRA et al., 1998).

Na Europa e na América do Norte, onde o sistema de vigilância em saúde é rigoroso e eficiente, a maioria dos surtos de infecções associados ao consumo de leite e derivados são atribuídos à ingestão de leite bovino ou queijo maturados (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014a; WHO, 2002). Portanto, o fato de países em desenvolvimento ainda apresentarem taxas significativas de consumo de leite cru ou de produtos preparados com leite não pasteurizado, é preocupante (DÜRR; ANTONI; TOMAZI, 2005; SILVA, M. R. et al., 2007; WHO, 2002). No Brasil, cerca de 33% do leite produzido não é captado pelas indústrias de laticínios, sugerindo que seu consumo ocorra sem pasteurização e, provavelmente sem qualquer fiscalização higiênico-sanitária (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012; ZOCCAL, 2012). Grande parte deste leite informal é destinado à fabricação de queijos artesanais elaborados a partir de leite recém-ordenhado, não pasteurizado ou não fervido (SILVA, M. R. et al., 2013).

Historicamente, com o advento da pasteurização, diminuíram os relatos de várias doenças, como brucelose, tuberculose, difteria, febre Q e uma série de gastroenterites transmitidas pelo leite e seus derivados (SILVA, M. R. et al., 2007). Por outro lado, deve ser ressaltado que embora altamente efetivo no controle de doenças de origem alimentar, o tratamento térmico se não complementado com padrões elevados de higiene desde a produção até o completo processamento, torna-se insuficiente (BELOTI, 2015b; CATÃO; CEBALLOS, 2001; DE BUYSER et al., 2001). Ademais, existe suspeita que alguns patógenos como a *Listeria monocytogenes* (FARBER et al., 1988; SZLACHTA et al., 2010) e o *Mycobacterium paratuberculosis* (CARVALHO et al., 2012; GRANT; BALL; ROWE, 1998), sobrevivam à pasteurização. No entanto, há consenso na comunidade científica de que apenas linhagens de *Bacillus cereus* apresentam esta capacidade (BELOTI, 2015b). Por outro lado, enterotoxinas estafilocócicas resistentes às hidrolases gástricas são altamente estáveis ao aquecimento (100°C durante 30 min), resistindo aos tratamentos térmicos comumente aplicados ao leite (BELOTI, 2015b; FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004; JAY, 1994).

Os lácteos são, portanto, ainda considerados importantes veículos de transmissão de agentes com caráter zoonótico no Brasil (ARCURI et al., 2010; DA SILVA et al., 2015; FAGUNDES et al., 2010; HOFFMANN et al., 2014; JORDAO JUNIOR et al., 2009; MORAES et al., 2009; MOURA; DESTRO; FRANCO, 1993; NERO et al., 2008; SGARIONI et al., 2014). Como demonstra o estudo de Martins Vieira et al. (1998), nos surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), entre 1991 e 1995 no Estado de Minas Gerais, foi verificado uma prevalência de 65% de intoxicações estafilocócicas relacionadas ao consumo de queijo como provável alimento implicado. Coincidentemente, *Staphylococcus* sp. é o principal agente etiológico da mastites em rebanhos leiteiros em nível mundial (BRADLEY, 2002; BRITO, M. A. V. P. et al., 1999; COSTA et al., 1995; FAGUNDES et al., 2010; KEEFE, 2012; LARANJA; MACHADO, 1994; PORTES et al., 2014b).

O consumo de leite e produtos lácteos não pasteurizados aumenta em 100 a 150 vezes o risco relativo de possíveis infecções zoonóticas, em comparação ao consumo destes pasteurizados (DAVIS; LI; NACHMAN, 2014; GLUCKMAN, 2015). Estudo em áreas periurbanas de Juiz de Fora revelou taxas de consumo de leite e queijo não inspecionados em residências de 42% e 66,5%, respectivamente (SILVA, M. R. et al., 2005). Em Mato Grosso do Sul, entre 1991 e 2001, foram notificados 12.820 casos de toxi-infecções estafilocócicas, em 26 surtos, todos associados ao consumo de leite ou derivados, principalmente queijo fresco (CÂMARA, 2002). Estudo realizado com queijo serrano em Santa Catarina, produzido a partir de leite cru, mostrou que o produto apresentava-se impróprio para o consumo, com isolamento de *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes* (MELO et al., 2013). Estudos também demonstraram que leite cru e queijos produzidos a partir deste, foram as principais fontes de transmissão da *B. abortus*, para humanos (BOTELHO et al., 2000; BRYAN, 1982; NAMIDURU et al., 2003).

Na maioria dos transtornos de saúde provocados por leite e derivados contaminados os sintomas clínicos nos pacientes estão principalmente relacionados ao trato gastrointestinal. Porém, patógenos de origem alimentar como a *Listeria monocytogenes*, são capazes de causar a morte do paciente de forma aguda (BRYAN, 1982; WHO, 2002). A listeriose apresenta uma taxa de mortalidade próxima de 50%. O agente causador é psicotrófico e é capaz de resistir a condições ambientais adversas, como baixo pH e altas concentrações de cloreto de sódio, o que acentua o risco à saúde pública (D'OVÍDIO, 2011). Outro patógeno presente no leite com potencial zoonótico é o *Streptococcus agalactiae*,

importante e prevalente agente da mastite bovina no Brasil, reportado como causa frequente de septicemia neonatal em humanos (BOHNSACK et al., 2008). Sua presença é comum no trato urogenital das mulheres (KEEFE, 2012; MANNING et al., 2010). Em adultos, a septicemia por este patógeno, embora rara, está cada vez mais frequente, especialmente em pacientes com doenças crônicas, imunodeprimidos e idosos (BATISTA; FERREIRA, 2015).

Epizootias clássicas, que podem ser transmitidas através do consumo de leite e seus derivados, como a tuberculose e a brucelose continuam sendo importantes causas de óbitos nos países em desenvolvimento (LANGONI et al., 2000). As infecções por *Brucella abortus* em rebanhos bovinos apresentam distribuição cosmopolita. Embora seja de notificação obrigatória, em muitos países os dados oficiais não refletem a situação real de casos, sendo a incidência verdadeira estimada entre 10 a 25 vezes maior do que os relatados (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014a; WHO, 2002). Santa Catarina possui uma das menores taxas de prevalência de brucelose bovina do Brasil (SIKUSAWA et al., 2009). No entanto, focos da doença continuam sendo reportados em várias cidades do estado (DIVE, 2012). Apesar de subdiagnosticada e subestimada, a soropositividade para brucelose humana apresentou um incremento de 122% em 2011, em relação ao ano anterior, demonstrando a circulação deste patógeno no Estado (DIVE, 2012).

Em 2001, foi implantado, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA/SDA), o Plano Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Bovina (PNCEBT), que estabelece diretrizes para o diagnóstico sorológico de Brucelose. No entanto, devido às limitações dos exames sorológicos, principalmente para Santa Catarina, que oficialmente já se encontra em fase de erradicação da enfermidade, ou seja, com baixo número de rebanhos positivos, a implementação de metodologias diagnósticas que permitam a avaliação por rebanho com maior sensibilidade devem ser consideradas no âmbito do PNCEBT.

Uma preocupação adicional em fazendas leiteiras é a transmissão de patógenos zoonóticos aos trabalhadores rurais e visitantes (RUEGG, 2003). Em Santa Catarina, devido ao modelo de agricultura familiar, pilar da produção leiteira estadual, o leite e derivados (queijo, nata, ricota, etc.) são normalmente consumidos na propriedade sem o prévio tratamento térmico. Além disso, as pessoas envolvidas na atividade de produção do leite estão em contato direto com animais contaminados, ou seja, em risco

zoonótico iminente. A abertura de agroindústrias familiares para agregação de valor a pequenas propriedades vem sendo estimulada no Estado. No entanto, estas propriedades não são certificadas quanto à ausência de doenças zoonóticas, representando um risco de transmissão destes patógenos para os consumidores do leite bovino e seus derivados. Além disso, existe a Instrução Normativa 30/2013 do MAPA que permite a comercialização de queijos maturados (artesanais), elaborados a partir de leite cru, com período de maturação inferior a 60 dias, desde que exista garantia técnico-científica de qualidade e inocuidade do produto (BRASIL, 2013).

Neste contexto, ressalta-se a importância de ferramentas de diagnóstico sensíveis e específicas para auxiliar no monitoramento e no controle destes patógenos, visando certificar as propriedades e agroindústrias para produção de leite e derivados biosseguros.

2.3 PATÓGENOS ZONÓTICOS E O IMPACTO NO SETOR PRODUTIVO DA CADEIA LÁCTEA

A maioria dos agentes etiológicos da mastite bovina apresenta potencial zoonótico (BOOR, 2001; DE BUYSER et al., 2001; FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004; GUIMARÃES; LANGONI, 2010; ZADOKS et al., 2011). Dentre as doenças que acometem os animais de produção leiteira a inflamação da glândula mamária é a mais importante, pela alta prevalência e pelos elevados prejuízos que causa à cadeia láctea mundial, ocasionando redução da produtividade, aumento no custo de produção, interferência na qualidade e a redução da vida útil do leite processado e seus derivados (BOOR, 2001; BRADLEY, 2002; SANTOS, M. V.; FONSECA, 2007).

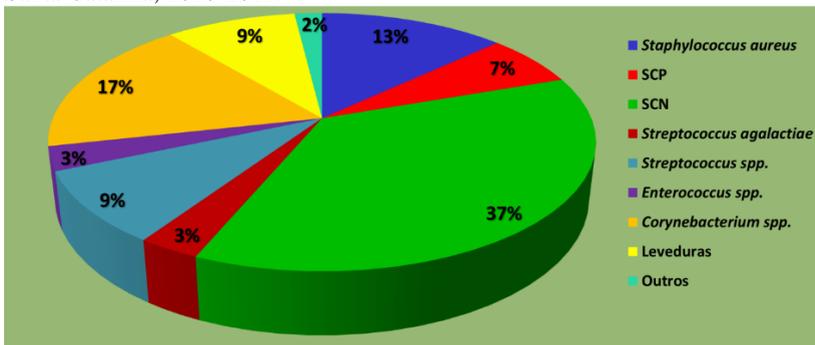
No Brasil, estimativas apontam para uma variação de 20 a 38% na prevalência da doença (FONSECA; SANTOS, 2000). As mastites clínicas são as que trazem maior preocupação aos produtores. Contudo, as mastites subclínicas normalmente despercebidas, correspondem por 90 a 95% das ocorrências e são responsáveis por 70% dos prejuízos acarretados pela enfermidade no país (SANTOS, M. V.; FONSECA, 2007). Segundo Langoni et al. (1999), o prejuízo anual de uma vaca com mastite subclínica no Brasil é de aproximadamente 330 dólares, valor superior ao dos Estados Unidos, que assinala perdas de 200 dólares/vaca/ano.

Entre os patógenos causadores de mastite, *S. aureus* e *S. agalactiae* possuem posição de destaque e o isolamento e importância desses agentes em rebanhos bovinos leiteiros no Brasil tem sido relatado

por diversos autores (BRITO, M. A. V. P. et al., 1999; COSTA et al., 1995; FAGUNDES et al., 2010; FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004; LANGONI, 1997; LANGONI et al., 2011; PORTES et al., 2014b; RIBEIRO; KOLLING; ZANELA, 2016; SANTOS, L. L.; PEDROSO; GUIRRO, 2010; SOUZA et al., 2009). Wilson, Gonzalez e Das (1997) verificaram que a contagem de células somáticas (CCS) para animais com isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* foi de 440.000 e 640.000 células/ml, respectivamente. Estudo realizado no Brasil mostrou dados semelhantes, apontando a infecção intramamária como o fator predominante responsável pelo aumento da CCS de vacas leiteiras e que este aumento é específico conforme os patógenos da mastite, sendo o *S. agalactiae* o responsável pelo maior aumento (SOUZA et al., 2009). Com base no exposto, o controle e prevenção da mastite por *S. aureus* e *S. agalactiae* é fundamental para que os rebanhos brasileiros possam atender os limites legais de CCS estabelecidos na IN62 de 400.000 células/mL (BRASIL, 2011; 2016). Embora o *S. agalactiae* seja um patógeno altamente contagioso é o único agente causador de mastite passível de erradicação.

Estudo recente de 987 amostras realizado por nosso grupo mostrou que em 57,7% delas foi possível o isolamento de patógenos, demonstrando o perfil microbiológico do leite de rebanhos do Oeste de Santa Catarina (Figura 1), (PORTES et al., 2014b).

Figura 1 – Perfil etiológico da mastite bovina em rebanhos leiteiros do Oeste de Santa Catarina, 2010-2011.



Fonte: Adaptado de Portes et al. (2014b).

Nota: SCP – *Staphylococcus* coagulase positivo; SCN – *Staphylococcus* coagulase negativo.

A mastite é considerada a enfermidade de maior custo para a bovinocultura leiteira, respondendo por 38% dos gastos diretos com doenças (KOSSAIBATI; ESSLEMONT, 1997), sendo o fator limitante mais importante para a lucratividade na produção de leite em todo o mundo (OLIVER; MURINDA, 2012). Em função de sua alta prevalência nos rebanhos do país, estima-se que possam ocorrer perdas produtivas da ordem de 15% (SANTOS, M. V.; FONSECA, 2007), o que significa um total de 5,16 bilhões de litros de leite ao ano, em relação à produção anual de 34,4 bilhões de litros. Nos Estados Unidos estima-se que o custo da mastite por vaca/ano seja de aproximadamente US\$ 185, o que corresponde a um custo anual para o país de 1,8 bilhões de dólares (PHILPOT; NICKERSON, 2002), segundo o *National Mastitis Council* este custo é de 2 bilhões de dólares ano (HOGAN et al., 2012).

Em relação à brucelose, outra importante zoonose de caráter mundial, são previstas perdas de 20% na produção de leite em rebanhos endêmicos (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014a). A prevalência de focos de brucelose bovina em propriedades pecuárias no Brasil varia de 0,32% a 41,5% e de animais soropositivos de 0,06% a 10,2% (CHATE et al., 2009; SIKUSAWA et al., 2009). Estudos realizados em 2013 demonstraram que o prejuízo total da brucelose no Brasil foi estimado em US\$ 448 milhões. A cada 1% de variação na prevalência, estima-se o incremento no prejuízo de US\$ 77,85 milhões no custo da brucelose bovina no Brasil. As perdas por fêmea infectada, com idade superior a 24 meses, foram estimadas em US\$ 211,00 e US\$ 113,74 em rebanhos de leite e de corte, respectivamente (SANTOS, R. L. et al., 2013).

Dados sobre os impactos produtivos causados por patógenos zoonóticos na produção são limitados devido ao pouco conhecimento acerca da circulação destes agentes nos rebanhos leiteiros. Além disso, outros patógenos como *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. são negligenciados na pecuária leiteira.

Cerca de 75% das novas doenças que têm afetado os seres humanos ao longo dos últimos 10 anos têm sido causadas por agentes patogênicos provenientes de um animal ou a partir de produtos de origem animal. Este fato tem resultado em esforços mundiais de colaboração entre a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), a fim de compreender e controlar tais enfermidades (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2013).

As doenças infecciosas são uma preocupação crescente em fazendas leiteiras pelo seu impacto potencial sobre a saúde humana e

animal, produtividade, segurança dos alimentos e economia (PRADHAN et al., 2009). Para reduzir o risco da presença de microrganismos indesejáveis no leite cru são necessárias medidas para diminuir a prevalência das infecções intramamárias, para isso é importante se conhecer quais os agentes patogênicos presentes nos rebanhos (RUEGG; REINEMANN, 2002). Informações sobre a prevalência de patógenos no sistema produtivo são relevantes para escolha de melhores estratégias de ação e mitigação visando seu controle e/ou a erradicação (PRADHAN et al., 2009; SILVA, M. R. et al., 2013). Vários modelos têm mostrado que com a implantação de programas de redução de patógenos, diminuí significativamente o risco de doença humana (SMITH et al., 2013).

A escassez de dados epidemiológicos acerca da circulação de patógenos zoonóticos e a inexistência de programas efetivos de vigilância nos rebanhos brasileiros dificultam atuações preventivas na cadeia produtiva. Neste sentido, a elaboração de uma visão epidemiológica sobre os patógenos zoonóticos circulantes na cadeia láctea, em particular do Oeste de Santa Catarina, poderá subsidiar programas de vigilância epidemiológica e de saúde pública no que tange a zoonoses transmitidas via leite e derivados, contribuir em nível de rebanho com as estratégias de controle de mastite e sanidade bovina, melhorando a produtividade e a qualidade da matéria prima, e auxiliar a indústria de laticínios na implementação das medidas focadas na qualidade do leite e segurança dos alimentos.

A segurança dos alimentos e o risco de resistência antimicrobiana, associados, representam uma dupla preocupação de importância crescente (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2013). Na pecuária leiteira, a mastite é a doença que demanda o maior emprego de antimicrobianos (ERSKINE et al., 2004). Antimicrobianos têm sido empregados no tratamento da mastite desde a década de 40 e constituem um componente essencial nos programas de controle da doença. O desconhecimento do padrão de infecção e da susceptibilidade aos antimicrobianos do rebanho ou de rebanhos da mesma região, devido ao não uso de ferramentas diagnósticas, favorece a emergência de resistência.

Genes que conferem resistência antimicrobiana são um fenômeno natural em comunidades bacterianas, portanto, sua simples presença não é preocupante (D' COSTA et al., 2011), mas a utilização em larga escala de antibióticos e quimioproláticos exerce uma pressão seletiva, conduzindo ao aparecimento de agentes patogênicos resistentes (GOOTZ, 2010). Um bom exemplo de resistência antimicrobiana

envolvendo bovinos é o caso do *S. aureus* resistente à metilina (MRSA). Seis meses após o início da comercialização de metilina em 1960, três isolados resistentes foram relatados (GRUNDMANN et al., 2006). Vários casos de transmissão de MRSA entre vacas e seres humanos têm sido reportados (HOLMES; ZADOKS, 2011).

As crescentes descrições de resistência múltipla em isolados de leite bovino (GIANNECHINI, R. E.; CONCHA; FRANKLIN, 2002; HOLMES; ZADOKS, 2011; KALMUS et al., 2011; MORONI et al., 2006; PERSSON; NYMAN; GRONLUND-ANDERSSON, 2011; PITKALA et al., 2004; POL; RUEGG, 2007; SANTOS, F. F. D. et al., 2016), inclusive em Santa Catarina (PORTES et al., 2014a), alertam sobre o risco de veiculação em humanos de linhagens multirresistentes, mediante o consumo de leite ou derivados lácteos.

Considerando a ausência de monitoramento na produção leiteira e o desconhecimento do nível de controle higiênico sanitário no processamento de 1/3 da produção nacional, há um elevado risco para saúde pública de transmissão de múltipla resistência associada aos patógenos zoonóticos.

2.4 DIAGNÓSTICO DE AGENTES INFECCIOSOS ZONÓTICOS E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

Apesar da importância dos patógenos zoonóticos que podem ser veiculados pelo leite para a saúde pública, possivelmente pela dificuldade de detecção quando esses microrganismos estão presentes em pequeno número ou pela interferência da microbiota endógena, não se têm até o momento, metodologias eficientes de análise disponíveis na rotina diagnóstica. Além disso, poucos trabalhos têm reportado a busca de novas ferramentas para diagnóstico destes patógenos no leite com enfoque em rebanho.

Os métodos tradicionais empregados para diagnóstico dos agentes bacterianos contaminantes do leite e associados a quadros de mastites em bovinos se baseiam na cultura, para isolamento e identificação das bactérias por técnicas bioquímicas (BRITTEN, 2012; CRESSIER; BISSONNETTE, 2011). Além da baixa sensibilidade do método, visto que a maioria dos agentes são fastidiosos, o baixo espectro explorado nas rotinas convencionais evitando onerar o teste, limita sua aplicação (TAPONEN et al., 2009). Fatores como doenças subclínicas com liberação intermitente de patógenos e resíduos de antibióticos limitam ainda mais esta metodologia (RADOSTITIS et al., 2000; SANTOS, M. V.; FONSECA, 2007). Ainda existe possibilidade da presença de

bactérias viáveis, mas não cultiváveis (VNC) (FORSYTHE, 2013). A presença de leucócitos e a alta contagem de células somáticas no leite também têm um potencial de inibição do crescimento (CREMONESI et al., 2005; PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001). Outro agravante é a falta de uma rede de laboratórios para diagnóstico microbiológico, dificultando a logística e prejudicando a qualidade das amostras. Estes fatores somados colaboram para que o uso desta ferramenta seja negligenciado na rotina clínica.

Paralelamente, os exames sorológicos (imunodiagnóstico) permitem avaliar de forma indireta o contato do hospedeiro com o patógeno, através da pesquisa de anticorpos contra um antígeno específico. Entretanto, métodos sorológicos estão disponíveis para um número limitado de agentes e, ademais, frequentemente apresentam problemas de sensibilidade e especificidade e em muitos casos só permitem a detecção de anticorpos em uma fase muito tardia da doença. Além disso, há necessidade de coleta de sangue, que envolve o manejo com os animais, dificultando ainda mais a utilização.

Em linear crescente, ferramentas de biologia molecular têm sido exploradas em substituição às metodologias clássicas (CRESSIER; BISSONNETTE, 2011; LAW et al., 2015; PAULA et al., 2015; TAPONEN et al., 2009; ZADOKS et al., 2011). Em comparação aos métodos tradicionais de diagnóstico a utilização da metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresenta vantagens como rapidez, sensibilidade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias inviáveis (proveniente de amostras inadequadamente preservadas) e/ou que não são cultiváveis ou não inclusas nas rotinas de diagnóstico laboratorial, ou ainda patógenos fastidiosos (LAW et al., 2015; MARTINEZ; HAREL; GOTTSCHALK, 2001; PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001). Em contrapartida, a complexidade e o custo dos insumos de métodos moleculares podem limitar sua aplicação (RUGGIERO et al., 2007). No entanto, considerando as vantagens da técnica e possibilidade de sua realização com enfoque de rebanho e em escala na cadeia láctea, esta metodologia poderá trazer impactos muito positivos no monitoramento de patógenos na cadeia láctea com reflexo na qualidade sanitária do leite e seus derivados.

A PCR Multiplex (mPCR) é uma variante da PCR convencional empregada de forma progressiva no diagnóstico simultâneo de diferentes patógenos (CHIANG et al., 2012; CREMONESI et al., 2005; GANDRA et al., 2016; KIM, J. H. et al., 2014; KUMAR; MURALI; BATRA, 2009;

ORZIL et al., 2016; PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001; SHOME et al., 2011; SILVA, M. A., 2008; TROCANTELLI et al., 2015). Utilizando mais de um par de iniciadores na mesma reação, o teste possibilita a amplificação de mais de uma sequência de DNA, permitindo a detecção simultânea de vários agentes em uma mesma reação dinamizando o trabalho, reduzindo custos e o tempo de diagnóstico e aumentando a capacidade de processamento de amostras pelo laboratório (LEE, N. et al., 2014; PARK; RICKE, 2015; PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001; ZHAO et al., 2014).

A maioria dos métodos de PCR empregados para a detecção de agentes no leite e seus derivados necessita de enriquecimento em meio de cultura previamente à extração (CHIANG et al., 2012; LEE, K. H. et al., 2008; PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001; RIFFON et al., 2001). A detecção direta de patógenos bacterianos em amostras de leite é um trabalho oneroso devido à presença de substâncias inibidoras da reação, presentes na matriz do leite e na microbiota autóctone (CREMONESI et al., 2005; HASSAN et al., 2002). A detecção de patógenos no leite sem a etapa de pré-enriquecimento tem sido relatada na literatura (CRESSIER; BISSONNETTE, 2011; MARTINEZ; HAREL; GOTTSCHALK, 2001; ROMERO; LOPEZ-GONI, 1999). No entanto, o pré-enriquecimento torna a técnica mais sensível (CHIANG et al., 2008; CHIANG et al., 2012; LEE, K. H. et al., 2008; MEIRI-BENDEK et al., 2002).

A análise genotípica apresenta vantagens e maior poder de tipificação e discriminação, em relação às técnicas de diagnóstico fenotípico (CREMONESI et al., 2005; PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001). As análises fenotípicas dependem da expressão de fatores biológicos da célula tais como: a produção de enzimas, metabolização de nutrientes, detecção de produtos finais do metabolismo e susceptibilidade a agentes químicos. As características fenotípicas reguladas por genes podem sofrer grande influência das condições do meio ambiente, o que torna a técnica limitada podendo incorrer em resultados falso-negativos e erros de 1 a 10% no diagnóstico (SILVA, E. R.; SILVA, 2005; ZSCHOCK et al., 2005).

Por outro lado, a caracterização genotípica permite a identificação acurada de subtipos de microrganismos, fontes de infecção e transmissão, bem como o reconhecimento de tipos virulentos e monitoramento de patógenos (SILVA, E. R.; SILVA, 2005). Os riscos potenciais associados com patógenos de origem alimentar podem ser minimizados através de rigorosas medidas de controle da saúde animal e, portanto, o desenvolvimento de uma metodologia de diagnóstico rápida e eficiente a

partir do leite total do rebanho é essencial para viabilizar um efetivo programa de controle e monitoramento de patógenos zoonóticos em rebanhos leiteiros.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Desenvolver uma metodologia molecular sensível, específica e economicamente viável, para detecção e triagem rápida de patógenos com potencial zoonótico, transmitidos através do leite bovino.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- I. Padronizar um ensaio de mPCR para detecção de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Brucella abortus*, em amostras de leite bovino.
- II. Validar o sistema de detecção por mPCR em amostras de leite bovino oriundas de tanque resfriador.
- III. Identificar os principais agentes infecciosos com potencial zoonótico em amostras de leite oriundas dos rebanhos de bovinos leiteiros do Oeste de Santa Catarina.
- IV. Estimar a prevalência de focos e de vacas lactantes com infecção por *Brucella abortus* em rebanhos leiteiros do Oeste Catarinense.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos realizados com animais estão em acordo e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSC) processo CEUA N° 5194200815. Como a pesquisa envolveu levantamento epidemiológico com visita e amostragem em unidades de produção leiteira, todos os procedimentos realizados com envolvimento de pessoas, foram executados conforme o aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH – UFSC) processo CAAE N° 47255115.0.0000.0121. Mediante previa autorização dos proprietários dos rebanhos através de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

4.2 MICRORGANISMOS E SOROS DE REFERÊNCIA

4.2.1 Cepas bacterianas, conservação e crescimento em cultura

Na padronização e otimização da metodologia molecular, na confirmação da sensibilidade e especificidade dos iniciadores e na contaminação artificial de leite para determinação da sensibilidade analítica e validação analítica do mPCR, foram utilizadas as cepas padrão, identificadas na Tabela 1. Para confirmação da especificidade analítica da mPCR foram usadas todas as cepas apresentadas na Tabela 1, além de cepas de campo (CC) isoladas e identificadas neste trabalho. As cepas da *American Type Culture Collection* - ATCC foram também utilizadas como controles nos isolamentos microbiológicos. A identificação de todas as cepas padrão e estirpes foram confirmadas fenotípica e bioquimicamente conforme recomendações do *National Mastitis Council* (NMC) (2004) e Quinn et al. (2005).

As amostras foram armazenadas em caldo de infusão cérebro e coração (BHI) (Kasvi®, Liofilchem®, Roseto, Itália) com glicerol a 50% em concentração de 10^8 a 10^{10} UFC.mL⁻¹ sob temperatura de -20°C até o momento do uso (CAMEOTRA, 2007). Paralelamente, triplicatas das cepas padrão foram armazenadas a -80°C.

O cultivo microbiológico de todas as bactérias foi realizado em ágar sangue (ágar tripton de soja (TSA) (Himedia®, Mumbai, Índia), suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovino) incubado a 37°C em aerobiose, por 18 a 24 horas, com exceção da *B. abortus* que necessita 3 a 4 dias de incubação (Figura 2). Com posterior repique de 2 a

3 colônias em 9 mL de caldo BHI, incubado nas mesmas condições supracitadas. Os cultivos em caldo BHI foram utilizados para preparação de diluições e extração do DNA.

Tabela 1 – Microrganismos de referência utilizados como controles em experimentos.

Espécie	Origem
<i>Staphylococcus aureus</i> ¹	ATCC 25923
<i>Streptococcus agalactiae</i> ¹	ATCC 12386
<i>Escherichia coli</i> ¹	ATCC 25922
<i>Listeria monocytogenes</i> ¹	ATCC 19117
<i>Salmonella</i> spp. ¹	ATCC 8327
<i>Brucella abortus</i> Cepa S19 ¹	LIDI/UFGM
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028
<i>Salmonella</i> Pullorum	ATCC 9120
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ATCC 13076
<i>Salmonella</i> Gallinarum	ATCC 9184
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Streptococcus uberis</i>	CEDIMA/CAV/UDESC
<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Staphylococcus hyicus</i> , <i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> , <i>Bacillus</i> spp., <i>Pasteurella</i> <i>multocida</i> , <i>Manhemmia haemolytica</i> e <i>E. coli</i>	VERTÀ

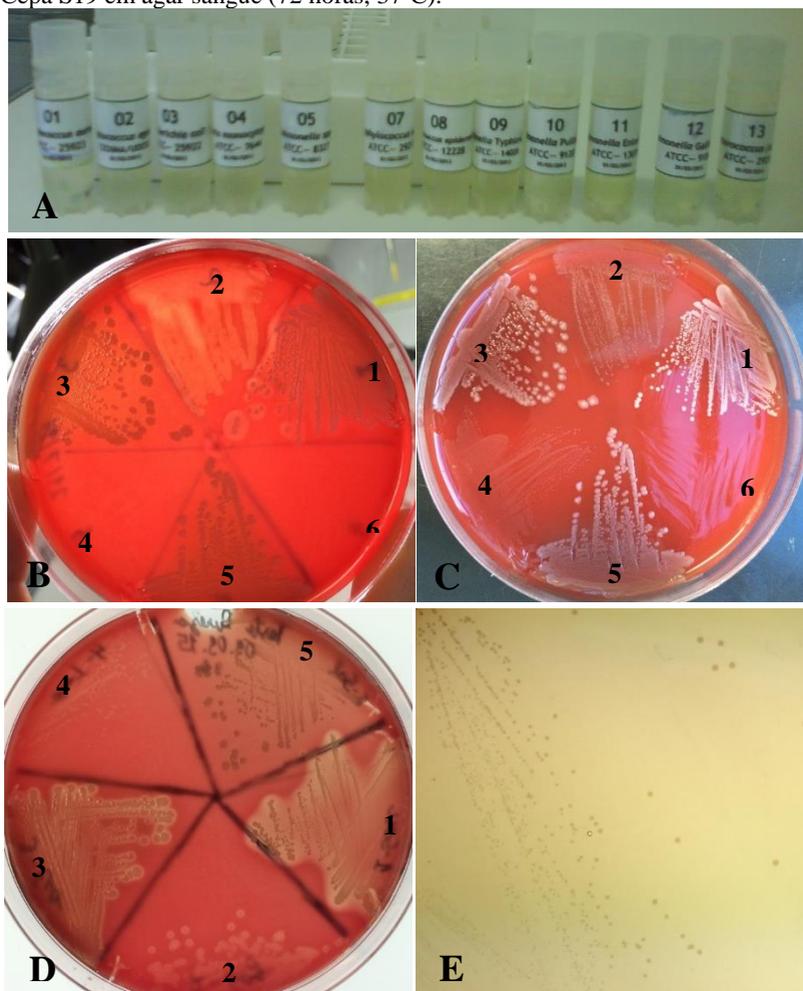
Fonte: O autor.

Notas: 1- Cepa Padrão; ATCC - American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA; Laboratório de Imunologia e Doenças Infecciosas – LIDI/UFGM; Centro de Diagnostico Animal – CEDIMA/CAV/UDESC; Instituto de Pesquisa e Diagnostico Veterinário – VERTÀ.

A quantificação celular de cada cepa padrão bacteriana em BHI foi estimada através da avaliação da densidade óptica (média de três leituras), com comprimento de onda de 600 nm (D.O.600) em equipamento BioPhotometer® (Eppendorf, Hamburg), a partir da correlação entre densidade bacteriana e absorbância, utilizando uma equação de regressão

linear a partir das curvas de crescimento bacteriano (LENNETTE et al., 1985).

Figura 2 – Microrganismos de referência usados como controle em provas diagnósticas. **A:** Cepas ATCC em caldo BHI com 50% de glicerol para conservação - 20°C e - 80°C. **B, C e D:** Morfologia de colônia das cepas padrão em ágar sangue (24 horas, 37°C), sendo 1 - *Staphylococcus aureus*, 2 - *Streptococcus agalactiae*, 3 - *Escherichia coli*, 4 - *Listeria monocytogenes*, 5 - *Salmonella* spp. 6 - *Brucella abortus* Cepa S19. **E:** Colônias de *Brucella abortus* Cepa S19 em ágar sangue (72 horas, 37°C).



Fonte: O autor.

4.2.2 Soros de referência

Os soros de referência (controle positivo e negativo) para os testes sorológicos para brucelose bovina foram viabilizados através do Instituto de Pesquisa e Diagnostico Veterinário - VERTÀ, laboratório credenciado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), conforme a Portaria 221/2014, para realização das provas oficiais do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose (PNCEBT) (BRASIL, 2004; 2006) e acreditado pela CGCRE/Inmetro de acordo com a ABNT NBR ISO/IEC 17025, sob o número CRL 1017.

4.3 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA MOLECULAR

Todos os procedimentos referentes ao diagnóstico molecular do estudo foram realizados no Laboratório de Bioinformática e no Laboratório de Protozoologia, MIP-CCB-UFSC – Florianópolis-SC.

4.3.1 Oligonucleotídeos iniciadores

Inicialmente foram selecionados iniciadores a partir de um banco de dados montado com base na literatura, e posteriormente foram desenhados iniciadores para agentes específicos com intuito de melhorar a sensibilidade do teste. O conjunto de iniciadores com a melhor eficiência para o sistema de detecção proposto neste estudo está disponível na Tabela 2. Iniciadores de PCR específicos para *S. aureus*, *E. coli*, *B. abortus* e *Salmonella* spp. foram usados como relatado anteriormente (CHIANG et al., 2012; SHOME et al., 2011; SREEVATSAN et al., 2000). Para *L. monocytogenes* e *S. agalactiae* foram desenhados iniciadores espécie-específicos a partir das sequências do gene listeriolisina (GenBank acesso N° X15127) (WU; CHAN; KADO, 2004) e o gene 16S rRNA (GenBank acesso N° AF015927.1) (RIFFON et al., 2001), respectivamente, usando o software Lasergene/Primer Select 7.0 (DNASTAR Inc., Madison, WI, EUA). O mesmo foi utilizado para conferir o alinhamento de todos os pares de iniciadores nas sequências e o tamanho esperado dos produtos de amplificação, além da qualidade dos iniciadores (formação de dímeros e/ou *hairpins*).

A ferramenta BLASTn do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), foi utilizada para verificar a

similaridade da sequência gerada por cada par de iniciador com o organismo alvo, e em seguida excluindo o organismo alvo, para garantir a não existência de alinhamento com outro microrganismo que não o de interesse, no GenBank. Através do Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) verificou-se o alinhamento de todos os doze iniciadores entre si e com o genoma das seis bactérias alvo. Para analisar as características de vários iniciadores simultaneamente, incluindo a possibilidade de formação de dímeros entre os mesmos, foi usado o software FastPCR 6.5 (KALENDAR; LEE; SCHULMAN, 2011; 2014).

Tabela 2 – Conjunto dos iniciadores de PCR utilizados neste estudo.

Organismo	Gene alvo	Designação Iniciador	Sequência de oligonucleotídeos (5' - 3')	Amplicon (pb)	Nº Acesso GenBank	Referência
<i>S. aureus</i>	23S rRNA	Sau894-F	AGCGAGTCTGAATAGGGCGTTT	894	X68425	(Shome, 2011)
		Sau894-R	CCCATCACAGCTCAGCCTTAAC			
<i>E. coli</i>	phoA	Eco468-F	GGTAACGTTTCTACCCGAGAGTTG	468	FJ546461.1	(Shome, 2011)
		Eco468-R	CAGGGTTGGTACACTGTCATTACG			
<i>B. abortus</i>	BCSP31K	Bab311-F	ACGCAGTCAGACGTTGCCTAT	311	M20404	(Sreevatsan, 2000)
		Bab311-R	TCCAGCGCACCATCTTTCAGCCTC			
<i>Salmonella</i> spp.	Random DNA frag.	Sal237-F	TTTGCGTTGCGTCTGTCC	237	AM933172	(Chiang, 2012)
		Sal237-R	GCTTATCGTCTGCGGCTC			
<i>L. monocytogenes</i>	LisA (HlyA)	Lmo133-F	GTTCAACATAAAAACCTGGAGCG	133	X15127	O autor
		Lmo133-R	ACCATTCCCAAGCTAAACCAG			
<i>S. agalactiae</i>	16S rRNA	Sag406-F	ACGCTGAGGTTGGTGTTTAC	123	AF015927.1	O autor
		Sag114-R	ATTACTCTTATGCGGTATTAGC			

Fonte: O autor.

4.3.2 Extração do DNA genômico bacteriano

O sedimento bacteriano das cepas padrão contendo 10^9 células foi suspenso em 0,5 ml de tampão de lise (10mM Tris HCl pH 7,4, 10mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, 1% SDS) e incubado com proteinase K (20 mg/ml) a 42°C por 4 horas). Os lisados resultantes foram em seguida submetidos à extração pelo método do fenol-clorofórmio como descrito por Sambrook e Russell (2001). A quantificação das amostras de DNA foi avaliada em espectrofotômetro *BioPhotometer*[®] (Eppendorf, Hamburg) a 260 nm e a pureza determinada na razão 260/280 nm e 260/230 nm. Preparou-se uma mistura padronizada de DNA na

concentração de $1,0 \text{ ng}/\mu\text{L}^{-1}$ de cada bactéria, a qual foi alíquotada e mantida em freezer -20°C até o seu uso. Esta mistura de DNA genômico estandardizada, foi utilizada para padronização da metodologia molecular e como controle positivo das reações de PCR e multiplex PCR.

Para determinação da especificidade da mPCR, do limite de detecção da PCR individual e multiplex e para o sistema de detecção proposto para diagnose em leite bovino, o DNA genômico bacteriano foi preparado utilizando cultura em meio líquido através de lise térmica, de acordo com os protocolos propostos por Nunes et al. (1999) e OIE (2013), com pequenas modificações. As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio apropriado sob as condições descritas no item 4.2.1. Resumidamente, $1,5 \text{ mL}$ de cultivo em meio líquido foi centrifugado ($14.000 \times g$ durante 4 min), as células lavadas duas vezes com $1,0 \text{ mL}$ de água Milli-Q estéril ($14.000 \times g$ durante 4 min). O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento suspenso em $500 \mu\text{L}$ de água Milli-Q estéril. A suspensão foi incubada a 96°C por 10 min em bloco de aquecimento. Em seguida, foi resfriada a 4°C e centrifugada por 4 min a $14.000 \times g$. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ($400 \mu\text{L}$) e utilizado como molde ($2,0 \mu\text{L}$) para as reações de amplificação ou armazenado a -20°C até à sua utilização. Quando necessário, a concentração do DNA genômico foi determinada, utilizando o espectrofotômetro *BioPhotometer* e ajustada para a reação de PCR.

4.3.3 Padronização da Reação de PCR individual.

A amplificação via PCR foi realizada em termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em tubos de $0,2 \text{ mL}$. Todas as reações foram realizadas em volume final de $10 \mu\text{L}$, contendo $1,0 \text{ ng}$ de DNA molde ou $1,0 \mu\text{L}$ de preparação bacteriana, 5 pmol dos iniciadores, $1,0 \text{ U}$ de *Taq* DNA polimerase *TopTaq™* (Qiagen, Hilden, Alemanha), $1,0 \mu\text{L}$ de tampão de PCR 10X contendo 15mM de MgCl_2 (Qiagen) e $0,2 \text{ mM}$ de dNTPs. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min. , seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 s , ligação a 58°C por 30 s e extensão a 72°C por 50 s , seguido de um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min . Para detecção dos produtos amplificados, $5 \mu\text{L}$ da reação foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% (p/v) em tampão TBE 1X (pH 8,0; 1,08% de Tris base, ácido bórico 0,55% e EDTA 0,0072%) a 80 V . Um marcador de tamanho molecular (pUC digerido

com *Hae*III – Anexo A), foi executado simultaneamente, para estimar o tamanho dos produtos amplificados. Os géis foram corados pelo brometo de etídio ($0,5 \text{ ug.mL}^{-1}$), visualizados em transiluminador sob luz UV e fotografados.

4.3.4 Avaliação da eficiência e do limite de detecção dos iniciadores de PCR

A capacidade de distinção de cada par de iniciadores (Tabela 2) para o patógeno alvo foi demonstrada usando como molde para amplificação uma mistura de DNA genômico das bactérias padrões, a $1,0 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ de cada uma das seis espécies alvo. A presença de banda somente para o patógeno alvo, sem amplificações inespecíficas, caracteriza a eficiência dos iniciadores com relação a especificidade.

O limite de detecção de cada par de iniciadores, para os patógenos alvo, foi avaliado utilizando como molde para reação de PCR DNA genômico extraído de culturas puras de cepas padrão, em diluição decimal seriada variando de 100 ng até 1,0 fg. Foi considerado como limiar de detecção a última diluição onde houve visualização de bandas. O protocolo utilizado para amplificação e visualização dos produtos foi o descrito no item 4.3.3.

4.3.5 Confirmação da identidade dos produtos amplificados por PCR.

Para confirmação da identidade os produtos de PCR amplificados com cada par de iniciadores foram purificados através do *kit Illustra GFT™* (GE Healthcare), e o DNA foi quantificado em espectrofotômetro. As reações de sequenciamento foram realizadas em equipamento Termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando *BigDye Chemistry 3.1* (Applied Biosystems) conforme recomendações do fabricante, sendo as amostras posteriormente purificadas para a retirada de iniciadores e nucleotídeos não incorporados. As amostras foram eletroinjetadas a 9 kV por 15 s e eletroeluídas a 12 kV por 120 min, no Sequenciador de DNA *ABI PRISM® 3500 Genetic Analyser* (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas quanto a sua qualidade pelo programa Phred/Phrap (Phred > 20), comparadas com sequências disponíveis na base de dados GenBank (BENSON et al., 2015), utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Para avaliação da identidade, o alinhamento das sequências resultantes com as sequências de referência foi feito utilizando-se o

programa Megalign (LaserGene, DNASTar, Inc.) baseado no método de múltipla progressão de Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994).

4.3.6 Padronização e Otimização da Reação de PCR multiplex

Estabeleceu-se inicialmente um protocolo padrão para as reações de PCR multiplex (mPCR) por meio de adaptações dos procedimentos utilizados para PCR individual e observando o descrito por Cressier e Bissonnette (2011). A temperatura de ligação média foi calculada em função da quantidade das bases nitrogenadas conforme Ogliari, Boscarior e Camargo (2000). A otimização da reação de amplificação do mPCR, foi realizada com base na avaliação de várias enzimas *Taq* DNA polimerases comerciais, diferentes tempos e temperaturas de ligação (52°C - 64°C), variações nos tempos de extensão (30s - 90s), alteração das concentrações de iniciadores e modificações no número de ciclos de amplificação, seguindo as orientações de Henegariu et al. (1997), Loffert et al. (1999) e Markoulatos, Siafakas e Moncany (2002). Também foram testados uma variedade de aditivos e agentes melhoradores da PCR (DMSO de 2% - 10%, formamida de 1% - 10%, glicerol 5%, betaína de 1,0 - 1,7M e BSA 5%) a fim de otimizar a sensibilidade e a especificidade da reação.

Após a padronização, a reação do PCR multiplex ficou estabelecida para um volume final de 20 µL incluindo os seguintes reagentes e concentrações finais: mistura pronta para PCR multiplex – *Qiagen Multiplex PCR Master Mix*[®] (contendo MgCl₂ à 6 mM, dNTP e HotStartTaq[®] DNA polimerase num tampão otimizado com pH 8.7) (Qiagen, Hilden, Alemanha) 2X concentrado, 1,0 µL de mistura de iniciadores (0,1 – 2,0 pmol de cada iniciador), 2,0 µL de DNA molde, formamida na concentração de 1,25% e água livre de RNase (Qiagen). As condições da PCR consistiram de um passo inicial, de desnaturação do DNA e ativação da enzima, a 95°C durante 15 min, seguido de 42 ciclos de amplificação (94°C por 30 s para desnaturação do DNA, 59°C por 60 s para ligação dos iniciadores e 72°C durante 60 s para cópia do fragmento de DNA a ser amplificado) e um passo de extensão final a 72°C durante 10 min.

Para visualização dos produtos amplificados, 5 µL da reação foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 8% a 80 V por duas horas em tampão TBE 1X (pH 8,0; 1,08% de Tris base, ácido bórico 0,55% e EDTA 0,0072%) e corado pelo brometo de etídio (0,5 ug.mL⁻¹

¹). Os géis foram visualizados em transiluminador sob iluminação UV, fotodocumentados e armazenados digitalmente.

4.4 CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DO MÉTODO DESENVOLVIDO

4.4.1 Avaliação da sensibilidade analítica da mPCR

O limite de detecção da mPCR foi avaliado utilizando como molde uma mistura padronizada de mesma concentração de DNA genômico dos seis patógenos alvo em diluição seriada na base 10, com as seguintes concentrações: 10 ng, 1,0 ng, 100 pg, 10 pg, 1,0 pg, 100 fg, 10 fg e 1,0 fg. Foi também avaliada a sensibilidade de detecção diretamente a partir de células bacterianas, usando como molde para as reações uma mistura das seis espécies de bactérias em estudo, nas concentrações de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 e 10^{-1} de cada bactéria. μL^{-1} . As amplificações por mPCR foram realizadas como descritas do item 4.3.6, em triplicata e em diferentes momentos.

Para determinar a sensibilidade analítica da técnica de detecção molecular desenvolvida em leite bovino, evidenciada através do menor número de bactérias presentes no leite que o método seria capaz de detectar, amostras de leite UHT (*Ultra High Temperature*) foram artificialmente contaminadas com uma carga bacteriana conhecida de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 e 10^{-1} UFC. mL^{-1} . As amostras de leite foram pré-enriquecidas em BHI, a extração realizada por lise térmica como descrito no item 4.3.2 e a amplificação por mPCR foi executada como descrito no item 4.3.6, em triplicata e em diferentes momentos. Paralelamente, foi realizado o plaqueamento em triplicata de acordo com o método microbiológico convencional conforme *National Mastitis Council* (NMC, 2004), considerado “padrão-ouro”, para comparação da sensibilidade entre as técnicas.

A ausência de agentes patogênicos no leite UHT utilizado, foi confirmada por Contagem Padrão em Placa (CPP), plaqueamento de uma alíquota de 100 μL de leite em ágar sangue (TSA, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovino), em triplicata. A CPP foi também efetivada com as diluições 10^3 , 10^2 e 10^1 UFC. mL^{-1} , em triplicata, para confirmar as concentrações bacterianas.

Foi considerado como limiar de detecção, a última diluição onde houve visualização de bandas (produto de mPCR) após eletroforese, em todas as repetições.

4.4.2 Avaliação da especificidade analítica da mPCR

Para avaliação da especificidade analítica da técnica, cepas ATCC e vários microrganismos comumente associados à microbiota do leite (Tabela 1), além de cepas de campo (isolados de glândula mamária deste trabalho) foram utilizados no ensaio, seguindo-se as orientações da OIE (2014a) para desenvolvimento de teste diagnóstico para animais.

4.4.3 Determinação do tempo de pré-enriquecimento

Para determinar o tempo de pré-enriquecimento otimizado para o conjunto de bactérias de interesse foram analisadas as curvas de crescimento individual de cada microrganismo. Para este fim, utilizou-se cultivos de 9 mL de caldo BHI, à 37°C e inóculo inicial de $1,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹. Amostras de 0,2 mL (triplicata) foram coletadas com intervalo de uma hora e quantificadas em espectrofotômetro *BioPhotometer*[®] (Eppendorf, Hamburg), D.O.600, até as culturas atingirem a fase de platô. Além disso, uma amostragem de cada cultura foi obtida após 24 horas, exceto para *Brucella abortus* cujo crescimento foi acompanhado durante 80 horas. O experimento foi realizado em duplicata. Ao final, as culturas foram plaqueadas em ágar sangue (TSA, suplementado com 5% de sangue ovino) para confirmação da pureza da cultura (Figura 2D e 2E).

O mesmo foi realizado tendo como inóculo uma mistura das seis bactérias estudadas. Neste experimento, foram retiradas amostras de 0,5 mL nos mesmos tempos, para realização de mPCR, com intuito de verificar a que momento se iniciava a detecção de cada patógeno e uma possível inibição da técnica com o aumento do número de bactérias.

4.4.4 Validação analítica experimental do sistema de diagnóstico molecular proposto

Objetivando monitorar a estabilidade e a reprodutibilidade do sistema analítico durante todas as etapas e neutralizar o viés de aferição, consciente ou não dos resultados, a validação do sistema diagnóstico foi feita pela repetição da identificação de quinze amostras e um controle negativo, em um procedimento constituído de quatro etapas: (a) amostras de leite com diferentes concentrações de cada bactéria conforme Tabela 3 foram preparadas e subdivididas em duas subamostras pelo autor (VP), sendo entregues a uma segunda pessoa do grupo de pesquisa, (b) esta pessoa substituiu as letras da identificação original por números

aleatórios. As amostras renumeradas foram então embaralhadas e devolvidas para VP, (c) que realizou o pré-enriquecimento das amostras, extração térmica, amplificação, eletroforese, coloração e documentação fotográfica dos produtos amplificados. (d) As amostras foram decodificadas e após a análise dos documentos fotográficos, a porcentagem de erros do sistema calculada. O mesmo experimento foi repetido duas vezes.

Para confirmar as concentrações bacterianas das diluições utilizadas no experimento foi realizada a CPP de cada bactéria nas diluições 10^3 , 10^2 e 10^1 UFC.mL⁻¹, por meio do plaqueamento de uma alíquota de 100 µL de leite em ágar sangue (TSA, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de ovino), em triplicata. A ausência de agentes patogênicos no leite UHT utilizado, também foi confirmada por CPP.

Tabela 3 – Discriminação da concentração de cada bactéria, por amostra (A-P), utilizada no experimento duplo-cego.

Amostra	Composição da Amostra (UFC.ml ⁻¹)					
	Sau	Eco	Sal	Bab	Lmo	Sag
A	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ²	10 ²	10 ²
B	10 ²	10 ²	10 ²	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
C	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ²	10 ⁵
D	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
E	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²
F	10 ²	10 ⁵	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²
G	10 ²	10 ²	10 ²	10 ⁵	10 ²	10 ²
H	10 ⁵	10 ²				
I	10 ²	10 ²	10 ⁵	10 ²	10 ²	10 ²
J	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	10 ⁵
L	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	10 ⁵	10 ²
M	10 ⁵	-	-	10 ²	10 ²	-
N	-	10 ⁵	-	10 ²	10 ²	-
O	-	-	10 ⁵	10 ²	10 ²	-
P	-	-	-	10 ²	10 ²	10 ⁵
CN	-	-	-	-	-	-

Fonte: O autor.

Notas: Sau – *S. aureus*; Eco – *E. coli*; Sal – *Salmonella* spp.; Bab – *B. abortus*; Lmo – *L. monocytogenes*, Sag – *S. agalactiae*; (-) ausência; (10²) – 10² UFC.mL⁻¹; (10⁵) – 10⁵ UFC.mL⁻¹; CN – Controle negativo, leite não contaminado.

4.5 VALIDAÇÃO DO METODO DESENVOLVIDO EM AMOSTRAS DE CAMPO

A mPCR padronizada, foi validada pela determinação da sensibilidade e especificidade diagnóstica do teste na detecção de microrganismos a partir de amostras de leite de rebanhos. Foram analisadas amostras de leite proveniente de tanque de expansão de 102 rebanhos da mesorregião Oeste de Santa Catarina. Os resultados do diagnóstico molecular (mPCR) foram comparados com o método padrão de diagnóstico baseado no isolamento microbiológico dos agentes. Para o diagnóstico microbiológico foi utilizando meios de cultura seletivos para *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* conforme estabelecido pelo *National Mastitis Council*, para cultura em leite de tanques de expansão (NMC, 2004), meio seletivo antecedido de um pré-enriquecimento seletivo para *L. monocytogenes* de acordo com o padronizado pela norma IDF 143A e referendado pelo FDA/USDA (IDF, 1995; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2015) e para *Salmonella* spp. foi seguido o protocolo de isolamento conforme preconizado na IN 62/2003 do MAPA (BRASIL, 2003) (ver Apêndice B e C). Para *B. abortus*, foi usado como padrão-ouro de diagnóstico os testes sorológicos de triagem e confirmatório, conforme previsto no Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose – PNCEBT (BRASIL, 2004; 2006; OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2016) (ver item 4.7.3.2). Foi considerado positivo o rebanho que apresentou pelo menos um animal positivo no teste sorológico confirmatório. A quantidade de amostras necessárias para estabelecer uma estimativa de sensibilidade (DSe) e especificidade (DSp) diagnóstica do método analítico, foi calculada em 102 amostras, em função de um valor provável de DSe e DSp de 96%, levando-se em consideração um erro de 5% e confiança de 99%, conforme proposto pelo Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres da OIE (JACOBSON, 1998; OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014a).

O método de obtenção do DNA seguiu a metodologia já descrita (item 4.3.2), precedido de um pré-enriquecimento de 8 horas em BHI, onde o inóculo inicial foi o sedimento da centrifugação de 2 mL de leite.

4.6 TESTE DE REPRODUTIBILIDADE PRELIMINAR DA mPCR

A reprodutibilidade preliminar dos produtos da mPCR foi acessada por meio da análise da variabilidade intra e interensaios de 5 amostras, utilizando como controle positivo os DNAs das linhagens padrão de *S. aureus*, *E. coli*, *S. agalactiae*, *Salmonella* spp., *B. abortus* e *L. monocytogenes*, submetidas a todo protocolo proposto, em duplicata, por cinco dias consecutivos.

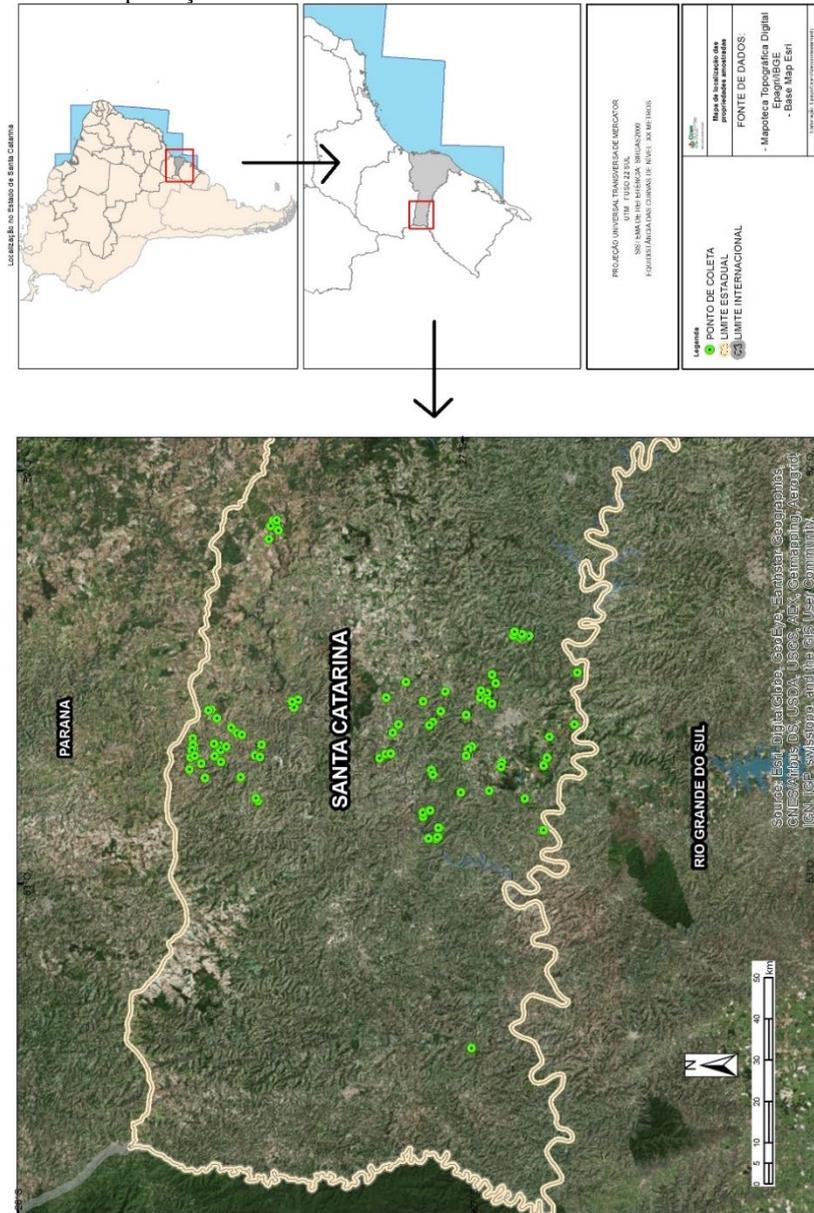
4.7 DETERMINAÇÃO DOS AGENTES ZOONÓTICOS CIRCULANTES

4.7.1 População estudada

A população alvo do presente estudo foram os rebanhos de bovinos leiteiros comerciais na Mesorregião Geográfica do Oeste Catarinense (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2015). A amostragem da população alvo para avaliação espacial teve como base a amostragem aleatória estratificada para população finita em função do tamanho do rebanho (número de vacas em lactação por propriedade), levando-se em consideração limitações logísticas e financeiras no projeto. Nesta amostragem as unidades observacionais ou epidemiológicas consideradas foram os rebanhos. A população estudada foi composta por 98 rebanhos leiteiros, avaliados no período de 2015 a 2016, no Oeste Catarinense (Figura 3).

O número de amostras de leite coletadas por propriedade variou de acordo com o número de vacas em lactação no rebanho, conforme Graat, Frankena e Bos (1997) (Tabela 4). Os rebanhos foram selecionados a partir de base de dados da assistência técnica de cooperativas e de laticínios da mesorregião oeste catarinense. Conforme descrito, foram amostrados 1.077 animais (Tabela 4). O delineamento amostral assim definido seguiu os requisitos sugeridos pela OIE (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014b).

Figura 3 – Mapa de localização mesorregional e georreferenciamento das unidades de produção leiteira amostradas entre 2015-2016 no Oeste Catarinense.



Fonte: O autor.

Tabela 4 – Amostragem de acordo com o número de vacas em lactação no rebanho.

Nº de vacas em lactação	% de animais a serem amostrados	Frequência de rebanhos (%)	Nº total real de rebanhos amostrados	Nº total real de animais amostrados
< 50*	30	97	98	1077
51 a 100	25	1		
>100	20	2		

Fonte: O autor, adaptado de Graat, Frankena e Bos (1997).

Nota: * Rebanho com até 10 vacas em lactação, todos os animais foram coletados.

Este levantamento epidemiológico prospectivo se configura como um estudo transversal, pelo seu caráter temporal de amostragem (NUNES, L. N. et al., 2013; OLIVEIRA FILHO, 2015).

4.7.2 Obtenção de amostras biológicas

4.7.2.1 Amostras de Leite

De cada animal foi coletado uma amostra composta dos quartos mamários de no mínimo 40 mL em frasco estéril, obtidas após a lavagem dos tetos com água, retirada dos primeiros jatos e antecedida por cuidadosa assepsia da extremidade dos tetos com álcool 70%. Do tanque resfriador (leite total do rebanho), após agitação mínima de 5 min, foram coletadas 2 amostras de igual volume (40 mL), sendo uma para isolamento microbiológico e uma para detecção molecular. O material amostrado foi imediatamente acondicionado em caixas isotérmicas (2 - 8°C). Amostras para microbiologia e biologia molecular foram congeladas antes do encaminhamento para análise laboratorial. Animais em tratamento com antimicrobiano ou que sofreram intervenção terapêutica em um período inferior a dez dias, do momento da coleta, não foram amostrados. Os procedimentos de coleta e transporte das amostras de leite para microbiologias seguiram as recomendações do *National Mastitis Council* (2004) e para qualidade conforme Brito (2001).

4.7.2.2 Amostras de Sangue

Foram coletadas amostras, com aproximadamente 10 mL, de sangue total venoso sem anticoagulante para obtenção de soro, dos respectivos animais que foram coletadas amostras de leite. Através de punção da veia coccígea, antecedida e sucedida por cuidadosa assepsia do local com álcool 70%, conforme recomendações do Manual Veterinário de Colheita e Envio de Amostras da Organização Pan-americana da Saúde (PITUCO et al., 2010).

Figura 4 – Procedimentos de coleta de material biológico: sangue total venoso através de punção da veia coccígea.



Fonte: O autor.

4.7.3 Detecção dos agentes zoonóticos circulantes

4.7.3.1 Diagnóstico microbiológico

O isolamento e a identificação bacteriana a partir de amostras de leite seguiram as recomendações do NMC (2004) e complementadas quando necessário por Quinn et al. (2005). O isolamento bacteriano foi realizado através da semeadura de uma alíquota de 10 μ L de leite de cada amostra, com alça descartável calibrada, em placas de ágar sangue de carneiro a 5%. Após a inoculação das amostras de leite, as placas foram

incubadas em estufa a 37°C por 24 a 48 horas. As amostras que apresentaram isolamento bacteriano foram transferidas para um subcultivo em ágar BHI sendo incubadas durante um período mínimo de 18 h, para obtenção de culturas puras. Foram realizados os esfregaços corados pelo método de Gram, para verificação da morfologia e coloração da bactéria. Em seguida, os microrganismos foram identificados seguindo o organograma apresentado no Apêndice D.

4.7.3.2 Diagnóstico sorológico (imunodiagnóstico)

A detecção de anticorpos anti-brucelas lisas (Ex. *Brucella abortus*) foi realizada através do ensaio de soroaglutinação rápida em placa (SAR) com antígeno acidificado tamponado, como teste de triagem, seguido do ensaio de soroaglutinação lenta (SAT) com redução de título pelo 2-ME, como teste confirmatório, conforme procedimentos descritos pelo Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose (PNCEBT) (BRASIL, 2004; 2006). Foram consideradas positivas as amostras com título de IgG > 25 na SAT, visto que, os animais analisados não eram vacinados para Brucelose. A produção dos antígenos utilizados nos ensaios foi realizada com base na metodologia descrita pela OIE (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2016).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros de avaliação da reprodutibilidade, sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) analíticas foram determinados conforme estabelecido no *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* da Organização Internacional de Epizootias (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014a) (Anexo B).

As frequências absoluta e relativa para os patógenos alvo nos rebanhos estudados foi obtida com base nos resultados de cultivo microbiológico (no caso da *B. abortus* na sorologia), considerado como padrão-ouro, e na análise por mPCR conforme metodologia descrita. Foi calculado a prevalência verdadeira com intervalo de confiança de 95% (usando intervalo Blaker's) e prevalência aparente (usando aproximação binomial de Wilson) através da ferramenta *EpiTools epidemiological calculators* (SERGEANT, 2016).

Para avaliar o rendimento diagnóstico do método proposto (mPCR), foram estimadas a sensibilidade (DSe) e a especificidade diagnóstica (DSp) com limites de confiança exato de Clopper-Pearson, a

acurácia, os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) e as razões de verossimilhanças positiva (RVP) e negativa (RVN) por comparação com um teste de referência (padrão-ouro), com nível de confiança de 95%. Para comparar se houve diferença no desempenho dos dois testes avaliados, na mesma população, o teste ajustado de χ^2 de McNemar (PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001) foi calculado, bem como o valor de Kappa para verificar a intensidade da concordância entre os métodos de diagnóstico (THRUSFIELD, 2007). Os p-valores correspondentes também foram calculados para ambos os valores de kappa e qui-quadrado. O desempenho da prova diagnóstica desenvolvida foi avaliado conforme as recomendações da OIE (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014a; SERGEANT, 2016).

A frequência absoluta de patógenos na glândula mamária dos animais estudados foi obtida com base nos resultados de cultivo microbiológico e para *B. abortus* por sorologia. Sendo a prevalência calculada através da frequência relativa para cada patógeno e o intervalo de confiança a 95% para prevalência estimada, usando aproximação binomial de Wilson (SERGEANT, 2016).

5 RESULTADOS

Os resultados foram organizados de modo a descrever desde a idealização até a validação do teste diagnóstico, seguindo os passos estabelecidos pela OIE para estimar a precisão do teste em detectar os alvos propostos. Os alvos foram selecionados dentre os patógenos com potencial zoonótico e com possibilidade de transmissão via leite bovino, buscando incluir os principais patógenos responsáveis por elevadas perdas econômicas no agronegócio do leite. Para fase de desenvolvimento, padronização e caracterização analítica da metodologia desenvolvida foram utilizados os microrganismos de referência descritos na Tabela 1. Para a fase seguinte de caracterização diagnóstica do teste idealizado, foram utilizadas amostras de leite de tanque de 102 rebanhos bovinos comerciais do oeste de Santa Catarina.

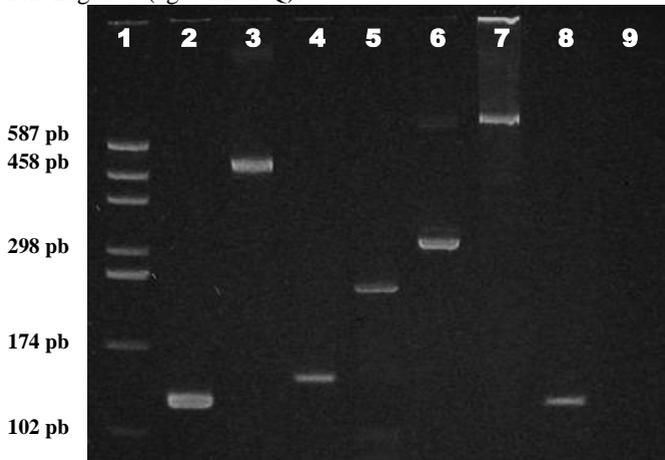
Devido à escassez de informações epidemiológicas sobre patógenos infecciosos com potencial zoonótico que acometem bovinos na região estudada com possibilidade de transmissão via leite, em 98 dos 102 rebanhos foi realizada uma amostragem individual por animal totalizando 1077 amostras, visando um levantamento epidemiológico dos patógenos circulantes. A localização georreferenciada das unidades de produção amostras está disponível na Figura 3.

5.1 DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.1.1 Avaliação dos iniciadores da PCR

Os seis pares de iniciadores descritos na tabela 2 foram testados individualmente e em conjunto quanto a sua especificidade e sensibilidade frente a amostras de DNA genômico isolado de seis amostras padrão das bactérias estudadas. Para tanto, a PCR individual foi padronizada em um volume final de reação de 10 μ L e os iniciadores Sag406-F, Sag114-R, Eco468-F, Eco468-R, Lmo133-F, Lmo133-R, Sal237-F, Sal237-R, Bab311-F, Bab311-R, Sau894-F e Sau894-R mostraram-se adequados para distinguir os microrganismos alvo gerando os produtos amplificados de tamanho esperado conforme mostrado na Figura 5.

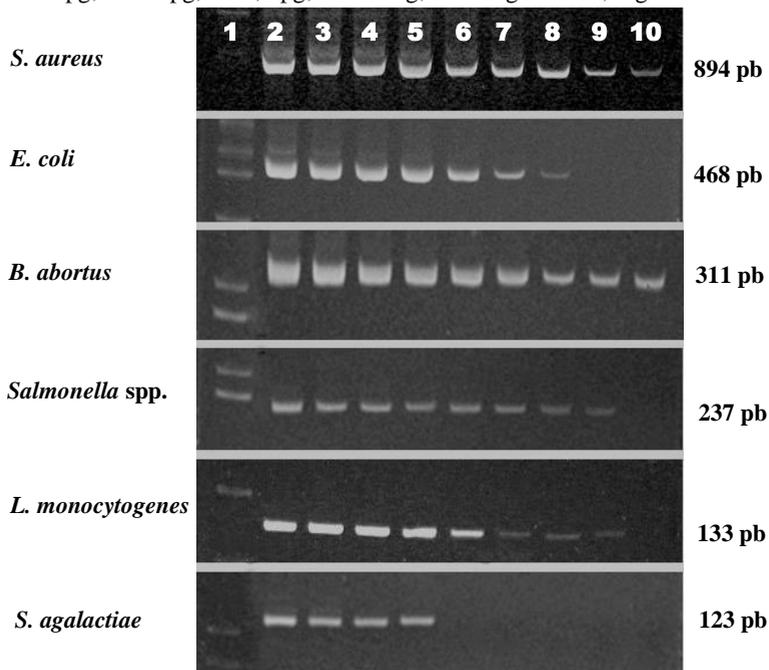
Figura 5 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando a especificidade dos produtos amplificados via PCR usando como molde uma mistura de DNA genômico a 1,0 ng de cada uma das seis espécies bacterianas testadas. Canaletas: 1 - padrão de peso molecular (pUC digerido com *Hae*III – Anexo A); 2 e 8 - *S. agalactiae*, 123 pb; 3 - *E. coli*, 468 pb; 4 - *L. monocytogenes*, 133 pb; 5 - *Salmonella* spp. 237 pb; 6 - *B. abortus*, 311 pb; 7 - *S. aureus*, 894 pb; 9 - controle negativo (água Milli-Q).



Fonte: O autor.

O limite de detecção da PCR, para cada par de iniciadores, usando DNA genômico variou conforme o agente. Para *S. aureus* e *B. abortus* o limite inferior foi de 1,0 fg, para *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. foi de 10 fg, para *E. coli* foi de 100 fg, enquanto que para a *S. agalactiae* foi de 100 pg (Figura 6).

Figura 6 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, representativo da sensibilidade dos iniciadores da PCR utilizando diferentes concentrações de DNA genômico, extraído de culturas puras. Canaleta: 1 - padrão de peso molecular (pUC digerido com *Hae*III); 2 - 100 ng; 3 - 10 ng; 4 - 1,0 ng; 5 - 100 pg; 6 - 10 pg; 7 - 1,0 pg; 8 - 100 fg; 9 - 10 fg e 10 - 1,0 fg.



Fonte: O autor.

5.1.2 Confirmação da identidade dos produtos de amplificação

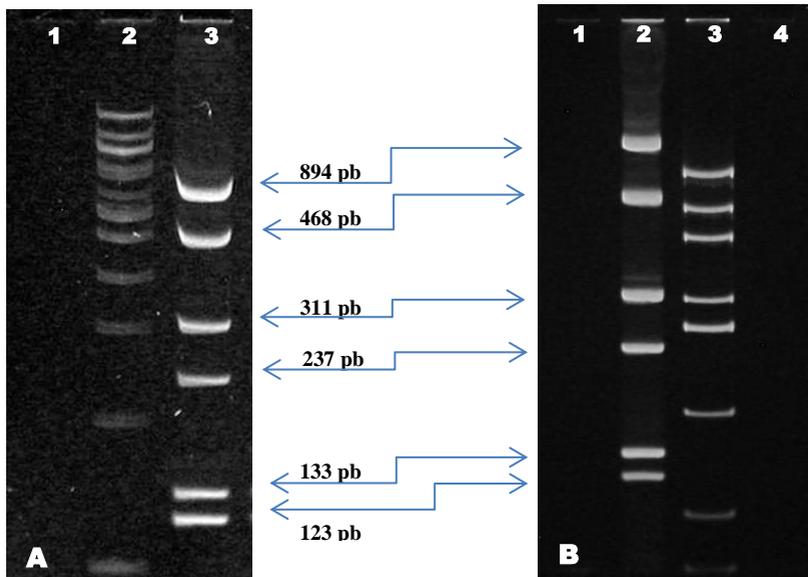
Para confirmar a especificidade dos fragmentos amplificados, os produtos da PCR foram sequenciados e as sequências obtidas foram analisadas quanto a sua qualidade pelo programa Phred/Phrap (Phred > 20) e confrontadas com sequências disponíveis na base de dados GenBank (BENSON et al., 2015), utilizando a ferramenta de BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Para comparação de identidade as sequências resultantes foram alinhadas com as sequências de referência através do método de ClustalW. Os produtos de amplificação de 123 pb, 133 pb, 237 pb mostraram identidade de 100% respectivamente para *S. agalactiae*, *L.*

monocytogenes e *Salmonella* spp. em todos os casos analisados. Para os produtos de 311 pb (*B. abortus*) e 894 pb (*S. aureus*) foi confirmada uma identidade de 99,7% e para o produto de 468 pb de *E. coli* a identidade foi de 97,4%, mostrando que o conjunto de iniciadores utilizados apresentam alta especificidade na identificação dos patógenos propostos.

5.1.3 Padronização do método analítico (mPCR)

A partir do protocolo inicial (CRESSIER; BISSONNETTE, 2011) e utilizando uma mistura à $1,0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de DNA de cada patógeno zoonótico estudado, foram realizados ajustes nas condições da reação (temperatura de ligação dos iniciadores, concentração de *Taq* DNA polimerase, concentração dos iniciadores, número de ciclos da PCR e tempo de extensão) buscando melhorar a sensibilidade da reação de multiplex PCR. Resumidamente, a reação da mPCR ficou padronizada para um volume final de 20 μL , contendo 10 μL de Qiagen Multiplex PCR Master Mix (2X), 1,0 μL da mistura de iniciadores, 1,0 μL de DNA molde, Q-Solution (5X) (Qiagen) e água RNase-free (Qiagen). Para amplificação a mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a $95^\circ\text{C}/15 \text{ min}$, seguido de 42 ciclos de amplificação (desnaturação a $94^\circ\text{C}/30 \text{ s}$, ligação a $58^\circ\text{C}/90 \text{ s}$ e extensão $72^\circ\text{C}/60 \text{ s}$), seguido de uma extensão final a $72^\circ\text{C}/10 \text{ min}$. O conjunto de iniciadores apresentou melhor eficiência quando utilizado nas seguintes concentrações finais: 0,15 pmol para Sau894, Eco468, Bab311 e Sal237, 0,20 pmol e 0,80 pmol, respectivamente para Lmo133 e o par Sag406-F e Sag114-R, permitindo a identificação simultânea por multiplex PCR de *S. aureus*, *E. coli*, *B. abortus*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *S. agalactiae* (Figura 7).

Figura 7 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, representativo da otimização da reação de PCR multiplex para detecção dos seis patógenos zoonóticos de interesse, usando como molde uma mistura de DNA genômico a 1,0 ng de cada espécie bacteriana. **Gel A**, canaletas: 1 – controle negativo; 2 – padrão de peso molecular (100bp DNA *Ladder*) e 3 – mPCR identificando simultaneamente *S. aureus* produto de 894 pb, *E. coli* 468 pb, *B. abortus* 311 pb, *Salmonella* spp. 237 pb, *L. monocytogenes* 133 pb e *S. agalactiae* 123 pb. **Gel B**, canaletas: 1 e 4 – controle negativo; 2 – mPCR e 3 – padrão de peso molecular (pUC digerido com *Hae*III).



Fonte: O autor.

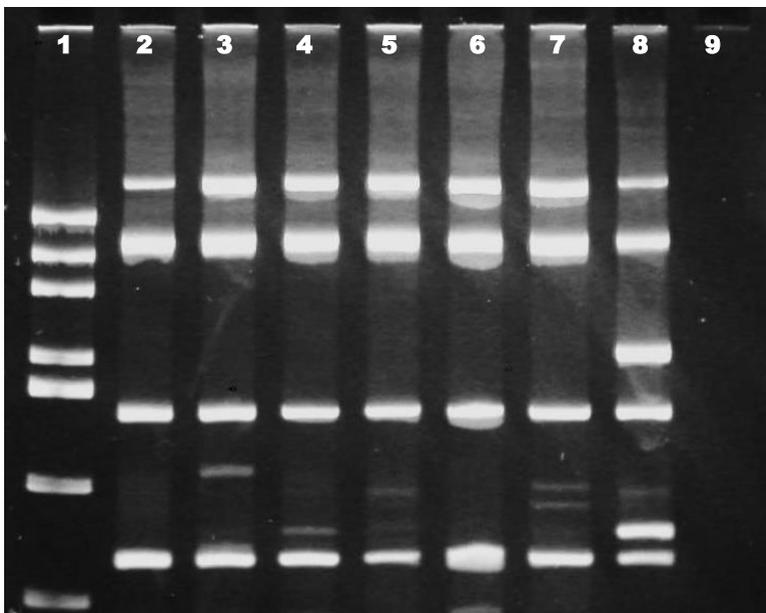
Nota: A e B representam os resultados da mPCR realizados em momentos distintos confirmando a reprodutibilidade da técnica.

5.1.4 Otimização da mPCR para detecção de patógenos em leite

Ao avaliar amostras de leite contaminadas artificialmente com concentrações conhecidas ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) dos seis patógenos zoonóticos estudados, incluindo uma etapa de pré-enriquecimento antes da obtenção do DNA genômico, foi observado baixa eficiência na amplificação dos produtos de 894 pb (*S. aureus*) e 133 pb (*L. monocytogenes*). A partir desta constatação, a concentração dos iniciadores Lmo133-F e Lmo133-R foi ajustada para 0,7 pmol e uma variedade de aditivos melhoradores

da PCR (DMSO, formamida, BSA e glicerol) em substituição a Solução-Q (betaína), foram testados no sentido de melhorar a sensibilidade e a especificidade da reação. Dentre todos os aditivos testados o melhor resultado foi obtido com a formamida 1,25%, que possibilitou a visualização da banda de 133pb, conforme mostrado na Figura 8.

Figura 8 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, representativo mostrando o efeito de diferentes aditivos na eficiência da reação de mPCR utilizando como molde o DNA extraído por fervura a partir de um cultivo de 8 horas em BHI, inoculado com 10 µL de leite contaminado com uma mistura de 10³ UFC.mL⁻¹ de cada microrganismo. Canaletas: 1 – padrão de peso molecular (pUC digerido com *Hae*III); 2 – Q-solution (Betaína) 5X; 3 – mPCR sem aditivos; 4 – Formamida 1,25%; 5 – DMSO 5%; 6 – BSA 5%; 7 – Glicerol 5%; 8 – Controle positivo (DNA a 1 ng); 9 – Controle negativo.

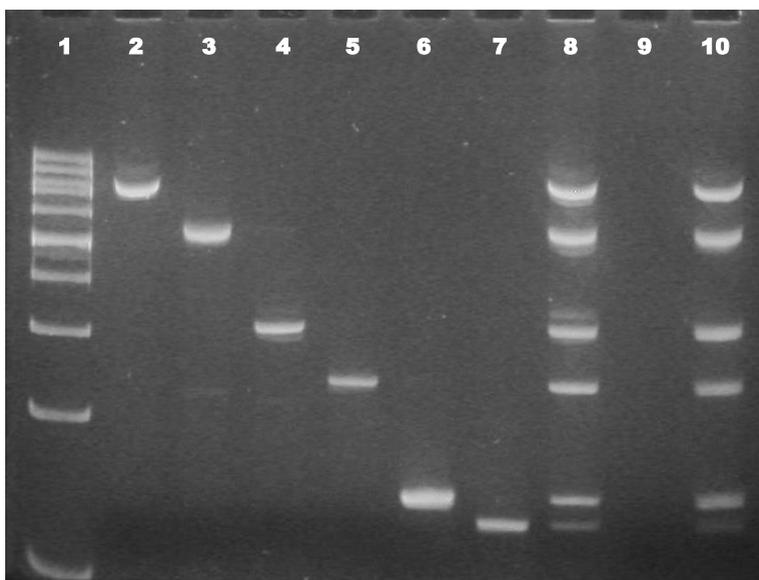


Fonte: O autor.

O método analítico desenvolvido, padronizado e otimizado, composto por uma etapa inicial de concentração do inóculo, seguida por uma etapa de enriquecimento da amostra, sucedida por extração térmica de DNA e detecção pela mPCR, foi capaz de identificar simultaneamente no leite bovino *S. aureus*, *E. coli*, *B. abortus*, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* e *S. agalactiae* (Figura 9), com possibilidade de detecção

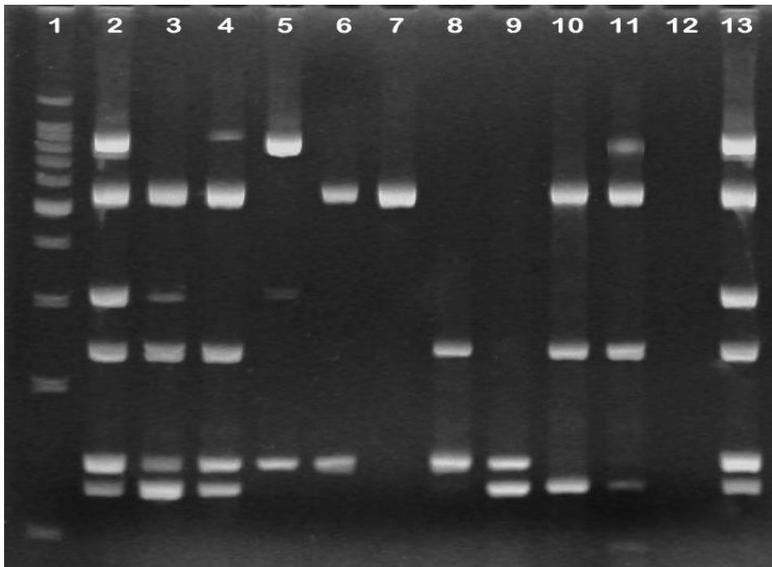
individual de patógenos (Figura 9) e também com diferentes arranjos de bactérias padrão (Figura 10), mostrando robustez e repetibilidade do método.

Figura 9 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando os resultados de amplificação dos genes de interesse em PCR individual e mPCR a partir de leite contaminado. DNA extraído por lise térmica foi usado como molde. Canaletas: 1 – padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder); 2 - *S. aureus*, 894 pb; 3 - *E. coli*, 468 pb; 4 - *B. abortus*, 311 pb; 5 - *Salmonella* spp., 237 pb; 6 - *L. monocytogenes*, 133 pb; 7 - *S. agalactiae*, 123 pb; 8 – mPCR identificando simultaneamente os 6 patógenos; 9 - controle negativo (água Milli-Q) e 10 - controle positivo (DNA 1,0 ng).



Fonte: O autor.

Figura 10 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando os resultados da mPCR em leite contaminado experimentalmente com diferentes misturas de bactérias padrão. A reação foi realizada conforme descrito anteriormente. Canaleta 1 – padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder); 2 – 11 leite contaminado com diferentes misturas bacterianas, sendo: 2 – *S. aureus* (894 pb), *E. coli* (468 pb), *B. abortus* (311 pb), *Salmonella* spp. (237 pb), *L. monocytogenes* (133 pb), *S. agalactiae* (123 pb); 3 – *E. coli*, *B. abortus*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. agalactiae*; 4 – *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *S. agalactiae*; 5 – *S. aureus*, *B. abortus*, *L. monocytogenes*; 6 – *E. coli*, *L. monocytogenes*; 7 – *E. coli*; 8 – *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*; 9 – *L. monocytogenes*, *S. agalactiae*; 10 – *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. agalactiae*; 11 – *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. agalactiae*; 12 – Controle negativo (água Milli-Q); 13 – Controle positivo (DNA a 1,0 ng).



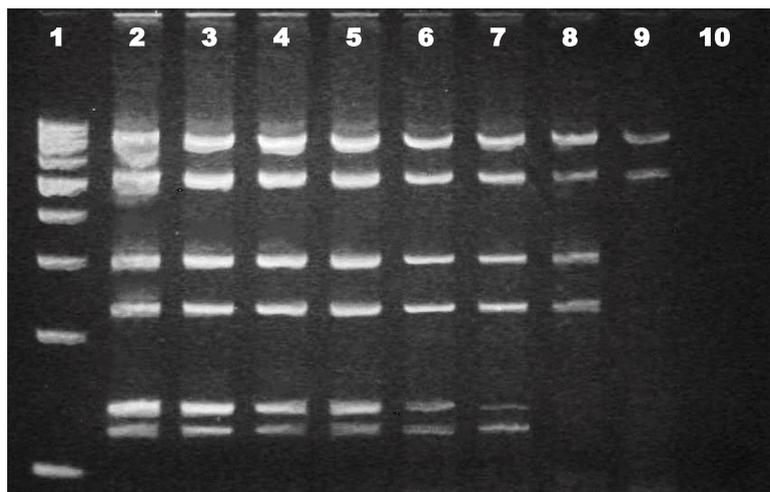
Fonte: O autor.

5.2 CARACTERIZAÇÃO ANÁLITICA DA METODOLOGIA DESENVOLVIDA

5.2.1 Sensibilidade analítica da mPCR

Utilizando como molde DNA genômico de culturas padrão em diluição seriada na base 10, o limite de detecção da mPCR foi de 1,0 fg para *S. aureus* e *E. coli*, 10 fg para *B. abortus* e *Salmonella* spp. e 100 fg para *L. monocytogenes* e *S. agalactiae* (Figura 11).

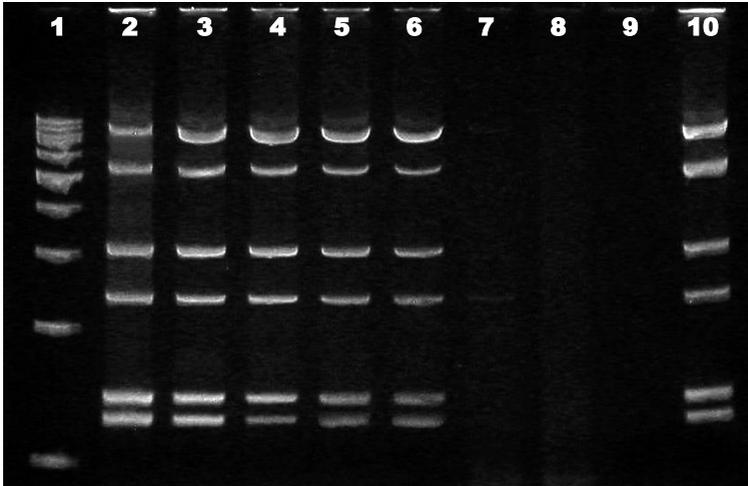
Figura 11 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando a sensibilidade analítica da mPCR, a partir de DNA genômico extraído de culturas puras, em diluições de 10 ng – 1,0 fg. Canaletas: 1 – padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder); 2 – 10 ng; 3 – 1,0 ng; 4 – 100 pg; 5 – 10 pg; 6 – 1,0 pg; 7 – 100 fg; 8 – 10 fg; 9 – 1,0 fg de DNA de cada microrganismo; 10 – Controle negativo.



Fonte: O autor

A sensibilidade de detecção das seis bactérias via mPCR de uma mistura com quantidade equivalente dos seis microrganismos em estudo, a partir da concentração de células sem extração de DNA, mostrou um limite inferior detectável de 10^3 UFC.mL⁻¹ (Figura - 12), portanto a presença de uma célula bacteriana de cada patógeno alvo na reação de mPCR foi suficiente para a detecção de todos os microrganismos buscados.

Figura 12 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando a sensibilidade analítica da mPCR a partir da concentração de células bacterianas sem extração prévia de DNA. Diluições de uma mistura de quantidades equivalentes das seis bactérias estudadas, sem extração de DNA, foram usadas como molde. Canaletas: 1 – padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder); 2 - 8 diferentes concentrações bacterianas, sendo: 2 – 10^5 ; 3 – 10^4 ; 4 – 10^3 ; 5 – 10^2 ; 6 – 10^1 ; 7 – 10^0 ; 8 – 10^{-1} bactérias. μL^{-1} ; 9 – controle negativo e 10 – controle positivo (DNA 1,0 ng).

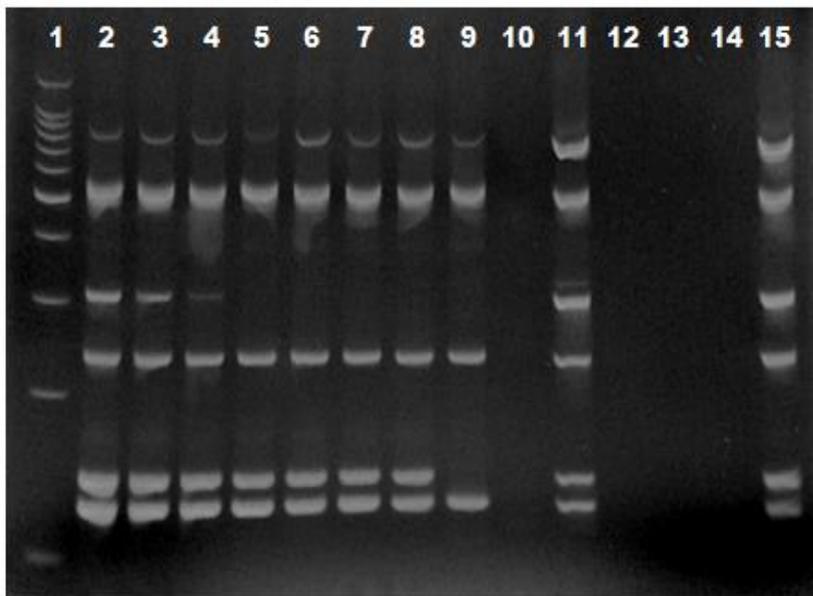


Fonte: O autor

O limite de detecção do mPCR para o sistema analítico desenvolvido em leite contaminado com concentrações conhecidas dos patógenos zoonóticos estudados foi de 10^0 UFC. mL^{-1} , exceto para *B. abortus* (Figura 13). Com relação à cultura microbiológica considerada como “padrão ouro”, o limite de detecção foi de 10^3 UFC. mL^{-1} para *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. agalactiae*, enquanto *L. monocytogenes* e *B. abortus* foi recuperada somente do leite contaminado com 10^4 UFC. mL^{-1} de cada bactéria.

Para o patógeno *B. abortus* o limite de detecção analítica da mPCR foi de 10^4 UFC. mL^{-1} . A população de *B. abortus* no leite, não foi afetada pelo passo de pré-enriquecimento (Figura 14 A e D).

Figura 13 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando a sensibilidade analítica da mPCR em leite contaminado. Canaleta 1 – padrão de peso molecular (100bp DNA Ladder); canaletas 2 a 9 - leite contaminado, sendo: 2 – 10^6 UFC.ml⁻¹; 3 – 10^5 UFC.ml⁻¹; 4 – 10^4 UFC.ml⁻¹; 5 – 10^3 UFC.ml⁻¹; 6 – 10^2 UFC.ml⁻¹; 7 – 10^1 UFC.ml⁻¹; 8 – 10^0 UFC.ml⁻¹; 9 – 10^{-1} UFC.ml⁻¹ de cada bactéria; 10 – controle negativo (CN) da reação; 11 – controle positivo (CP) (DNA a 1,0 ng.μl⁻¹); 12 – CN do leite, 13 – CN do BHI; 14 – CN água Milli-Q; 15 – CP do inóculo.



Fonte: O autor

5.2.2 Especificidade analítica da mPCR

A performance do teste de mPCR frente a detecção das cepas patogênicas padrão, comumente encontradas na microbiota autóctone do leite, e de isolados bacterianos originários de glândula mamária de bovinos mostrou especificidade de 100% no universo das amostras analisadas (Tabela 5).

Tabela 5 – Especificidade dos iniciadores na reação de mPCR frente ao DNA genômico de diferentes espécies bacterianas.

(continua)

Microorganismos	Resultado do mPCR					
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. abortus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>
	Sau894-F/ Sau894-R	Eco468-F/ Eco468-R	Bab311-F/ Bab311-R	Sal237-F/ Sal237-R	Lmo133-F/ Lmo133-R	Sag406-F/ Sag114-R
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923, 29213; CC* 6A, 6B, 15, 23A, 38, 40, 391A, 893, 1025)	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (ATCC 25922; VERTÀ** 09; CC 34, 39A)	-	+	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 7644, 19117; CC 33T)	-	-	-	-	+	-
<i>S. agalactiae</i> (ATCC 12386; CEDIMA*** 02; VERTÀ 04; CC 4a, 18, 391B)	-	-	-	-	-	+
<i>B. abortus</i> (Cepa S19)	-	-	+	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp. (ATCC 8327; VERTÀ 10)	-	-	-	+	-	-
<i>S. Typhimurium</i> (ATCC 14028)	-	-	-	+	-	-
<i>S. Pullorum</i> (ATCC 9120)	-	-	-	+	-	-
<i>S. Enteritidis</i> (ATCC 13076)	-	-	-	+	-	-
<i>S. Gallinarum</i> (ATCC 9184)	-	-	-	+	-	-
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	-	-	-	-	-	-
<i>S. hyicus</i> (VERTÀ 01, 02)	-	-	-	-	-	-
<i>S. Coagulase Negativa</i> (CC 8, 19B, 39B)	-	-	-	-	-	-
<i>S. Coagulase Positiva</i> (CC 23B)	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212, VERTÀ 03)	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i> spp. (CC 14)	-	-	-	-	-	-
<i>S. uberis</i> (CC 814)	-	-	-	-	-	-
<i>Corynebacterium</i> spp. (CC* 851)	-	-	-	-	-	-
<i>Listeria</i> spp. (CC* 44T)	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> spp. (VERTÀ 05)	-	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> spp. (CC* 923, 994A)	-	-	-	-	-	-

Tabela 5 – Especificidade dos iniciadores na reação de mPCR frente ao DNA genômico de diferentes espécies bacterianas.

(conclusão)

Microorganismos	Resultado do mPCR					
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. abortus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>
	Sau894-F/ Sal894-R	Eco468-F/ Eco468-R	Bab311-F/ Bab311-R	Sal237-F/ Sal237-R	Lmo133-F/ Lmo133-R	Sag406-F/ Sag114-R
<i>Klebsiella</i> spp. (CC* 968B, 732)	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp. (CC* 101T)	-	-	-	-	-	-
<i>Pasteurella multocida</i> (VERTÀ 07, 08)	-	-	-	-	-	-
<i>Manhemmia haemolytica</i> (VERTÀ 06)	-	-	-	-	-	-
<i>Levedura</i> (CC* 1010)	-	-	-	-	-	-

Fonte: O autor.

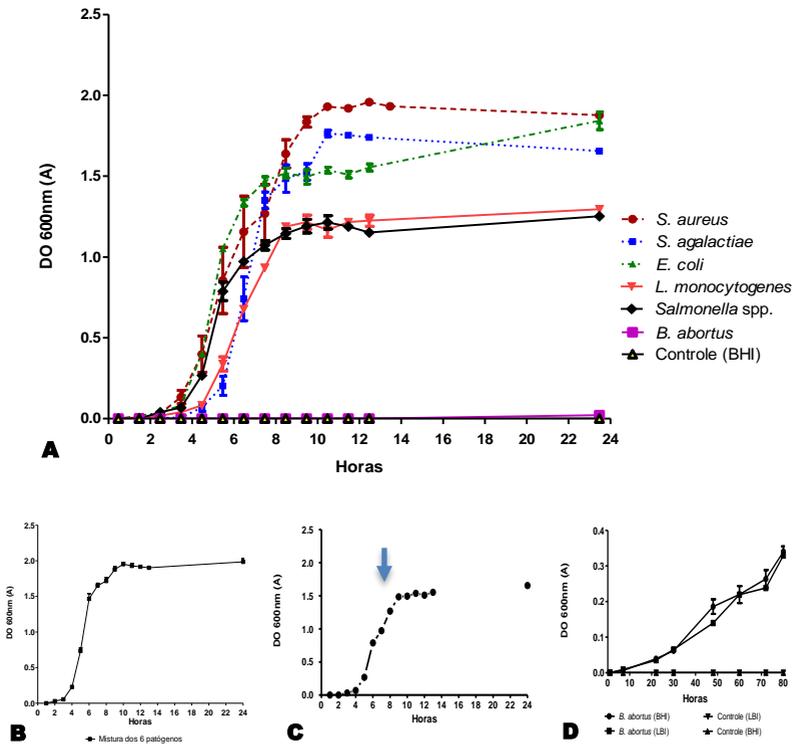
Notas: * CC: Cepas isoladas de glândula mamária bovina; ** VERTÀ: Cepas originárias do Instituto e Pesquisa e Diagnóstico Veterinário – VERTÀ; *** CEDIMA: Cepas oriundas do CEDIMA – CAV/UDESC; (+) presença de banda em mPCR; (-) ausência de bandas.

5.2.3 Tempo de enriquecimento prévio

Para determinação do tempo de enriquecimento otimizado foi avaliada a curva de crescimento de cada bactéria por D.O.600 nm (Figura 14 A). A partir destes dados foi construída uma curva média de crescimento para todas as bactérias exceto da *B. abortus*, e desta forma estabeleceu-se o tempo de enriquecimento prévio médio de 8 horas (Figura 14 C). A população de *Brucella* spp., não foi afetada pelo pré-enriquecimento proposto (Figura 14 D).

Acompanhando-se a curva de crescimento de uma mistura das seis bactérias estudadas (Figura 14 B), amostras foram retiradas em diferentes tempos para realização de mPCR, com intuito de verificar a que momento se iniciava a detecção de cada patógeno e uma possível inibição da técnica com o aumento do número de bactérias. Observamos que todos os patógenos investigados passaram a ser detectados entre 4 - 5 horas de cultivo e continuaram sendo detectados até completar 9 horas de enriquecimento, não ocorrendo inibição da reação (Figura 15).

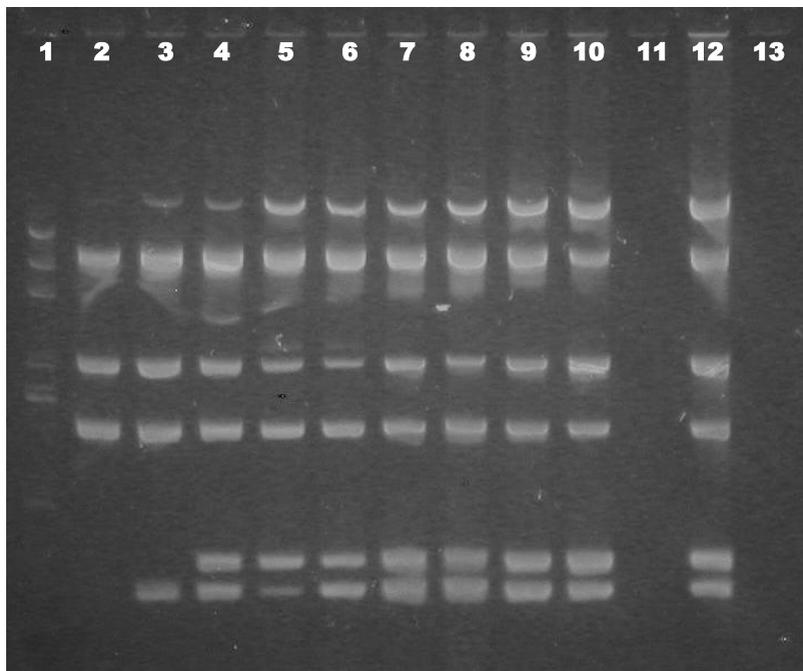
Figura 14 – Curvas de crescimento bacteriano em caldo BHI. **A** – Curvas de crescimento das bactérias padrão em 24 horas. **B** – Curva de crescimento de uma cultura inoculada com concentrações iguais dos 6 patógenos em estudo. **C** – Média da curva de crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *S. agalactiae*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* em 24 horas. **D** – Curvas de crescimento de *B. abortus* em dois diferentes meios de cultura em 80 horas.



Fonte: O Autor.

Notas: Os dados representam as médias de duas repetições com três réplicas cada. LBI – Meio de cultura caldo *Brucella*; BHI – Meio de cultura caldo de infusão cérebro e coração.

Figura 15 – Gel de poliacrilamida 8% corado pelo brometo de etídio, mostrando o tempo necessário de pré-enriquecimento em caldo BHI para iniciar a detecção por mPCR dos patógenos estudados. A reação foi realizada conforme descrito anteriormente. Canaleta 1 - padrão de peso molecular (pUC digerido com *Hae*III); Canaletas 2 – 9: tempo de cultivo em BHI, 2 a 9 horas respectivamente; 10 – controle positivo do inoculo inicial 10^8 UFC.mL⁻¹ de cada bactéria, 11 – controle negativo do meio de cultura (BHI); 12 – controle positivo (DNA a 1,0 ng); 13 – controle negativo da reação.



Fonte: O autor.

5.2.4 Validação analítica do sistema de diagnose desenvolvido para patógenos em leite

A validação do sistema desenvolvido em experimento “duplo-cego” com 15 amostras contendo diferentes combinações de concentração de cada bactéria padrão (Tabela 3) mostrou uma concordância de 100% entre as replicatas, nas duas repetições do experimento. A identificação dos patógenos por amostra (presença de banda de tamanho esperado na mPCR) pode ser observada na Tabela 6. Os patógenos de crescimento mais lento (Lmo e Sag), foram detectados

mesmo quando estes estavam na concentração de 10^2 UFC.ml⁻¹ em meio contendo concentração de 10^5 UFC.ml⁻¹ dos demais patógenos. Contrariamente, para *B. abortus* a detecção da banda esperada só foi possível quando todas as amostras estavam na mesma concentração de 10^2 UFC.ml⁻¹ ou quando *B. abortus* estava em concentração de 10^5 UFC.ml⁻¹. Os resultados deste experimento confirmam a repetibilidade intra-laboratorial do teste, por mostrar que não houve variação entre os resultados das réplicas.

Tabela 6 – Resultado da validação analítica da mPCR desenvolvida, por análise em duplo-cego de amostras de leite contaminadas (A – P) com diferentes combinações de concentrações (UFC.ml⁻¹) dos patógenos investigados.

Amostra	Resultado do mPCR [#]					
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. abortus</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>
	Sau894-F/ Sal894-R	Eco468-F/ Eco468-R	Bab311-F/ Bab311-R	Sal237-F/ Sal237-R	Lmo133-F/ Lmo133-R	Sag406-F/ Sag114-R
A	+**	+**	+**	-*	+*	+*
B	+*	+*	+*	+**	+**	+**
C	+**	+**	+**	+**	+*	+**
D	+**	+**	+**	+**	+**	+**
E	+*	+*	+*	+*	+*	+*
F	+*	+**	+*	-*	+*	+*
G	+*	+*	+*	+**	+*	+*
H	+**	+*	+*	-*	+*	+*
I	+*	+*	+**	-*	+*	+*
J	+*	+*	+*	-*	+*	+**
L	+*	+*	+*	-*	+**	+*
M	+**	-NC	-NC	+*	+*	-NC
N	-NC	+**	-NC	-*	+*	-NC
O	-NC	-NC	+**	-*	+*	-NC
P	-NC	-NC	-NC	-*	+*	+**
CN	-NC	-NC	-NC	-NC	-NC	-NC

Fonte: O autor.

Notas: [#] O resultado do mPCR mostrou total concordância entre as réplicas do duplo-cego; (+) Presença da banda na mPCR; (-) Ausência da banda na mPCR; (*) Amostra contaminada com 10^2 UFC.ml⁻¹; (**) Amostra contaminada com 10^5 UFC.ml⁻¹; NC – Amostra não contaminada; CN – Amostra de leite não contaminada.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DIAGNÓSTICA DA mPCR EM AMOSTRAS DE CAMPO

O método de detecção idealizado foi validado analisando amostras de campo e comparando o resultado com o diagnóstico por método de referência para cada patógeno alvo individualmente. Foram coletadas amostras de leite de tanque resfriadores em 102 rebanhos comerciais do oeste Catarinense, amostragem julgada necessária para estimar o rendimento diagnóstico (DSe e DSp) do método de detecção pela mPCR com 99% de confiança e considerando erro de 5% em função de um valor provável de DSe e DSp de 96%, conforme preconizado pela OIE. Os resultados são apresentados na tabela 7.

Comparando-se o desempenho da mPCR com o teste padrão-ouro, para cada patógeno individualmente, com 95% de segurança, foi obtido uma sensibilidade diagnóstica (DSe) para *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. coli* e *L. monocytogenes*, respectivamente de 95%, 92%, 87% e 93%. A baixa frequência absoluta de amostras positivas, proporcionou uma alta amplitude no intervalo de confiança para determinação DSe de *B. abortus* (0,6 – 80,6%) e *Salmonella* spp. (0,0 – 100%). Em contrapartida, a especificidade diagnóstica (DSp) foi elevada para todos os patógenos. A acurácia do teste mPCR foi de 97% para *B. abortus* e *Salmonella* spp., 95% para *S. aureus* e *L. monocytogenes* e para *S. agalactiae* e *E. coli* de 92% (Tabela 7).

Na comparação entre os dois testes, não houve diferença estatística significativa entre as duas metodologias para os seis microrganismos estudados (p McNemar > 0,05), portanto a eficiência diagnóstica do teste desenvolvido se assemelha a do teste de referência. Em relação à concordância entre os testes estimada pelo coeficiente kappa, obteve-se um valor de kappa (p > 0,0001) de 0,81 para *S. aureus*, 0,84 para *S. agalactiae*, 0,83 para *E. coli* e 0,77 para *L. monocytogenes*, 0,39 para *B. abortus* e insignificante (kappa 0,00 a 0,20) para *Salmonella* spp. (Tabela 7).

Tabela 7 – Rendimento diagnóstico do teste multiplex PCR, comparado com o padrão-ouro para cada um dos patógenos alvo individualmente, utilizando 102 amostras de leite de tanques de expansão de unidades produtoras comerciais do Oeste Catarinense, 2015-2016.

(continua)

Microorganismo Alvo	Teste Padrão-Ouro #		Teste mPCR desenvolvido	
	FA	Prevalência Verdadeira (IC 95%) *	FA	Prevalência Aparente (IC 95%) **
<i>S. aureus</i>	88	86,3% (0,765 – 0,933)	85	83,3% (0,749 – 0,893)
	<p>p McNemar = 0,37 Kappa= 0,8101 (0,6498 – 0,9704), p= 0,0001 DSe: 0,9545 (0,8877 – 0,9875) ***; DS_p: 0,9286 (0,6613 – 0,9982) *** Acurácia: 0,9510; VPP: 98,8%; VPN: 76,4%; RVP: 13,37; RVN: 0,049</p>			
<i>S. agalactiae</i>	40	39,2% (0,280 – 0,508)	42	41,2% (0,321 – 0,509)
	<p>p McNemar = 0,72 Kappa= 0,8369 (0,7286 – 0,9453), p= 0,0001 DSe: 0,9250 (0,7961 – 0,9843); DS_p: 0,9194 (0,8217 – 0,9733) Acurácia: 0,9216; VPP: 88,1%; VPN: 95%; RVP: 11,47; RVN: 0,082</p>			
<i>E. coli</i>	39	38,2% (0,273 – 0,501)	37	36,3% (0,276 – 0,459)
	<p>p McNemar = 0,72 Kappa= 0,8323 (0,7210 – 0,9437), p= 0,0001 DSe: 0,8718 (0,7257 – 0,9570); DS_p: 0,9524 (0,8671 – 0,9901) Acurácia: 0,9216; VPP: 91,9%; VPN: 92,3%; RVP: 18,31; RVN: 0,135</p>			
<i>L. monocytogenes</i>	12	11,8% (0,047 – 0,218)	13	12,7% (0,076 – 0,206)
	<p>p McNemar = 1,00 Kappa= 0,7721 (0,5805 – 0,9638), p= 0,0001 DSe: 0,8333 (0,5159 – 0,9791); DS_p: 0,9667 (0,9057 – 0,9931) Acurácia: 0,9510; VPP: 76,9%; VPN: 97,8%; RVP: 25,02; RVN: 0,172</p>			
<i>B. abortus</i> #	4	3,9% (0,002 – 0,202)	1	1,0% (0,002 – 0,053)
	<p>p McNemar = 0,25 Kappa= 0,3904 (-0,1483 – 0,9291), p= 0,0001 DSe: 0,25 (0,0063 – 0,8059); DS_p: 1,0 (0,9631 – 1,00) Acurácia: 0,9706; VPP: 100%; VPN: 97%; RVP: NC; RVN: 0,75</p>			
<i>Salmonella</i> spp.	0	0,0%	3	2,9% (0,01 – 0,083)
	<p>p McNemar = 0,25 Kappa= 0, p= NC DSe: 0 (0,0 – 1,0); DS_p: 0,9706 (0,9164 – 0,9939) Acurácia: 0,9706</p>			

Fonte: O autor.

Tabela 7 – Rendimento diagnóstico do teste multiplex PCR, comparado com o padrão-ouro para cada um dos patógenos alvo individualmente, utilizando 102 amostras de leite de tanques de expansão de unidades produtoras comerciais do Oeste Catarinense, 2015-2016.

(conclusão)

Notas: FA – Frequência absoluta; IC – Intervalo de confiança; NC: não calculável; DSe – Sensibilidade diagnóstica; DSp – Especificidade diagnóstica; VPP – Valor preditivo positivo; VPN – Valor preditivo negativo; RVP – Razão de verossimilhança positiva; RVN – Razão de verossimilhança negativa.

* IC 95% para prevalência verdadeira usando intervalo de Blaker's.

** IC 95% para prevalência aparente usando aproximação binomial de Wilson.

*** IC 95% de Clopper-Pearson (exato) para DSe e DSp.

Isolamento microbiológico foi o padrão-ouro, exceto para *B. abortus* onde foram usados testes sorológicos para comparativo.

A prevalência dos patógenos alvo, em amostras de leite de tanque resfriador ($n = 102$), a através de isolamento microbiológico seletivo foi de 86,3% (76,5% – 93,3%) para *S. aureus*, 39,2% (28,0% – 50,8%) para *S. agalactiae*, 38,2% (27,3% – 50,1%) para *E. coli*, 11,8% (4,7% – 21,8%) para *L. monocytogenes*, enquanto que para *Salmonella* spp. não se obteve isolamento microbiológico em nenhuma das 102 amostras avaliadas. Contudo, os resultados da mPCR mostraram uma prevalência de 2,9% (1,0% – 8,3%) para *Salmonella* spp. nestas mesmas amostras. Para *B. abortus* foi obtida uma prevalência sorológica de 3,9% (0,2% – 20,2%), enquanto que a mPCR mostrou uma prevalência de 1% (Tabela 7).

5.4 LEVANTAMENTO DOS PATÓGENOS ZONÓTICOS CIRCULANTES

Para gerar informações sobre patógenos infecciosos com potencial zoonótico que acometem rebanho leiteiro comercial do Oeste de Santa Catarina foi realizado um levantamento epidemiológico prospectivo em 98 rebanhos através de estudo com delineamento observacional transversal. Os rebanhos participantes foram selecionados por sorteio aleatório estratificado pelo número de vacas em lactação por unidade de produção. O número de animais amostrados por propriedade variou de acordo com o número de vacas em lactação no rebanho, conforme Tabela 4. Desta forma, amostras de leite (*pool* dos quatro quartos mamários) de 1077 animais foram incluídas na análise microbiológica do leite (Figura

16) e soros para avaliação da prevalência sorológica de anticorpos anti-*brucelas* lisas (Figura 17).

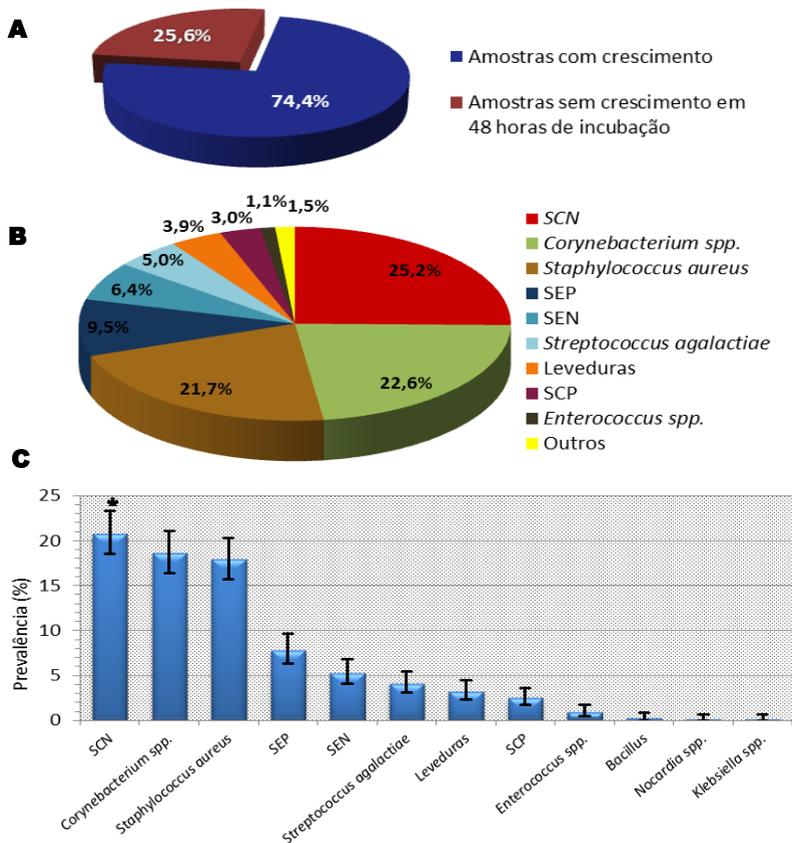
5.4.1 Perfil microbiológico de patógenos em leite

O perfil de microrganismos presentes em glândula mamária de 1077 vacas em lactação no oeste de catarinense foi determinado seguindo-se as recomendações do *National Mastitis Council* (NMC, 2004) e Quinn et al. (2005).

Apresentaram microbiologia positiva 74,4% dos animais analisados, sendo 715 com infecção por um único patógeno e 86 com infecção mista, totalizando 887 microrganismos isolados. A frequência relativa entre os isolados pode ser observada na Figura 16 B. Não houve isolamento em 25,6% das vacas lactantes amostradas (Figura 16 A).

O perfil de prevalência dos patógenos foi determinado pela frequência relativa com intervalo de segurança de 95%, sendo o *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) o agente de maior ocorrência, 20,8% (18,5 - 23,3%), seguido do *Corynebacterium* spp. 18,7% (16,4 - 21,1%), *Staphylococcus aureus* 17,9% (15,7 - 20,3%), *Streptococcus* esculina positiva (SEP) 7,8% (6,3 - 9,6%), *Streptococcus* esculina negativa (SEN) 5,3% (4,1 - 6,8%), *Streptococcus agalactiae* 4,1% (3,1 - 5,4%), leveduras 3,2% (2,3 - 4,5%), *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP) 2,5% (1,7 - 3,6%), *Enterococcus* spp. 0,9% (0,51 - 1,7%), *Bacillus* spp. 0,3% (0,004 - 0,8%), *Nocardia* spp. e *Klebsiella* spp. 0,2% (0,0004 - 0,67%) e 0,1% de *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. e fungo. (Figura 16C).

Figura 16 – Perfil microbiológico de patógenos isolados de glândula mamária em rebanhos leiteiros no Oeste de Santa Catarina, 2015 – 2016. **A** – Frequência de amostras com e sem isolamento de microrganismos em 48 horas de incubação (n= 1077). **B** – Frequência relativa dos principais patógenos dentre os isolados positivos (n= 887). **C** – Prevalência estima dos principais patógenos isolados (n= 1077).



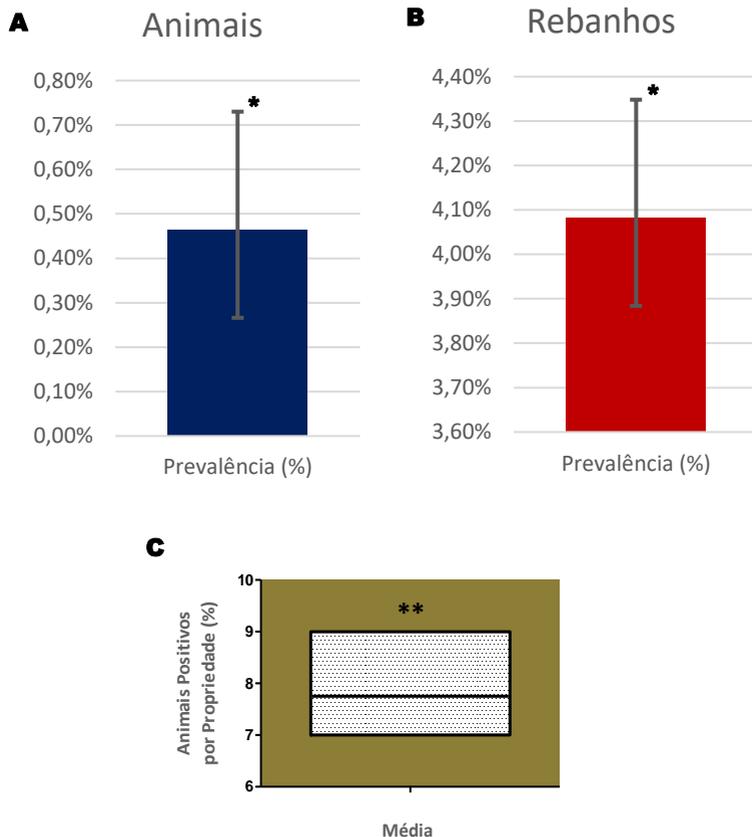
Fonte: O autor.

Notas: SCP – *Staphylococcus* Coagulase Positiva; SCN – *Staphylococcus* Coagulase Negativa; SEN – *Streptococcus* Esculina Negativa; SEP – *Streptococcus* Esculina Positiva; C/C – Amostra contaminada (com crescimento de mais de três agentes); * IC 95% para prevalência estimada usando aproximação binomial de Wilson.

5.4.2 Prevalência de animais com anticorpos anti-brucelas lisas em rebanhos leiteiros

Resultados do estudo demonstram que a população catarinense continua susceptível ao patógeno zoonótico *Brucella abortus*. A prevalência de fêmeas lactantes com anticorpos anti-brucelas lisas foi de 0,46% (0,27% – 0,62%), n= 1077 animais (Figura 17 A). Em 4,1% (2,48 – 5,94%) dos rebanhos comerciais para produção de leite no Oeste Catarinense (n= 98), foi detectado a presença de animais positivos para anticorpos anti-brucelas lisas (Figura 17B). A média de ocorrência de animais soropositivos em rebanhos que apresentaram a enfermidade foi de 7,75% (Figura 17C).

Figura 17 – Prevalência de animais com anticorpos anti-brucelas lisas em rebanhos leiteiros comerciais do Oeste Catarinenses, 2015 – 2016. **A** – Prevalência de animais positivos. **B** – Frequência relativa de rebanhos positivos. **C** – Percentual de animais positivos em rebanhos com a enfermidade.



Fonte: O autor.

Notas: * IC 95% para prevalência estimada usando aproximação binomial de Wilson; ** Amplitude (limite superior e inferior).

6 DISCUSSÃO

Métodos diagnósticos para patógenos zoonóticos aplicados à medicina veterinária são detentores de notória relevância para saúde única. No contexto do controle e erradicação de doença animal, têm o objetivo de identificar rebanhos doentes e animais infectados dentro dos rebanhos. Relacionado à segurança dos alimentos, o teste diagnóstico, precisa comprovar a ausência de patógenos alvos ou a inocuidade, seja na origem (matéria-prima), nos processos de produção (com produtos rastreados e monitorados) ou no produto final.

O leite é um dos principais produtos do agronegócio brasileiro (CEPEA, 2011; EPAGRI, 2016) e tem elevada relevância social, além de ser um dos produtos de maior importância para a alimentação humana no país (GUIMARÃES; LANGONI, 2010). No entanto, aproximadamente 33% da produção anual de leite não sofre pasteurização (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012; ZOCCAL, 2012). Além disso, inexistente um monitoramento de patógenos zoonóticos na cadeia láctea e há uma escassez de informações epidemiológicas, tanto na saúde pública quanto na defesa sanitária animal, nos vários níveis geopolíticos (SANTANA et al., 2010). O controle de patógenos zoonóticos é indispensável para segurança dos alimentos e competitividade dos produtos da cadeia láctea nacional, mas os métodos atualmente disponíveis são laboriosos, demorados e pouco eficientes (CHIANG et al., 2012; CREMONESI et al., 2005; GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005; KIM, H. W. et al., 2010; TAPONEN et al., 2009). Neste contexto foi idealizado um método diagnóstico, visando identificar os principais patógenos responsáveis por elevadas perdas produtivas e suprir a necessidade de biosseguridade do leite como alimento, com o intuito de possibilitar a competitividade econômica e sanitária do leite brasileiro.

Informações diagnósticas confiáveis são imprescindíveis para a realização de avaliações e intervenções relevantes, possibilitando tomadas de decisões adequadas em saúde pública, agronegócios, tramites de comércio internacional, segurança dos alimentos e no desenvolvimento de novas tecnologias e formas de tratamentos. A credibilidade atribuída aos resultados obtidos a partir dos ensaios laboratoriais é diretamente dependente da validação do método utilizado (DINIZ, 2013).

A Organização Mundial do Comércio (OMC) reconheceu três organizações internacionais como órgãos competentes para a definição de normas: a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), reconhecida

como referência em padrões de saúde animal; a Comissão do Codex *Alimentarius* (Codex), órgão da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO); e a Organização Mundial da Saúde (OMS), que elabora normas para a segurança dos alimentos e saúde pública (WIEGERS, 2002). Conforme exposto, a validação do método diagnóstico desenvolvido neste estudo seguiu as orientações do Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres da OIE, que segundo Diniz (2013) é a organização que apresenta o maior número de critérios de validação de métodos, o que geraria uma maior aceitação internacional do ensaio a ser validado. A consulta de tal documento, em associação a artigos científicos especializados, gera um sinergismo e tende a potencializar a validação do ensaio diagnóstico (DINIZ, 2013).

A biologia molecular vem sendo amplamente utilizada em estudos epidemiológicos de enfermidades infectocontagiosas de caráter zoonótico (LAW et al., 2015; PAULA et al., 2015; ZADOKS et al., 2011). O desenvolvimento de novos métodos moleculares para uso em medicina humana tem facilitado e oportunizado estudos destes microrganismos em animais e alimentos de origem animal. Os métodos genotípicos têm substituído com êxito os métodos fenotípicos que apresentam limitada confiabilidade e são baseados em características instáveis dos microrganismos (CHIANG et al., 2008; CHIANG et al., 2012; LEE, K. H. et al., 2008; MEIRI-BENDEK et al., 2002; SILVA, E. R.; SILVA, 2005; ZHAO et al., 2014; ZSCHOCK et al., 2005). Dentre as metodologias moleculares mais utilizadas, as tecnologias baseadas na PCR, têm revolucionado o diagnóstico das enfermidades infecciosas, por apresentar vantagens como rapidez, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, possibilidade de detectar patógenos fastidiosos ou não cultiváveis nos testes convencionais e uso de vários moldes não infecciosos como material de partida. Também, são rentáveis e apresentam potencialidade para automação, de modo que são ideais para se obter alto rendimento no diagnóstico laboratorial, fato indispensável ao se tratar da cadeia láctea devido ao volume potencial de amostras (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2012).

O método baseado na PCR já mostrou ser uma ferramenta útil para resolução de etiologias bacteriana em amostras de leite bovino (FORSMAN; TILSALA-TIMISJARVI; ALATOSSAVA, 1997; GILLESPIE; OLIVER, 2005; NING et al., 2012; PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001; SHOME et al., 2011) e na detecção de agentes patogênicos de origem alimentar (CHIANG et al., 2012; CREMONESI et al., 2005; HOFFMANN et al., 2014; KIM, J. H. et al.,

2014). A especificidade da PCR depende da fidelidade dos iniciadores utilizados, já a sensibilidade depende das condições da reação, da pureza e da quantidade de DNA (TAMARAPU; MCKILLIP; DRAKE, 2001). A maximização destas características foi buscada no desenvolvimento de um sistema de detecção de patógenos zoonóticos em leite bovino baseado em PCR multiplex.

O sistema analítico idealizado, que tem como base a técnica de mPCR, propõem um conjunto de seis pares de iniciadores (descritos na Tabela 2), para detecção de seis patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella sp.*, *Streptococcus agalactiae* e *Brucella abortus*), de importância para saúde pública devido ao potencial zoonótico e, englobando os principais microrganismos causadores de mastite bovina responsáveis por prejuízos consideráveis ao agronegócio do leite. Os pares de iniciadores escolhidos e/ou desenhados mostraram capacidade de distinguir os microrganismos alvo (Figura 5), apresentaram excelente limite de detecção individual na PCR variando entre 10pg e 1fg de DNA genômico conforme o agente (Figura 6) e foram altamente específicos na identificação dos alvos patogênicos, conforme confirmação por sequenciamento dos produtos gerados. Estes resultados de apropriada especificidade e capacidade de detecção dos iniciadores, foram iguais ou superiores aos relatados na literatura por outros autores em pesquisas de detecção simultânea de patógenos em leite, usando PCR multiplex (CHIANG et al., 2012; KIM, J. H. et al., 2014; OMICCIOLI et al., 2009; PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001). Salienta-se que o processo de identificação ou desenho dos iniciadores é um dos principais fatores limitantes para a eficiência da técnica.

O sistema analítico proposto consiste em cinco etapas principais, a saber: (1) concentração da amostra pré-inoculação; (2) enriquecimento preliminar da amostra; (3) extração térmica do material genético da amostra; (4) amplificação por mPCR e (5) detecção por eletroforese em gel de poliacrilamida das sequencias amplificadas.

Na padronização da mPCR, as concentrações de iniciadores foram determinadas para alcançar a melhor eficiência de amplificação sem competição. Outros fatores críticos como concentração de *Taq* DNA polimerase, tempo e temperatura de ciclagem, concentração de DNA molde e adição de aditivos, foram otimizados seguindo orientações de Henegariu et al. (1997), Loffert et al. (1999) e Markoulatos, Sifakas e Moncany (2002), proporcionando um teste robusto e reprodutível, capaz de detectar os seis patógenos alvos individual ou simultaneamente ou em diferentes arranjos, isto é: quantidades diferentes dos patógenos (Figuras 9 e 10). Não foi encontrado descrição na literatura nem em base de dados

de patentes de outro teste diagnóstico com a mesma configuração de patógenos.

Os aditivos são substâncias conhecidas por terem efeitos benéficos nas reações de amplificação, mas é impossível prever qual substância será útil num contexto particular e, portanto, devem ser testados empiricamente para cada reação. O DMSO é útil para reduzir estruturas secundárias e na amplificação de DNA rico em CG (JENSEN; FUKUSHIMA; DAVIS, 2010; SEIFI et al., 2012), quando usado em concentração final entre 2% a 10%, sendo que a concentração de 10% pode reduzir em 50% a atividade da *Taq* polimerase (GELFAND, 1989). Com atuação semelhante, a betaína base da maioria dos aditivos comerciais, inclusive do Q-Solution (Qiagen) como demonstrado por Frackman et al. (1998), geralmente é usada na concentração de 1,0 a 1,7 M (SEIFI et al., 2012). A formamida é indicada para melhorar a eficiência da PCR em concentrações que variam de 1% a 5% (SARKAR; KAPELNER; SOMMER, 1990). O BSA 5% é descrito como aditivo útil na amplificação de DNA quando a amostra possui inibidores da PCR, como no caso do leite. No presente estudo foram testados cinco aditivos (Solução-Q[®] (betaína), formamida 1,25%, DMSO 5%, glicerol 5% e BSA 5%), mas o melhor resultado foi obtido com a formamida 1,25%, conforme mostrado na Figura 8.

A formamida foi então testada em diferentes concentrações (1,25%, 2,5%, 5%, e 10), pois segundo Gelfand (1989) até a concentração de 10% não afeta a atividade da *Taq* polimerase. A concentração de 1,25% foi a que apresentou os melhores resultados com amplificação de todos os patógenos alvos na mPCR. Em nossas condições experimentais, concentrações de 2,5% e 5% inibiram parcialmente a reação e 10% inibiu totalmente a atividade da *Taq* DNA polimerase (resultados não apresentados), corroborando com o relatado por Sarkar, Kapelner e Sommer (1990).

De acordo com os resultados da PCR multiplex, para caracterização analítica do método, executada com diluição seriada do DNA genômico, verificou-se que a concentração mínima do DNA necessário para a reação variou de 100 fg.μL⁻¹ a 1 fg.μL⁻¹ conforme o alvo (Figura 11). As concentrações necessárias para amplificação foram inferiores às requeridas em estudos anteriores (KIM, J. H. et al., 2014; ORZIL et al., 2016; PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001; TROCANTELLI et al., 2015; YANG et al., 2013) e semelhante à observada por Shome et al. (2011), que foi de 10 fg de DNA genômico. No presente estudo, ao compararmos os limiares inferiores de detecção

dos iniciadores, mostrados pela PCR convencional com os obtidos na mPCR, verificamos que a sensibilidade foi idêntica nas duas técnicas para detecção de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, para *B. abortus* e *Salmonella* spp. apresentou a redução de um log (1 fg para 10 fg e 10 fg para 100 fg, respectivamente) e para *S. agalactiae* e *E. coli* observamos um aumento na sensibilidade dos iniciadores quando usados na mPCR (Figuras 6 e 11).

A caracterização analítica do teste desenvolvido, mostrou limite de detecção de 10^0 CFU.mL⁻¹ em leite para as espécies avaliadas, exceto para *B. abortus* para o qual o limite de detecção em leite foi de 10^4 UFC.mL⁻¹ (Figura 13). A sensibilidade analítica do método foi superior ao padrão-ouro e a maioria dos demais ensaios bacterianos do estado da técnica até então relatados, em condições semelhantes (mPCR para diagnóstico de agentes em leite). Vários estudos envolvendo a técnica de mPCR para detecção de patógenos em leite apresentam sensibilidade máxima de 10^3 CFU.mL⁻¹ (GANDRA et al., 2016; RAMESH et al., 2002; RIFFON et al., 2001; SILVA, M. A., 2008; TROCANTELLI et al., 2015). Um nível de sensibilidade entre $10^3 - 10^5$ UFC.mL⁻¹ para a detecção de patógenos de mastite em leite por mPCR e por biochip, foi anteriormente relatado (LEE, K. H. et al., 2008; PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001). Em outro estudo, o limite de detecção do ensaio de mPCR para a detecção de agentes patogênicos da mastite foi apresentado como sendo de $10^3 - 10^4$ CFU.mL⁻¹ (GILLESPIE; OLIVER, 2005). Sensibilidade de 10^4 CFU.mL⁻¹ foi reportada para identificação de genes patogênicos de *E. coli* em leite e produtos lácteos (BOTTERO et al., 2004).

Shome et al, (2011), estudando patógenos da mastite em leite, utilizando um protocolo de extração comercial de DNA direto do leite, verificaram que a mPCR mostrou limites detectáveis de 10^2 CFU.mL⁻¹ para *S. agalactiae* e de 10^1 CFU.mL⁻¹ para *S. aureus* e *E. coli*, porém estes utilizaram um protocolo de extração comercial direta do leite. Para os mesmos agentes Cressier e Bissonnette (2011), descreveram limite de detecção de 10^2 CFU.mL⁻¹ analisando os produtos de amplificação por eletroforese capilar. O uso de kit comercial para extração de DNA onera o teste dificultando sua utilização, assim como a análise por eletroforese capilar. Ressalta-se que o limite de detecção de 10^0 CFU.mL⁻¹ mostrado neste estudo, foi obtido utilizando-se um protocolo de extração por calor e sem adição de nenhum reagente, buscando-se o menor custo fixo para o teste, visando viabilizar sua utilização no cotidiano da pecuária de leite.

Estudo avaliando o potencial de um mPCR para detecção de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. causadores de mastite verificou sensibilidade de 10^6 CFU.mL⁻¹ realizando extração do DNA a

partir do leite total pelo método de fenol-clorofórmio e 10^4 CFU.mL⁻¹ utilizando um kit comercial (PHUEKTES; MANSELL; BROWNING, 2001). Diluindo o leite em água destilada, estes autores verificaram que o limite de detecção foi de 10^1 CFU.mL⁻¹ e 10^2 CFU.mL⁻¹ respectivamente e após enriquecimento da amostra em meio TSB, 37°C por 8-12 horas a sensibilidade aumentou para 10^0 CFU.mL⁻¹ independentemente do método de extração.

A presença de inibidores da reação de PCR em leite foi relatada (RIFFON et al., 2001). No entanto, os inibidores exatos no leite não foram identificados (LEE, K. H. et al., 2008). Aslam, Hogan e Smith (2003), sugeriram que a gordura do leite poderia recobrir a superfície de microrganismo e dificultar sua lise. Particularmente no leite, componentes como cálcio, proteinase, gordura e proteínas do leite, principalmente a caseína formando micelas em associação com o cálcio, podem bloquear o DNA e impedir o acesso da *Taq* polimerase (SILVA, M. A., 2008). Neste sentido, o desenvolvimento de uma estratégia de preparação da amostra que possa capturar o DNA da bactéria patogênica no alimento em alta qualidade torna-se necessária. Uma ferramenta de baixo custo para superar inibidores de PCR presentes no leite envolve a diluição e lavagem da amostra, condição que se consegue com o enriquecimento da amostra. Lee et al. (2008) identificaram como importante e necessário um passo de enriquecimento para detecção de concentração inferior a 10^3 UFC.mL⁻¹. Estudo utilizando o método da PCR para a detecção de *S. agalactiae* em leite, com previa extração por fervura, mostrou que um passo de enriquecimento durante a noite aumentou a sensibilidade do ensaio em 4 logs de $10^4 - 10^5$ UFC.mL⁻¹ para 10^0 UFC.mL⁻¹ (MEIRI-BENDEK et al., 2002). Estes mesmos autores utilizando a extração por fenol-clorofórmio, sem enriquecimento prévio, obtiveram um limite de detecção de 10^6 UFC.mL⁻¹. Em nosso estudo o limite de detecção idêntico foi obtido em nosso trabalho quando realizada a extração por fervura sem o passo de enriquecimento, dados não mostrados. Estudo de Chiang et al., (2012) mostrou que o enriquecimento da amostra em caldo TSB por 8 horas a 37°C, aumentou a sensibilidade de $10^3 - 10^4$ UFC.mL⁻¹ para 10^0 UFC.mL⁻¹ de oito patógenos de origem alimentar em leite quando utilizada a mPCR associada a hibridização em microarranjos de DNA. A inclusão de um passo prévio de enriquecimento em meio líquido (TSB) por 10 horas a 37°C, melhorou o limite de detecção de 10^3 UFC.mL⁻¹ para 10^0 UFC.mL⁻¹ de três espécies de *Streptococcus* envolvidos em mastite bovina incluindo *S. agalactiae* utilizando mPCR (CHIANG et al., 2008). No presente estudo avaliando

a curva de crescimento dos patógenos alvo, foi estabelecido 8 horas como tempo ideal para o enriquecimento da amostra no sistema proposto (Figura 14).

Embora a sensibilidade do método de extração de DNA é importante, muitos outros fatores como: tempo requerido, o custo por teste e a necessidade de reagentes específicos devem ser considerados (CREMONESI et al., 2006). No sistema de detecção proposto, o método apresentado para a extração de DNA bacteriano, precedido por uma etapa de enriquecimento, se mostrou eficiente, reprodutível, de fácil execução, não requer equipamentos sofisticados, os reagentes utilizados são economicamente acessíveis, e demanda pouca manipulação da amostra. Destaca-se na metodologia proposta a agilidade no diagnóstico que pode ser obtido em um período de 15 horas, ao passo que um exame microbiológico demanda de 48 horas a 10 dias ou mais, para obter o resultado (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005). Esta característica credencia o método proposto para utilização na rotina de detecção de patógenos no leite.

A especificidade analítica, outra característica a ser considerada na avaliação de um novo teste, segundo a OIE, definida como a capacidade de um ensaio em distinguir os agentes de interesse diante de outros agentes estreitamente relacionados (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014a), foi de 100% para a mPCR proposta, uma vez que não ocorreu amplificação do DNA de microrganismos não alvo, apresentados na Tabela 5. Estes resultados corroboram dados de outros autores utilizando a técnica de mPCR na detecção de patógenos em leite bovino (CHIANG et al., 2012; SHOME et al., 2011).

As características analíticas do método proposto foram validadas a partir do monitoramento de todas as etapas do processo, através de um teste duplo-cego com amostras conhecidas, apresentando total compatibilidade entre as análises (Tabela 6). Além disso, não houve inibição na amplificação quando um patógeno particular estava em baixa concentração mesmo na presença de elevadas contagem bacteriana dos demais. Os resultados do experimento às cegas neutralizam o viés de aferição, segundo Oliveira Filho (2015), ressaltando a robustez da técnica e a repetibilidade intra-laboratorial do teste, uma vez que não houve variação entre os resultados das réplicas.

A não detecção de *Brucella abortus* em concentrações abaixo de 10^4 UFC.mL⁻¹ já era esperado, uma vez que a etapa de pré-enriquecimento não afetou a sensibilidade do teste devido ao crescimento lento deste patógeno em particular (Figura 14 D). Estima-se que a concentração microbiana necessária para detecção deste patógeno pelo

método proposto, seja de aproximadamente 4,0 bactérias. μL^{-1} na reação, uma vez que este número de bactérias foi o limite inferior de detecção observado quando utilizamos células bacterianas como molde (Figura 12). Os iniciadores Bab 311-F e Bab 311-R apresentaram alta sensibilidade, 1,0 fg e 10 fg respectivamente para PCR e mPCR e na determinação do limite de detecção em algumas repetições apresentaram detecções menores que 10^4 UFC.mL⁻¹. Isto explica detecções de 10^2 UFC.mL⁻¹, nas amostras “E” e “M” do experimento duplo-cego (Tabela 6). Neste contexto, possivelmente em rebanhos endêmicos para brucelose, devido à alta concentração microbiana no leite, a mPCR proposta seja capaz de detectar o agente no leite de tanques de expansão. Outro fato que reforça a hipótese foi observado ao se testar a mPCR proposta frente a leite experimentalmente contaminado apenas com *B. abortus*, mostrando um limite de detecção de 10^0 UFC.mL⁻¹ (dado não apresentado). A literatura apresenta limites de detecção variados para identificação *Brucella* spp. por PCR em amostras de leite, 10^1 UFC.mL⁻¹ (LEAL-KLEVEZAS et al., 1995; ROMERO; LOPEZ-GONI, 1999), 10^2 UFC.mL⁻¹ (SREEVATSAN et al., 2000), 10^5 UFC.mL⁻¹ (RIJPENS et al., 1996).

A partir dos resultados analíticos obtidos, é possível inferir que o método diagnóstico apresenta sensibilidade superior aos limites de detecção exigidos pela ANVISA e a carga bacteriana mínima necessária ao risco de infecção alimentar. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, os limites permissíveis de *S. aureus* e *E. coli* para maioria dos alimentos são de 10^3 UFC.mL⁻¹ e ausência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em 25 g ou mL (BRASIL, 2001). Em relação ao risco de toxinfecção alimentar o número mínimo de *S. aureus* capaz de produzir enterotoxinas termoestáveis em quantidade suficiente para causar intoxicação alimentar (1 μg) varia de 10^5 a 10^6 UFC.mL⁻¹ (TAMARAPU; MCKILLIP; DRAKE, 2001; TRONCO, 2010). Para *L. monocytogenes* a dose infectante para humanos varia de 10^2 a 10^3 UFC (MAĆKIW et al., 2016) reiterando a capacidade de detecção segura da metodologia. De acordo com a Federação Internacional de Laticínios (FIL), o leite cru é considerado “hígido” quando, no ato de sua coleta ou no momento de sua utilização artesanal, atenda às seguintes exigências: microbiota total ≤ 100.000 UFC.mL⁻¹; células somáticas ≤ 300.000 UFC.mL⁻¹; *S. aureus* ≤ 1.000 UFC.mL⁻¹; *E. coli* ≤ 1.000 UFC.mL⁻¹; *Salmonella* ausente em 1000 mL e *Streptococcus* β ausência em 0,1 mL (TRONCO, 2010).

A conveniência e praticidade na amostragem do leite, evitando os transtornos causados pela coleta de sangue ou tecidos, o estresse aos animais e conseqüentemente a redução das perdas desnecessárias aos produtores e empresas de laticínios é uma das vantagens do método proposto.

A redução do risco biológico aos laboratoristas é outro benefício do teste uma vez que a técnica molecular reduz o tempo de contato com o microrganismo viável, fato considerado importante quando falamos de patógenos com potencial zoonótico (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2012; ORZIL et al., 2016; YU; NIELSEN, 2010).

O custo de realização da técnica de mPCR foi definido considerando a capacidade instalada no Laboratório de Protozoologia CCB/UFSC, utilizando-se o método de custeio direto, com base no protocolo da técnica (BRUGNANO et al., 2014; SCHOEPS, 1992). Considerou-se no cálculo mão de obra, depreciação de equipamentos e instalações e impostos, baseados em custos reais para realização de uma análise por PCR de um laboratório veterinário, insumos (materiais) contabilizados com base no protocolo da técnica e perdas definidas a priori em 10%. O custo do mPCR para uma amostra foi valorado em R\$ 53,95 passando para R\$ 30,22 quando otimizado para 48 amostras conforme equipamentos e estrutura disponível. Salientamos que este custo pode ser reduzido consideravelmente se realizado em escala. O levantamento realizado demonstrou que o uso da nova tecnologia mais efetiva, tem custo aceitável, considerando ainda as vantagens de detecção simultânea de seis patógenos e obtenção dos resultados em menor tempo.

Associando a confiabilidade e robustez da mPCR, a um método de baixo custo para extração de DNA e a detecção de um perfil de patógenos de interesse em leite, a presente metodologia, protegida por pedido de patente, mostra-se uma ferramenta importante para a cadeia láctea nacional tanto para o agronegócio quanto para saúde pública, com sensibilidade superior, mais rápido e eficiente que os métodos diagnósticos disponíveis.

Existe uma constante busca por desenvolvimentos de testes rápidos e capazes de detectar a presença de agentes etiológicos com alto grau de confiança no cotidiano da produção animal, neste sentido buscamos realizar a validação diagnóstica do método proposto com amostras de leite de tanques resfriadores de 102 rebanhos leiteiros comerciais. A sensibilidade de um teste diagnóstico é uma das características mais importantes na fase inicial de programas de controle, garantindo que os animais doentes em um rebanho sejam detectados precocemente. Contudo, quando a prevalência da doença é baixa, a especificidade se

torna mais importante (ZAFALON et al., 2005), Neste sentido, a sensibilidade (DSe) e especificidade (DSp) diagnosticas são os principais indicadores de rendimento diagnósticos de um teste.

O método molecular desenvolvido apresentou limiares estimados de DSe, DSp e elevada acurácia, que justificam sua utilização como método de detecção dos patógenos alvos em amostras de leite de tanque de expansão, quando comparado a técnicas de referência (Tabela 7). A eficiência diagnóstica do teste desenvolvido foi semelhante à do padrão-ouro (p McNemar $> 0,05$). Na avaliação de concordância entre os testes, estimada pelo coeficiente kappa (Tabela 7), obteve-se uma concordância excelente (kappa 0,81 a 1,00) para *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* e forte concordância (kappa 0,61 a 0,80) para *L. monocytogenes*, reiterando a possibilidade de uso da técnica para diagnóstico dos referidos patógenos em leite de rebanho. Contudo, para *B. abortus* a concordância foi leve (kappa 0,21 a 0,40) e para *Salmonella* spp. insignificante (kappa 0,00 a 0,20), de acordo com a valoração do kappa segundo Oliveira Filho (2015). A baixa concordância observada, para *Brucella* e *Salmonella*, possivelmente se deve ao baixo número de isolados positivos obtido na amostragem. Quando a frequência de verdadeiros positivos é baixa ou zero, impossibilita uma precisão na estimativa de DSe, o que pode ser verificado ao observar os intervalos de confiança, de 0,6% – 80,6% e 0,0% – 100% respectivamente, para DSe de *B. abortus* e *Salmonella* spp., não significando uma ineficiência do teste. Porém, isto indica a necessidade de um experimento contendo uma população amostral com maior número de indivíduos verdadeiramente positivos para melhorar a precisão das estimativas de DSe especificamente para estes dois patógenos, uma vez que suas DSp foram elevadas.

O rendimento diagnóstico do método proposto neste estudo foi superior ao observado em estudos feitos por outros autores em condições semelhantes. Ao analisar a acurácia de um protocolo para detecção simultânea de três patógenos em amostras de leite de tanque usando mPCR, em 20 propriedades leiteiras localizadas no centro-oeste do estado de São Paulo, Trocantelli et al. (2015) obtiveram, respectivamente DSe, DSp e concordância (Kappa), para *S. aureus* de 0,0%, 100% e não calculada, para *S. agalactiae* de 0,0%, 88% e 0,11 e para *E. coli* de 75%, 91,7% e 0,68. Estudo realizado por Carneiro (2009), avaliou 100 amostras de leite de tanques de expansão de 50 propriedades no Oeste de Santa Catarina, pela técnica de PCR utilizando os iniciadores Sa442- 1 e Sa442- 2, para a detecção de *S. aureus*, obtendo DSe (53,8%) e DSp (36,5%) não justificando sua utilização como método de detecção do agente em

amostras de leite de tanque. Analisando microrganismos causadores de mastite por mPCR associado a detecção por eletroforese capilar, Cressier e Bissonnette (2011), mostraram DSe e DSp respectivamente, de 96,6% e 94,1% para *S. aureus*, 100% e 99,3% para *S. agalactiae* e para *E. coli* 100% e 94,5%, resultados semelhantes aos observados neste estudo. Os resultados de DSe e DSp obtidos através da mPCR, também foram equivalentes aos verificados por outros autores utilizando tecnologia analítica de multiplex PCR em tempo real (qPCR) para detecção de patógenos em leite (GILLESPIE; OLIVER, 2005; PARADIS et al., 2012)

Para o reconhecimento provisório de um teste é necessário, além das informações sobre características analíticas (Se e Sp) e diagnósticas (DSe e DSp), uma análise previa de reprodutibilidade (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014a). A obtenção de resultados idênticos em cinco repetições da técnica de mPCR para as mesmas amostras em dias alternados, evidencia a reprodutibilidade preliminar do método proposto. Este resultado associado as características analíticas e diagnósticas de elevada sensibilidade e especificidade apresentadas, reforça a indicação da técnica para uma próxima fase de validação e sua utilização futura no diagnóstico de rotina para patógenos em leite.

A ocorrência de pelo menos um dos patógenos alvos em 95,1% das unidades de produção estudadas (n= 102), sendo que 23,5% apresentavam três ou mais dos patógenos analisados, considerando os testes de referência, alerta para o elevado risco zoonótico, salientando a importância de uma ferramenta de diagnóstico eficiente para detecção de potenciais focos na cadeia produtiva do leite.

Os agentes de maior prevalência nos tanques resfriadores analisados, *S. aureus* (86,3%) e *S. agalactiae* (39,2%) (Tabela 7), são patógenos altamente contagiosos frequentemente isolados e identificados como causadores de mastite em diferentes bacias leiteiras do país (BRITO, M. A. V. P. et al., 1999; COSTA et al., 1995; LANGONI et al., 2011; LARANJA; MACHADO, 1994; PORTES et al., 2014b; SANTOS, L. L.; PEDROSO; GUIRRO, 2010; SOUZA et al., 2009). Na Zona da Mata de Minas Gerais, Brito et al. (1999), isolaram *S. aureus* e *S. agalactiae* em 98% e 60,4%, dos rebanhos, respectivamente, mostrando elevada prevalência destes patógenos, assim como observado no presente estudo.

Na epidemiologia da mastite bovina os agentes etiológicos podem ser classificados como patógenos principais e secundários. Patógenos principais são responsáveis por causar maiores reações inflamatórias no úbere, provocando elevadas contagem de células somáticas (CCS),

enquanto os secundários promovem reações mais brandas (HARMON, 1994; PHILPOT; NICKERSON, 2002). Wilson, Gonzalez e Das (1997) verificaram que a CCS média para animais com isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* foi de 440.000 e de 640.000 células.mL⁻¹, respectivamente. Trabalho conduzido com rebanhos localizados região Sudeste do Brasil (n= 3.749) mostrou a variação da CCS em vacas leiteiras de acordo com o patógeno da mastite, a média de CCS foi 966.000 células.mL⁻¹ para animais positivos para *S. aureus* e 1.520.000 células.mL⁻¹ para *S. agalactiae* (SOUZA et al., 2009). Por outro lado, foi demonstrado que a presença de *C. bovis* e *Staphylococcus* coagulase negativo não provocaram alterações significativas de CCS em relação aos quartos mamários bacteriologicamente negativos (SOUZA et al., 2009; WILSON; GONZALEZ; DAS, 1997). Neste contexto, o monitoramento em nível de rebanho é necessário para orientar estratégias de controle e prevenção das mastites por *S. aureus* e *S. agalactiae*, o que parece ser fundamental para que os rebanhos brasileiros possam atender ao requisito de qualidade do leite estabelecidos pela legislação (IN62 e IN07), CCS de 400.000 células.mL⁻¹ (BRASIL, 2011; 2016).

A prevalência de 11,8% para *Listeria monocytogenes* em tanques resfriadores (n = 102, Tabela 7) chama atenção, pois este patógeno é reconhecido como um sério problema de saúde pública, devido a sua alta taxa de hospitalização (94%) e mortalidade (12,8 - 17%) (CDC, 2011; ECDC, 2013). Além disso, há indícios de que esse patógeno possa suportar o tratamento térmico e é capaz de se multiplicar em alimentos resfriados, em temperaturas entre -1,5°C a 45°C (FARBER et al., 1988; SETIANI et al., 2015; SZLACHTA et al., 2010). Melo et al. (2013) relatam a presença de *L. monocytogenes* em queijo produzido a partir de leite cru em Santa Catarina, juntamente com *S. aureus* e *E. coli*. Em uma triagem molecular realizada em tanques de resfriamento (n= 56) no estado do Rio Grande do Sul a presença de *L. monocytogenes* não foi confirmada (POZZOBON et al., 2015). Em países desenvolvidos este patógeno é exaustivamente estudado em animais, humanos e alimentos, porém, no Brasil os dados são escassos e indicam uma baixa ocorrência (SILVA, A. S. D. et al., 2011). Os 12 isolados microbiológicos de *L. monocytogenes* de amostras de leite de tanque resfriador foram confirmados, por PCR convencional usando os iniciadores Lmo133-F e Lmo133-R, dados não apresentados.

A ausência de isolamento para *Salmonella* spp. no presente estudo, corrobora resultados de outros trabalhos que avaliaram leite de tanque resfriador (AMAGLIANI et al., 2012; RUUSUNEN et al., 2013).

Contudo, a detecção deste grupo de patógenos via PCR sugere sua presença em baixa frequência nos rebanhos leiteiros do Oeste Catarinense (Tabela 7). Relatos de baixas prevalências deste patógeno em leite de tanque foram reportados no Norte da Itália (1,01%) (GIACOMETTI et al., 2012) e no terço ocidental do estado de Tennessee nos Estados Unidos (2,24%) (MURINDA et al., 2002).

As doenças infecciosas de caráter zoonótico são uma preocupação emergente em fazendas leiteiras pelo seu impacto potencial sobre saúde humana e animal e produtividade dos rebanhos. Informações sobre presença de patógenos e sua a prevalência no sistema produtivo são relevantes para escolha de estratégias de ação acertadas em controle e prevenção, uma vez que programas de redução de patógenos em animais refletem significativamente na diminuição do risco de doença em humanos (PRADHAN et al., 2009; RUEGG; REINEMANN, 2002; SMITH et al., 2013).

Devido à escassez de informações epidemiológicas sobre patógenos infecciosos com potencial zoonótico que acometem bovinos leiteiros no Oeste de Santa Catarina, segunda maior bacia leiteira do país, foi realizado um levantamento epidemiológico prospectivo transversal em 98 rebanhos (Figura 3) com amostragem individual por animal, totalizando 1077 vacas lactantes amostras. Amostras de leite de glândula mamária foram avaliadas quanto ao perfil microbiológico e de soro para análise da presença de anticorpos anti-brucelas lisas.

O perfil etiológico de microrganismos encontrados em glândula mamária de rebanhos leiteiros no Oeste Catarinense, (Figura 16 C) concordou com o observado em estudo anterior que analisou 15 propriedade durante 2 anos (2010 – 2011) na mesma região, mantendo a ordem de importância dos principais patógenos (PORTES et al., 2014b). Considerados patógenos secundários da mastite *Staphylococcus* coagulase negativos e *Corynebacterium* spp. sempre foram questionados quanto ao seu real potencial infeccioso na glândula mamária (BRADLEY, 2002; PHILPOT; NICKERSON, 2002), porém atualmente estes agentes são vistos como patógenos contagiosos emergentes sendo que os resultados do presente estudo corroboram esta informação, pois estes foram os patógenos de maior prevalência (Figura 16 D). Em estudo realizado por Dambrós et al. (2013), foram analisadas 4949 amostras, pool de glândula mamária de 5 estados das regiões sul e sudoeste do Brasil e a prevalência observada para *Corynebacterium* spp. foi de 13,45% e entre os estados a prevalência de variou de 9,6% a 21,1%, concordando com os dados obtidos no presente estudo.

Os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) dentre os isolados foram o que apresentaram a maior prevalência (20,8%, Figura 16 D). Apesar de não ser um patógeno que cause grandes danos à produção leiteira, o dado é considerado relevante, visto que recentemente foi reportado a presença do gene *mecA* de múltipla resistência a antimicrobianos, em cepas de SCN isolados de amostras de leite bovino no Brasil, incluindo amostras catarinenses (SANTOS, F. F. D. et al., 2016). Na última década, a emergência de resistência a meticilina (*mecA*) em amostras isoladas de leite bovino foi reportada em diferentes países e continentes (HOLMES; ZADOKS, 2011). Análises genéticas de estafilococos têm indicado que há transferência de microrganismos entre animais e humanos, consequentemente têm ocorrido a transferência horizontal de genes de resistência (BECKER et al., 2014). Foi demonstrado que a emergência de *S. aureus* carreando gene *mecA* em bovinos de leite pode ser relacionados ao contato com espécies afins, como SCN (HOLMES; ZADOKS, 2011), portanto no sistema produtivo de leite bovino o SCN pode ser um reservatório do gene *mecA* para *S. aureus*. Além disso, devido à possibilidade de aquisição de resistência a múltiplos antibióticos, *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina pode ser um problema para o futuro, tanto no tratamento de infecções em humanos e quanto no tratamento da mastite bovina. Neste contexto, a situação atual do Oeste Catarinense requer atenção, pois as bactérias do gênero *Staphylococcus* representam aproximadamente 50% dos isolados de glândula mamária bovina na região.

No presente estudo, *S. aureus* foi o patógeno contagioso de maior prevalência, isolado em 17,9% dos animais amostrados (Figura 16 D). Estes resultados estão em concordância com o observado no Paraná onde prevalência encontrada foi de 18,7% (SANTOS, L. L.; PEDROSO; GUIRRO, 2010). Outro importante agente contagioso, o *S. agalactiae* apresentou baixa prevalência, com 4,1% de vacas infectadas (Figura 16 D), entretanto, ao observarmos o isolamento microbiológico de tanque resfriador (n = 102) a prevalência obtida foi de 39,2% (Tabela 7), indicando que possivelmente há um baixo número de animais positivos por rebanho, o que facilitaria a implantação de um programa de erradicação deste patógeno. Em programas de controle de mastite e qualidade do leite é fundamental que vacas que apresentem glândula mamária infectada por *S. aureus* ou *S. agalactiae* sejam identificadas, mesmo que não haja inflamação evidente, para que medidas de controle sejam estabelecidas, uma vez que, dadas as características da disseminação e infecção, esses dois agentes constituem importante fonte

de infecção para os rebanhos (BRADLEY, 2002; HARMON, 1994; PHILPOT; NICKERSON, 2002). Ressaltando a importância e a necessidade de um teste para monitoramento de rebanho, eficiente e viável para o cotidiano da cadeia produtiva do leite.

Ao compararmos os resultados da análise de amostras de tanque de expansão (informações de rebanho, Tabela 7) com os resultados do isolamento microbiológico de animal individual (Figura 16), observamos uma alta ocorrência de *E. coli* e detecção de *L. monocytogenes* nas amostras de rebanho. Estes resultados indicam uma grave falha no manejo de ordenha e higienização de equipamento, evidenciando a importância de uma metodologia capaz de detectar patógenos zoonóticos em tanque resfriador e confirmam a baixa eficácia do isolamento microbiológico individual por animal para assegurar a inocuidade do leite.

Em resumo, pode-se constatar que as etiologias de glândula mamária bovina no Oeste de Santa Catarina são predominantemente patógenos contagiosos. Assim como já constatado no Brasil (LANGONI et al., 2011) e em outros países com indústria láctea emergente, como o Uruguai (GIANNECHINI, R. et al., 2014) e a China (BI et al., 2016).

Listada como doenças de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal, a brucelose é uma enfermidade infectocontagiosa, de caráter zoonótico e de ampla distribuição mundial causada por bactérias do gênero *Brucella*. (PAULA et al., 2015; QUINN et al., 2005). A infecção humana é adquirida principalmente através do contato com animais infectados ou através do consumo de leite e seus derivados contaminados (NICOLETTI, 1989). A contaminação direta por contato cutâneo-mucoso é a forma de infecção mais frequente (75% dos casos) enquanto que a contaminação digestiva (25% dos casos) é devida essencialmente no consumo de leite cru e derivados contaminados e raramente pelo consumo de carne contaminada (FRENEY et al., 2000). Embora subdiagnosticada e subestimada em nosso meio, é uma das mais importantes zoonoses bacterianas, com mais de meio milhão de novos casos em humanos reconhecidos anualmente, principalmente em países em desenvolvimento (CHRISTOPHER; UMAPATHY; RAVIKUMAR, 2010; DIVE, 2012).

Segundo os dados mais recentes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), um levantamento epidemiológico realizado entre os anos de 2001 e 2004 demonstrou que a prevalência de brucelose em 82% do efetivo bovino no Brasil variou entre 0,06 e 10,2% (BRASIL, 2006). Em Santa Catarina a taxa de prevalência de brucelose em bovinos foi a menor do país, 0,06% (0,0–0,17%) e a prevalência de focos foi de 0,32% (0,10 – 0,69%) (BRASIL, 2006; SIKUSAWA et al.,

2009). No entanto, focos de brucelose humana continuam sendo detectados em várias cidades do Estado, sendo sua prevenção e controle dependente da erradicação ou controle da doença no animal hospedeiro, uma vez que não existe uma vacina para uso humano (DIVE, 2012).

No presente estudo, a prevalência para o Oeste Catarinense de vacas lactantes com anticorpos anti-brucelas lisas foi de 0,46% (0,27 – 0,62%), 7,67 vezes maior que os dados oficiais de prevalência da enfermidade para o rebanho bovino do estado, com ocorrência de 4,1% (2,48 – 5,94%) em propriedades (Figura 17). No mesmo intervalo de tempo, 2015, segundo a Diretoria de Vigilância Epidemiológica de Santa Catarina (DIVE-SC) a brucelose humana foi identificada em 130 pessoas no estado, sendo a maioria dos casos (aproximadamente 90%) na região Oeste do Estado de Santa Catarina.

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) considera que a doença está controlada quando atingir uma incidência inferior a 0,2% do rebanho (OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES, 2014b). O reconhecimento de área livre é um status sanitário objetivado pela Secretaria de Estado da Agricultura e da Pesca de Santa Catarina, a fim de habilitar o Estado para busca de mercados lácteos no exterior, além de constituir em garantia sanitária aos consumidores de leite e derivados Catarinenses. Considerando a baixa prevalência há uma dificuldade de identificar os focos ainda existentes, neste contexto, um teste de diagnóstico baseado na PCR em leite cru pode ser usado tanto como um método de avaliação da segurança dos alimentos como uma alternativa atraente para a avaliação da infecção por *Brucella* spp. em vacas lactantes, especialmente se usado como uma ferramenta de rastreio e vigilância de rotina em tanques de resfriamento para fins de redução dos focos de brucelose.

Em síntese, como base nos resultados obtidos na presente pesquisa, ressalta-se o êxito na padronização e validação, de acordo com orientações internacionais, de uma metodologia analítica baseada na mPCR para detecção simultânea de *S. aureus*, *S. agalactiae*, *L. monocytogenes*, *B. abortus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. em amostras de leite bovino. Metodologia está protegida por pedido de patente, destacando-se pela sensibilidade e especificidade superior aos métodos diagnósticos disponíveis atualmente na cadeia láctea nacional, agilidade no diagnóstico, conveniência e praticidade na amostragem, além de ser economicamente acessíveis, mostrando-se uma ferramenta importante tanto para o agronegócio quanto para saúde pública e representando um

avanço importante para biossegurança da cadeia láctea, programas de monitoramento de mastites e controle da qualidade do leite.

Este estudo também proporcionou a elaboração de uma visão epidemiológica sobre patógenos infecciosos circulantes na cadeia láctea do Oeste de Santa Catarina, trazendo subsídios a programas de vigilância epidemiologia e de saúde pública no que tange a zoonoses transmitidas via leite e derivados, conhecimentos estratégicos em nível de rebanho para controle de mastite e sanidade bovina com possíveis reflexos a produtividade e a qualidade da matéria prima produzida e informações para indústria de laticínios que podem auxiliar na implementação de medidas focadas na qualidade do leite e segurança dos alimentos.

7 CONCLUSÕES

A técnica molecular inovadora desenvolvida e padronizada para diagnóstico em amostras de leite bovino, detecta com êxito simultaneamente seis patógenos infecciosos com potencial zoonóticos.

O limite de detecção analítica da mPCR em leite apresenta-se superior aos métodos diagnósticos disponíveis na rotina da cadeia láctea, com obtenção dos resultados em menor tempo.

A tecnologia molecular validada baseada na mPCR mostra-se uma ferramenta eficiente e de baixo custo para o diagnóstico de patógenos infecciosos com potencial zoonóticos em amostras de leite bovino obtidas de tanque resfriador.

Os principais avanços epidemiológicos para cadeia láctea alcançados com a realização deste estudo são:

– A elevada ocorrência de *S. aureus* e *S. agalactiae* em tanques resfriadores, sugere que estes patógenos podem ser o principal obstáculo para obtenção dos limites legais de CCS em muitas propriedades Catarinenses.

– A identificação de *Listeria monocytogenes* em unidades de produção, alerta sobre o risco para saúde pública de uma enfermidade negligenciada.

– Patógenos contagiosos são o principal desafio para sanidade de glândula mamária bovina no Oeste Catarinense.

– *Staphylococcus aureus* evidencia-se como principal agente infeccioso com potencial zoonótico em circulação no Oeste de Santa Catarina.

– Brucelas lisas são um desafio para a bovinocultura leiteira do Oeste de Santa Catarina.

Em conjunto, os resultados revelam novos elementos para o entendimento da epidemiologia dos microrganismos patogênicos da glândula mamária bovina e contribuem de forma efetiva para a implementação de estratégias racionais de vigilância e controle de patógenos zoonóticos como possibilidade de veiculação pelo leite.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, oct. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231712>>. Acesso em: 10 jan. 2011.

AMAGLIANI, G. et al. Microbiological surveillance of a bovine raw milk farm through multiplex real-time PCR. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 5, p. 406-411, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22471929>>.

ANTOGNOLI, M. C. et al. Risk factors associated with the presence of viable *Listeria monocytogenes* in bulk tank milk from US dairies. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, n. 2, p. 77-83, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18705657>>. Acesso em: 15 ago. 2014.

ARCURI, E. F. et al. Toxigenic status of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk and Minas frescal cheese in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 12, p. 2225-2231, Dec. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219740>>.

ASLAM, M.; HOGAN, J.; SMITH, K. L. Development of a PCR-based assay to detect Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in milk. **Food Microbiology**, v. 95, p. 958-966, 2003.

BARBOSA, P. F. et al. **Produção de Leite no Sudeste do Brasil**. 2002. (Sistema de produção de leite 4, Embrapa Gado de Leite). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/leiteSudeste/introducao.html>>. Acesso em: 20 abr. 2012.

BATISTA, R. P.; FERREIRA, C. R. Streptococcus agalactiae septicemia in a patient with diabetes and hepatic cirrhosis. **Autops Case Rep**, v. 5, n. 4, p. 35-43, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26894044>>.

BECKER, K. et al. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the "mec alphabet" with specific consideration of *mecC*, a *mec* homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 7, p. 794-804, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25034857>>.

BELOTI, V. Micro-organismos de importância no leite. In: BELOTI, V. (Ed.). **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015a. p. 109-222.

_____. Tratamentos que conferem segurança e maior vida útil ao leite. In: BELOTI, V. (Ed.). **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015b. p. 223-238.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. Database, p. 30-35, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25414350>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

BI, Y. et al. Prevalence of Bovine Mastitis Pathogens in Bulk Tank Milk in China. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155621, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27187065>>.

BOHNSACK, J. F. et al. Population structure of invasive and colonizing strains of *Streptococcus agalactiae* from neonates of six U.S. Academic Centers from 1995 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1285-1291, apr. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287314>>. Acesso em: 29 set. 2014.

BOOR, K. J. Fluid dairy product quality and safety: looking to the future. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 1, p. 1-11, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11210019>>. Acesso em: 20 mai. 2004.

BOTELHO, A. P. et al. Recuperação de *Brucella abortus* do leite in natura procedente de vacas soropositivas dos municípios de Pedra e Venturosa PE: aspectos de saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 73, p. 72-77, jun. 2000.

BOTTERO, M. T. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of pathogenic genes of *Escherichia coli* in milk and milk products. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, n. 4, p. 283-288, 2004. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271390>>.

BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. **The Veterinary Journal**, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12359466>.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. . Brasília-DF: Diário Oficial da União, 2001.

_____. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. . Brasília, DF: Diário Oficial da União, 2003. p.

_____. **MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 06 de 08 de janeiro de 2004. Aprovar o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal**. Brasília, DF: Diário Oficial da União, n. 7, Seção 1, 2004. 6-10 p.

_____. **MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), FIGUEIREDO, V. C. F.; LÔBOJ. R.; GONÇALVES, V. S. P. (Org.)**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2006. 188 p.

_____. **MINISTERIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 62, de 30 de dezembro de 2011. Altera a Instrução Normativa 51, de 18 de setembro de 2002 que trata do regulamento técnico de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite**. **Diário Oficial da União, Brasília**, v. Seção 1, n. 251, p. 6-11, 30 dez. 2011.

_____. MINISTERIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 30, de 07 de agosto de 2013. Trata sobre período de maturação de queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru. **Diário Oficial da União, Brasília**, v. Seção 1, n. 152, p. 19, 07 out. 2013.

_____. MINISTERIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 07, de 03 de maio de 2016. Prorroga a Instrução Normativa 62, de 29 de dezembro de 2011 que trata do regulamento técnico de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite. **Diário Oficial da União, Brasília**, v. Seção 1, n. 84, p. 11, 03 maio. 2016.

BRITO, J. R. F. **Coleta de amostras de leite para determinação da composição química e contagem de célula somática**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. 16 p.

BRITO, M. A. V. P. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

BRITTEN, A. M. The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. **The Veterinary clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 187-202, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664202>>.

BRUGNANO, F. M. L. et al. Levantamento de custo da reação em cadeia pela polimerase (PCR) em amostras de carne. **Revista Analytica**, n. 72, p. 62-72, 2014.

BRYAN, F. L. **Diseases transmitted by foods: a classification and summary**. 2th ed. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention in EUA-HHS Publ (CDC), 1982.

CÂMARA, S. A. V. **Surtos de toxinfecções alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul, no período de 1998-2001**. 2002. 79 f. Monografia (Especialização em Gestão em Saúde). Escola de Saúde Pública Dr. Jorge David Nasser, Campo Grande, 2002.

CAMEOTRA, S. S. Preservation of microorganisms as deposits for patent application. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, n. 4, p. 849-850, feb. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17189611>>. Acesso em: 15 fev. 2013.

CARNEIRO, D. M. V. F. **Detecção microbiológica e molecular de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite bovino obtido em tanque de expansão - correlação com resíduo de antibiótico.** 2009. 77 f. Tese (Doutor em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista 2009.

CARVALHO, I. A. et al. Short communication: Recovery of viable *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from retail pasteurized whole milk in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 6946-6948, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23021748>>.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Vital signs: Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food: Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. sites. Morbidity and Mortality Weekly.** n. 22, 2011. 749-755 p. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6418a4.htm>>. Acesso em: 10 mai. 2012.

CEPEA. **Desenvolvimento metodológico e cálculo do PIB das cadeias produtivas do algodão, cana-de-açúcar, soja, pecuária de corte e leite no Brasil.** Piracicaba: Cepea/ESALQ-USP, 2011. 57 p.

CHATE, S. C. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado do Mato Grosso do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 46-55, 2009.

CHIANG, Y. C. et al. Use of primers based on the heat shock protein genes hsp70, hsp40, and hsp10, for the detection of bovine mastitis

pathogens *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus bovis*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 4, p. 262-266, aug. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18602244>>. Acesso em: 30 jun. 2014.

CHIANG, Y. C. et al. Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* in milk and meat samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 88, n. 1, p. 110-6, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22101309>>. Acesso em: 15 fev. 2014.

CHRISTOPHER, S.; UMAPATHY, B. L.; RAVIKUMAR, K. L. Brucellosis: review on the recent trends in pathogenicity and laboratory diagnosis. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 2, n. 2, p. 55-60, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21346896>>.

COSTA, E. O. et al. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 156-158, 1995.

CREMONESI, P. et al. Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 1, p. 163-169, jan. 2006. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233972100017>. Acesso em: 20 abr. 2013.

CREMONESI, P. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, n. 5, p. 299-305, oct. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006095>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

CRESSIER, B.; BISSONNETTE, N. Assessment of an extraction protocol to detect the major mastitis-causing pathogens in bovine milk.

Journal of Dairy Science, v. 94, n. 5, p. 2171-84, may. 2011.
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21524507>>.

D'COSTA, V. M. et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 457-61, sep. 2011. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21881561>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

D'OVÍDIO, L. Listeriose. **Manual de Zoonoses**. [S.I.]: PROGRAMA DE ZOONOSES - REGIÃO SUL, v. 2, 2011. p. 102-123.

DA SILVA, J. G. et al. Occurrence of anti-Toxoplasma gondii antibodies and parasite DNA in raw milk of sheep and goats of local breeds reared in Northeastern Brazil. **Acta Trop**, v. 142, p. 145-8, Feb. 2015. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25438258>>.

DAMBRÓS, D. et al. Prevalência de Corynebacterium sp. no leite de vacas, sua relação com o manejo de ordenha e California Mastitis Test. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 1101, 2013. Disponível em:
<<http://www.ufrgs.br/actavet/41/PUB%201101.pdf>>.

DAVIS, B. J. K.; LI, C. X.; NACHMAN, K. E. SCIENCES, J. H. U.-C. F. A. L. F.-D. O. E. H. **A Literature Review of the Risks and Benefits of Consuming Raw and Pasteurized Cow's Milk - A response to the request from The Maryland House of Delegates' Health and Government Operations Committee**. Johns Hopkins University - Center for a Livable Future, 2014. 1-36 p. Disponível em:
<http://www.jhsph.edu/research/centers-and-institutes/johns-hopkins-center-for-a-livable-future/_pdf/research/clf_reports/RawMilkMDJohnsHopkinsReport2014_1208_.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2015.

DE BUYSER, M. L. et al. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 1-17, jul 20. 2001. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11482557>>. Acesso em: 15 ago. 2014.

DINIZ, R. S. **Validação de métodos laboratoriais aplicados ao diagnóstico de doenças dos animais**. 2013. 83 f. Tese (Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013).

DIVE. DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SANTA CATARINA. **Situação epidemiológica da brucelose humana em Santa Catarina - 2010/2011**. Florianópolis: 2012. 2 p. Disponível em: <http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/situacao_da_brucelose_humana_em_santa_catarina.pdf>. Acesso em: 10 mai. 2012.

DÜRR, J. W.; ANTONI, V. L.; TOMAZI, T. Pagamento do leite por qualidade no Brasil. In: CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. (Ed.). **Estratégia e Competitividade na Cadeia de Produção de Leite**. Passo Fundo: Berthier, 2005. p. 54-75.

ECDC. EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data**. Stockholm: ECDC, 2013. Disponível em: <<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/AnnualEpidemiologicalReport-2013>>. Acesso em: 10 mai. 2012.

EPAGRI. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2010/2011**. Florianópolis: Epagri/Cepa 2012. 184 p.

_____. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2013/2014**. Florianópolis: Epagri/Cepa 2014. 208 p.

_____. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2014/2015**. Florianópolis: Epagri/Cepa 2016. 153 p.

ERSKINE, R. et al. Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antibacterial drugs. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL ANNUAL MEETING, 43, 2004, Charlotte. **Proceedings...** Charlotte: NMC, 2004. p. 400-414.

FAGUNDES, H. et al. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in Sao Paulo state, Brazil. **Brazilian**

Journal of Microbiology, v. 41, n. 2, p. 376-380, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24031507>>.

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

FAPEMIG. Intoxicação alimentar. **Revista Minas Faz Ciência**, n. 11, 2002. Disponível em: <<http://revista.fapemig.br/materia.php?id=184>>. Acesso em: 14 fev. 2012.

FARBER, J. M. et al. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 277-286, 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3152805>>.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos, 2000. 175 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **World Livestock 2013: Changing disease landscapes**. Rome: FAO/ ONU, 2013. 111 p.

FORSMAN, P.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. **Microbiology**, v. 143, p. 3491-500, nov. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9387227>>. Acesso em: 13 set. 2013.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FRACKMAN, S. et al. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. **Promega Notes**, v. 65, p. 27, 1998. Disponível em: <<http://www.promega.com.br/~media/files/resources/promega%20notes/65/betaine%20and%20dmso-%20enhancing%20agents%20for%20pcr.pdf?la=pt-br>>. Acesso em: 25 jul. 2014.

FRENEY, J. et al. **Precis de Bacteriologie Clinique**. Paris: ESKA, 2000. 1413-1423 p.

GANDRA, E. A. et al. Detection by multiplex PCR of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* in artificially contaminated milk. **Ciência Rural**, v. 46, n. 8, p. 1418-1423, 2016.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 5, p. 851-875, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16219509>>.

GELFAND, D. H. Taq DNA polymerase. In: ERLICH, H. A. (Ed.). **PCR technology**. New York: Stockton Press, 1989. p. 17-22.

GERMANO, P. M. L. et al. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Revista Higiene Alimentar**, v. 7, n. 27, p. 6-11, 1993.

GIACOMETTI, F. et al. Sale of raw milk in northern Italy: food safety implications and comparison of different analytical methodologies for detection of foodborne pathogens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 4, p. 293-297, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22360646>>.

GIANNEECHINI, R. et al. Mastitis bovina, reconocimiento de los patógenos y su resistencia antimicrobiana en la Cuenca Lechera del Sur de Uruguay. **Veterinaria Montevideo** v. 50, n. 203, p. 4-32, 2014.

GIANNEECHINI, R. E.; CONCHA, C.; FRANKLIN, A. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 43, n. 1, p. 31-41, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12071114>>. Acesso em: 16 jun. 2014.

GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 10, p. 3510-3518, oct. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16162525>>.

GLUCKMAN, P. NEW ZEALAND - OFFICE OF THE PRIME MINISTER'S CHIEF SCIENCE ADVISOR. **Review of Evidence for Health Benefits of Raw Milk Consumption**. New Zealand - PMCSA, 2015. 1-15 p. Disponível em: <<http://mpi.govt.nz/document-vault/7866>>. Acesso em: 13 jul. 2015.

GOOTZ, T. D. The global problem of antibiotic resistance. **Critical Reviews in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 79-93, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370622>>. Acesso em: 15 ago. 2014.

GRAAT, E. A. M.; FRANKENA, K.; BOS, H. Principles and methods of sampling in animal diseases surveys. In: NOORDHUIZEN, J. P. T. M. et al. (Ed.). **Application of quantitative methods in veterinary epidemiology**. Wageningen: Wageningen Pers, 1997. p. 31-62.

GRANT, I. R.; BALL, H. J.; ROWE, M. T. Effect of high-temperature, short-time (HTST) pasteurization on milk containing low numbers of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Lett Appl Microbiol**, v. 26, n. 2, p. 166-70, Feb. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9569703>>.

GRUNDMANN, H. et al. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. **Lancet**, v. 368, n. 9538, p. 874-885, sep. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950365>>. Acesso em: 30 jun. 2014.

GUIMARÃES, F. F.; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 38-51, jun. 2010. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/rvz/article/view/16921/17797>>. Acesso em: 24 maio. 2015.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929968>>.

HASSAN, A. A. et al. Molecular characterization of phenotypically CAMP-negative *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, n. 5, p. 257-259, jun. 2002.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12121048>>. Acesso em: 20 jan. 2014.

HENEGARIU, O. et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, v. 23, n. 3, p. 504-511, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9298224>>.

HOFFMANN, S. A. et al. Shiga-toxin genes and genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from pasteurized cow milk in Brazil. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 6, p. 1175-1180, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24917424>>.

HOGAN, J. S. et al. **Current concepts of bovine mastitis**. 5 ed. Verona, WI: National Mastitis Council, 2012.

HOLMES, M. A.; ZADOKS, R. N. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 373-382, dec. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21984431>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

IDF. **IDF standard 143A: 1995 - Milk and milk products - Detection of *Listeria monocytogenes***. Brussels, Belgium, 1995. 8 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Pecuária Municipal 2003-2010**. 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=74&z=t&o=24>>. Acesso em: 20, abr. 2012.

_____. **Pesquisa Pecuária Municipal 2003-2013**. 2015. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=94&n=0&u=0&z=t&o=24&i=P>>. Acesso em: 20, abr. 2015.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **The Economic Importance of Dairying**. 2013. Disponível em: <http://www.idf-germany.com/fileadmin/user_upload/idf-germany/download/14-IDF-Factsheet-The-economic-importance-of-dairying.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2015.

JACOBSON, R. H. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. **Revue scientifique et technique**, v. 17, n. 2, p. 469-526, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9713892>>.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1994. 804 p.

JENSEN, M. A.; FUKUSHIMA, M.; DAVIS, R. W. DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis. **Plos One**, v. 5, n. 6, p. e11024, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20552011>>. Acesso em: 20 abr. 2013.

JORDAO JUNIOR, C. M. et al. Detection of nontuberculous mycobacteria from water buffalo raw milk in Brazil. **Food Microbiol**, v. 26, n. 6, p. 658-61, Sep. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19527843>>.

KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A. H. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. **Genomics**, v. 98, n. 2, p. 137-144, aug. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21569836>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

_____. FastPCR software for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. In: VALLA, S.; LALE, R. (Ed.). **DNA Cloning and Assembly Methods**. Methods in Molecular Biology, v. 1116, 2014. p. 271-302. ISBN 978-1-62703-763-1

KALMUS, P. et al. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, p. 4, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21299911>>.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 203-216, Jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664203>>.

KIM, H. W. et al. A multiplex PCR assay for the detection of food-borne pathogens in meat products. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 30, p. 590-596, 2010.

KIM, J. H. et al. Simultaneous Detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* in Low-fatted Milk by Multiplex PCR. **Korean J Food Sci Anim Resour**, v. 34, n. 5, p. 717-23, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26761507>>.

KOSSAIBATI, M. A.; ESSLEMONT, R. J. The costs of production diseases in dairy herds in England. **Veterinary Journal**, v. 154, n. 1, p. 41-51, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9265852>>.

KUMAR, T. D.; MURALI, H. S.; BATRA, H. V. Simultaneous detection of pathogenic *B. cereus*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* by multiplex PCR. **Indian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 283-289, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23100783>>.

LANGONI, H. Agentes emergentes na etiologia na mastite bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 11, n. 50, p. 36-38, 1997.

LANGONI, H. et al. Isolation of *Brucella* spp from milk of brucellosis positive cows. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 6, p. 444-448, 2000.

LANGONI, H. et al. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011.

LANGONI, H. et al. Tratamento da mastite bovina com a associação ampicilina + cloxacilina. **Revista Napgama**, n. 3, p. 21-23, 1999.

LARANJA, L. F.; MACHADO, P. F. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B no estado de São Paulo. **Science Agriculture** v. 51, n. 3, p. 578-585, 1994.

LAW, J. W. et al. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. **Frontiers in microbiology**, v. 5, n. 770, p. 1-19, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25628612>>. Acesso em: 20 maio 2015.

LEAL-KLEVEZAS, D. S. et al. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. **Journal of Clinical Microbiology** v. 33, n. 12, p. 3087-3090, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8586678>>.

LEE, K. H. et al. Development of a novel biochip for rapid multiplex detection of seven mastitis-causing pathogens in bovine milk samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 4, p. 463-471, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599851>>. Acesso em: 30 mar. 2014.

LEE, N. et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 7, p. 574-580, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24796416>>.

LENNETTE, E. H. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 4th ed. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1985. 1149 p.

LOFFERT, D. et al. Optimization of multiplex PCR. **Qiagen News**, n. 2, p. 5-8, 1999.

LYNCH, M. J. et al. Surveillance of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Irish Bovine Dairy Herds. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, n. 4, p. 264-271, jun. 2012. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000303323200006>. Acesso em: 20 dez 2014.

LYRA DE FREITAS, M. F. et al. Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos de coalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 375-379, 2009.

MAĆKIW, E. et al. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat products in Poland in 2007–2011. **Food Control**, v. 59, p. 7-11, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515300050>>.

MANNING, S. D. et al. Association of Group B Streptococcus Colonization and Bovine Exposure: A Prospective Cross-Sectional Cohort Study. **Plos One**, v. 5, n. 1, jan. 2010. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000273779000022>. Acesso em: 18 abr. 2015.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, n. 1, p. 47-51, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11835531>>.

MARTINEZ, G.; HAREL, J.; GOTTSCHALK, M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 1, p. 68-72, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11227199>>. Acesso em: 30 jun. 2014.

MARTINS VIEIRA, M. B. C. et al. Evolução dos surtos de toxinfecção alimentares no Estado de Minas Gerais, no período de agosto de 1991 a agosto de 1998. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5., 1998, Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia**: [s.n.], 1998. p. 71.

MEIRI-BENDEK, I. et al. A PCR-based method for the detection of *Streptococcus agalactiae* in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 7, p. 1717-23, jul. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12201522>>. Acesso em: 24 jul. 2014.

MELO, F. D. et al. Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, p. 1152, 2013.

MONARDES, H. Reflexões sobre a qualidade do leite. In: DÜRR, J. V.; CARVALHO, M. P.; SANTOS, M. V. (Ed.). **O Compromisso com a Qualidade do Leite no Brasil**. Passo Fundo: UPF, 2004. p. 11-37.

MORAES, P. M. et al. Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. **Foodborne Pathog Dis**, v. 6, n. 2, p. 245-9, Mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19099356>>.

MORONI, P. et al. Short communication: antimicrobial drug susceptibility of Staphylococcus aureus from subclinical bovine mastitis in Italy. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 8, p. 2973-2976, aug. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16840612>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

MOURA, S. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. Incidence of Listeria species in raw and pasteurized milk produced in Sao Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 229-237, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8217519>>.

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2., 2002, Toledo. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO, 2002. p. 206-217.

MURINDA, S. E. et al. Molecular characterization of Salmonella spp. isolated from bulk tank milk and cull dairy cow fecal samples. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 7, p. 1100-1105, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117241>>.

NAMIDURU, M. et al. Epidemiological, clinical and laboratory features of brucellosis: a prospective evaluation of 120 adult patients. **International Journal of Clinical Practice**, v. 57, n. 1, p. 20-4, jan-feb. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12587937>>. Acesso em: 28 mar. 2013.

NERO, L. A. et al. Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses Public Health**,

v. 55, n. 6, p. 299-305, Aug. 2008. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18489543>>.

NICOLETTI, P. L. Relationship between animal and human disease. In: YOUNG, E. J.; CORBEL, M. J. (Ed.). **Brucellosis: clinical and laboratory aspects**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 41-51.

NING, P. et al. Short communication: evaluation of Brucella infection of cows by PCR detection of Brucella DNA in raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 9, p. 4863-4867, 2012. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22916890>>.

NING, P. et al. Identification and effect decomposition of risk factors for Brucella contamination of raw whole milk in china. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68230, 2013. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23874552>>. Acesso em: 15 fev. 2014.

NMC. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. 4th ed. Verona: National Mastitis Council, 2004.

NUNES, E. L. D. et al. Detection of ileS-2 gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus by multiplex PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 34, n. 2, p. 77-81, jun. 1999. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000080491800001>. Acesso em: 10 jan. 2013.

NUNES, L. N. et al. Os principais delineamentos na epidemiologia. **Clinical & Biomedical Research**, v. 33, n. 2, p. 178-183, 2013.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Biotechnology in the diagnosis of infectious diseases. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016**. 7th ed. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE), 2012. p. 1-16. Disponível em:
<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.2_BIOTECH_DIAG_INF_DIS.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2016.

_____. REFERENCE LABORATORY FOR ESCHERICHIA COLI. **Identification of Animal Pathogenic and Zoonotic Escherichia coli**

by PCR. Montréal: Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal/OIE, 2013. 1-11 p. Disponível em: <www.ecl-lab.ca>. Acesso em: 10 jan. 2013.

_____. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014**. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE), 2014a. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em: 25 fev. 2015.

_____. **Terrestrial Animal Health Code**. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE), v. 1 e 2, 2014b. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/Mcode/en_sommaire.htm>. Acesso em: 20 nov. 2011.

_____. Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*)(Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016**. 7th ed. Paris: World Organisation for Animal Health (OIE), 2016. p. 1-44. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELOSIS.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2016.

OGLIARI, J. B.; BOSCARIOL, R. L.; CAMARGO, L. E. A. Optimization of PCR amplification of maize microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 2, p. 395-398, 2000.

OLIVEIRA FILHO, P. F. **Epidemiologia e bioestatística: fundamentos para a leitura crítica**. Rio de Janeiro: Rubio, 2015. 248 p.

OLIVER, S. P.; MURINDA, S. E. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. **The Veterinary clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 165-185, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664201>>.

OMICCIOLI, E. et al. Simultaneous direct detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk samples by magnetic extraction and multiplex PCR. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology** v. 17, p. 195-213, 2009.

ORZIL, L. L. et al. Validation of the multiplex PCR for identification of *Brucella* spp. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 847-852, 2016.

PARADIS, M. E. et al. Bayesian estimation of the diagnostic accuracy of a multiplex real-time PCR assay and bacteriological culture for 4 common bovine intramammary pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6436-6448, Nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22981579>>.

PARK, S. H.; RICKE, S. C. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Salmonella* genus, *Salmonella* subspecies I, *Salm. Enteritidis*, *Salm. Heidelberg* and *Salm. Typhimurium*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 1, p. 152-160, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25358641>>.

PAULA, C. L. et al. Detecção de *Brucella* spp. em leite bovino não pasteurizado através da Reação de Cadeia pela Polimerase (PCR). **Arquivo Instituto Biológico**, v. 82, n. 1-5, 2015.

PERSSON, Y.; NYMAN, A. K.; GRONLUND-ANDERSSON, U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, p. 36, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21649936>>.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a Luta contra Mastite**. São Paulo: Westfalia Landtechnik/ Milkbizz, 2002. 192 p.

PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; BROWNING, G. F. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 5, p. 1140-8, may. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11384040>>. Acesso em: 15 set. 2013.

PITKALA, A. et al. Bovine mastitis in Finland 2001--prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 8, p. 2433-2441, aug. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328265>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

PITUCO, E. M. et al. Ruminantes, equídeos e suídeos. In: COOPERAÇÃO TÉCNICA MAPA/OPAS/OPAS/OPAS/OPAS PARA O FORTALECIMENTO DOS PROGRAMAS DE SAÚDE ANIMAL DO BRASIL (Ed.). **Manual veterinário de colheita e envio de amostras: manual técnico**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA - OPAS/OMS, 2010. p. 35-142. ISBN ISSN 0101-6970.

POL, M.; RUEGG, P. L. Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 262-273, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183094>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

PORTES, V. M. et al. Evolução da susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* coagulase negativa isolados do leite de rebanhos do Oeste de Santa Catarina, Brasil. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA: DEFESA AGROPECUÁRIA A SERVIÇO DE UM ESTADO DE EXCELÊNCIA, 5, 2014a, Florianópolis: SBDA. **Anais...** Concórdia -SC: Embrapa Suínos e Aves, 2014. p. 114. On line.

_____. Perfil etiológico da mastite bovina em rebanhos leiteiros do Oeste de Santa Catarina. In: CONFERÊNCIA NACIONAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA: DEFESA AGROPECUÁRIA A SERVIÇO DE UM ESTADO DE EXCELÊNCIA, 5, 2014b, Florianópolis: SBDA. **Anais...** Concórdia -SC: Embrapa Suínos e Aves, 2014. p. 113. On line.

PORTES, V. M.; THALER NETO, A.; SOUZA, G. N. D. Qualidade do leite. In: CORDOVA, U. A. (Ed.). **Produção de leite à base de pasto em Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2012. p. 626. ISBN 978-85-85014-69-8.

POZZOBON, A. et al. Molecular screening for the presence of *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in samples of milk from dairy herds. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 17, p. 1189-1194, 2015.

PRADHAN, A. K. et al. Dynamics of endemic infectious diseases of animal and human importance on three dairy herds in the northeastern

United States. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1811-1825, apr. 2009. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19307664>>. Acesso em: 10 jan 2015.

PROGRAMA DE ZOONOSES - REGIÃO SUL. **Manual de Zoonoses**. [S.I.: s.n.], v. 1. 2010. 162 p.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

RADOSTITIS, O. M. et al. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9. ed. London: W. B. Saunders, 2000. 700 p.

RAMESH, A. et al. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, n. 4, p. 307-314, aug. 2002. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12270272>>. Acesso em: 15 maio 2013.

RIBEIRO, M. E. R.; KOLLING, G. J.; ZANELA, M. B. Mastite e contagem de célula somáticas. In: SCHAFFHAUSER JUNIOR, J.; PEGORARO, L. M. C.; ZANELA, M. B. (Ed.). **Tecnologias para sistemas de produção de leite**. Brasília-DF: Embrapa, 2016. p. 423-437.

RIFFON, R. et al. Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 7, p. 2584-2589, Jul. 2001. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000169586400032>. Acesso em: 28 maio 2015.

RIJPENS, N. P. et al. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1683-1688, 1996. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8633866>>.

ROCHA, B. B. et al. Prevalence and associated factors to unpasteurized cheese consumption in patients with tuberculosis in an urban area of Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária** v. 21, n. 2, p. 96-100, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2014.030>>. Acesso em: 19 mai. 2015.

ROMERO, C.; LOPEZ-GONI, I. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3735-7, aug. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10427076>>. Acesso em: 16 mar. 2014.

RUEGG, P. L. Practical Food Safety Interventions for Dairy Production. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. E1-E9, jun. 2003. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000209089200001>. Acesso em: 17 ago. 2014.

RUEGG, P. L.; REINEMANN, D. J. **Milk Quality and Mastitis Tests**. Udder Health Resources Home, Madison: University of Wisconsin, 2002. Disponível em: <<http://milkquality.wisc.edu/wp-content/uploads/2011/09/milk-quality-and-mastitis-diagnostic-tests.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2015.

RUGGIERO, A. P. et al. Tuberculose bovina: alternativas para o diagnóstico. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2007.

RUUSUNEN, M. et al. Pathogenic Bacteria in Finnish Bulk Tank Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 99-106, Feb. 2013. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000315468000001>. Acesso em: 10 ago. 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SANTANA, E. H. W. et al. Estafilococos em alimentos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SANTOS, F. F. D. et al. Presence of *mecA*-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. **Journal**

of dairy science, v. 99, n. 2, p. 1374-1382, 2016. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26709182>>.

SANTOS, L. L.; PEDROSO, T. F. F.; GUIRRO, E. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira de Santa Izabel do Oeste, Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 860-866, 2010.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria na Qualidade do Leite**. Barueri: Manole, 2007. 314 p. ISBN 85-98416-22-3.

SANTOS, R. L. et al. Economic losses due to bovine brucellosis in Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 759-764, 2013.

SARKAR, G.; KAPELNER, S.; SOMMER, S. S. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 24, p. 7465, dec. 1990. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2259646>>. Acesso em: 16 ago. 2013.

SCHOEPS, W. O método do custeio direto. **Revista Administração Empresarial**, v. 32, n. 3, p. 58-66, 1992.

SEIFI, T. et al. Amplification of GC-rich Putative Mouse PeP Promoter using Betaine and DMSO in Ammonium Sulfate Polymerase Chain Reaction Buffer. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 206-209, oct. 2012. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23408119>>. Acesso em: 30 jun. 2014.

SELEEM, M. N.; BOYLE, S. M.; SRIRANGANATHAN, N. Brucellosis: a re-emerging zoonosis. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 392-398, 2010. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19604656>>.

SERGEANT, E. S. G. **Epitools epidemiological calculators**. Ausvet Pty Ltd, 2016. Disponível em: <<http://epitools.ausvet.com.au>>. Acesso em: 02 set. 2016.

SETIANI, B. E. et al. API *listeria* Rapid kit for confirmatory felotypic conventional biochemical test of the prevalence *listeria monocytogenes* in selected meat and meat products **Procedia Food Scienci**, v. 3, p. 445-452, 2015.

SGARIONI, S. A. et al. Occurrence of Mycobacterium bovis and non-tuberculous mycobacteria (NTM) in raw and pasteurized milk in the northwestern region of Parana, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 45, n. 2, p. 707-11, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242962>>.

SHOME, B. R. et al. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 6, p. 1349-1356, dec. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21972842>>. Acesso em: 14 jul. 2014.

SIKUSAWA, S. et al. Situação epidemiológica da brucelose bovina no Estado de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, supl. 1, p. 103-108, 2009.

SILVA, A. S. D. et al. *Listeria monocytogenes* em Leite e Produtos Lácteos no Brasil: Uma Revisão. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 1, p. 59-67, 2011.

SILVA, E. R.; SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 69, n. 4, p. 260-264, oct. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16479723>>. Acesso em: 20 out. 2012.

SILVA, M. A. **Utilização de pcr multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina**. 2008. 32 f. Dissertação (Mestre em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

SILVA, M. R. et al. Segurança alimentar: percepção e atitudes de consumidores de áreas Peri urbanas de Juiz de Fora - MG. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, p. 1-2, 2005.

SILVA, M. R. et al. Doenças Transmitidas pelo Leite e sua Importância em Saúde Pública. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 62, n. 340, p. 03-20, 2007.

SILVA, M. R. et al. Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area of Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, may. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23778657>>. Acesso em: 18 mai. 2015.

SMITH, G. G. et al. Reducing the public health risk of *Escherichia coli* O157 exposure by immunization of cattle. **Canadian Journal of Public Health**, v. 104, n. 1, p. E9-E11, jan-feb. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23618124>>. Acesso em: 10 out. 2014.

SOUZA, G. N. et al. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1015-1020, 2009.

SREEVATSAN, S. et al. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2602-2610, jul. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878051>>. Acesso em: 20 jul. 2013.

SZLACHTA, K. et al. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A in ultrafiltered milk as related to the effect of different milk components. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 11, p. 2110-2115, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219727>>.

TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 5, p. 664-668, May. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11347997>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

TAPONEN, S. et al. Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2610-7, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19447993>>. Acesso em: 05 jan. 2015.

TEUBER, M. Microbiological Problems Facing the Dairy-Industry. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 276, p. 6-9, 1992. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992BX40W00002>. Acesso em: 15 maio 2015.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, Nov 11. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984417>>.

THRUSFIELD, M. V. **Veterinary epidemiology**. Iowa: Willey-Blackwell, 2007. 612 p.

TROCANTELLI, M. Z. et al. Accuracy of a multiplex PCR protocol for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* detection in bulk tanks. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, n. 4, p. 625-633, 2015.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 4. ed. Santa Maria - RS: UFSM, 2010.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Dairy: World markets and trad**. USDA/FAS, 2009. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2009/122909dairyfull.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2012.

_____. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Testing Methodology for Listeria species or *L. monocytogenes* in Environmental Samples**. USDA/FDA, 2015. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/UCM467056.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2015.

VAN DER POEL, W. H. Transmission of the foot and mouth disease virus through milk and meat products is not a threat for human health. **Tijdschrift Voor Diergeneeskunde**, v. 126, n. 8, p. 285-6, apr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11338619>>. Acesso em: 10 mai. 2013.

VAN KESSEL, J. A. et al. Regional distribution of two dairy-associated Salmonella enterica serotypes. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 5, p. 448-52, mayo. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536986>>. Acesso em: 20 maio 2015.

WENDLANDT, S.; SCHWARZ, S.; SILLEY, P. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a food-borne pathogen? **Annual review of food science and technology**, v. 4, p. 117-139, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23190141>>.

WHO. **Future trends in Veterinary Public Health: Report of a WHO study group**. Geneva: World Health Organization (WHO), 2002. 95 p. (WHO technical report series, 907).

WIEGERS, A. L. The age of competence: an update on the international laboratory accreditation scene for veterinary testing laboratories. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 2, p. 89-96, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11939345>>.

WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; DAS, H. H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal Dairy Science**, v. 80, n. 10, p. 2592-2598, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9361234>>.

WU, S. J.; CHAN, A.; KADO, C. I. Detection of PCR amplicons from bacterial pathogens using microsphere agglutination. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 3, p. 395-400, Mar. 2004. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000189214600011>. Acesso em: 20 abr. 2014.

YANG, Y. et al. Magnetic nano-beads based separation combined with propidium monoazide treatment and multiplex PCR assay for simultaneous detection of viable *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in food products. **Food Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 418-424, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23541211>>.

YU, W. L.; NIELSEN, K. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. **Croatian medical journal**, v. 51, n. 4, p. 306-313, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20718083>>.

ZADOKS, R. N. et al. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 357-372, dec. 2011. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000300171800007>. Acesso em: 10 dez. 2014.

ZAFALON, L. F. et al. Comportamento da condutividade elétrica e do conteúdo de cloretos do leite como métodos auxiliares de diagnóstico na mastite subclínica bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 23, p. 159-163, 2005.

ZHAO, X. et al. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 297-312, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24375418>>.

ZOCCAL, R. **Leite inspecionado no Brasil 2000/2011**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

ZSCHOCK, M. et al. Evaluation of tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis as a molecular method for species identification of streptococcal isolates from bovine mastitis. **The Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 3, p. 333-337, aug. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16174365>>. Acesso em: 20/ ago. 2013.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Título da Pesquisa: “Desenvolvimento de uma metodologia molecular para detecção e triagem de patógenos zoonóticos transmitidos pelo leite bovino”

Pesquisador Responsável: Vagner Miranda Portes **RG:** 4165979

Instituição: Epagri/UFSC

Endereço para contato: Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Rua João Pio Duarte Silva, Setor F, Bloco A, C.P. 476, Trindade, CEP: 88040-970, Florianópolis-SC.

Fone: (48) 3721-2958

E-mail: vagnerportes@epagri.sc.gov.br

Pesquisador Principal: Mário Steindel

1. **Natureza da pesquisa:** O Sr. (Sra.) está sendo convidado (a) a autorizar a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa que tem como finalidade o levantamento de agentes zoonóticos circulantes no rebanho leiteiro do Oeste de Santa Catarina.
2. **Identificação do (s) animal (is):** Vacas em lactação.
3. **Envolvimento na pesquisa:** Ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá ao pesquisador a coleta de amostra de leite e de sangue de uma porcentagem dos animais de sua propriedade assim como uma amostragem de leite do tanque resfriador da propriedade. Para coleta serão utilizados materiais descartáveis seguindo os procedimentos de assepsia preconizados e recomendados pelo Manual Veterinário de Colheita e Envio de Amostras da Organização Pan-americana da Saúde (PITUCO et al., 2010) e pelo National Mastitis Council (2004). O Sr. (Sra.) tem a liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para os seus animais e a si próprio. Antes da assinatura deste termo o proprietário foi esclarecido da metodologia a ser utilizada na coleta das amostras: coleta de leite (ordenha manual) e coleta de sangue (punção da veia coccígea). Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa, antes ou durante o curso da pesquisa, diretamente ao pesquisador pelo telefone ou e-mail acima, também poderá solicitar informações ao Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) da UFSC.

CEP-UFSC, contato: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Bairro Trindade, CEP 88.040-400, Florianópolis-SC, Fone: (48) 3721-6094, E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br.

4. **Sobre os dados necessários:** Será preenchido um questionário mediante observação dos rebanhos e questionamento ao Sr. (Sra.) e/ou funcionários, para obter informações sobre a caracterização do rebanho, infraestrutura da propriedade, cuidados higiênicos durante a ordenha, controle e prevenção de mastites, manejo sanitário e reprodutivo, além do consumo de leite e derivados na propriedade.
5. **Riscos e desconforto:** Embora a participação nesta pesquisa não traga complicações legais, há riscos inerentes ao desenvolvimento do estudo: risco de contaminação por patógenos de caráter zoonóticos possivelmente presente nos animais durante a coleta das amostras e risco de acidentes no manejo dos animais durante a coleta de amostras. Ressaltamos que todos os cuidados possíveis inerentes aos procedimentos serão adotados de forma a reduzir ao máximo os riscos e desconfortos.
6. **Acompanhamento:** Em caso de alguma eventual ocorrência decorrente da pesquisa, o pesquisador Wagner Miranda Portes se compromete em prestar assistência imediata e integral mediante o resultado das análises realizadas, ao participante da pesquisa, orientando pessoalmente ou acionando pessoal competente.
7. **Benefícios:** Esperamos que este estudo traga informações importantes sobre sanidade animal e saúde pública, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa auxiliar com controle de enfermidades dos animais e gerar informações relevantes para programas de vigilância epidemiológica e de saúde pública. O pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos através de artigos científicos e boletins da EPAGRI, preservando a confidencialidade dos participantes, sem revelar seu nome, instituição ou qualquer informação relacionada à sua privacidade.
8. **Confidencialidade:** Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados e tomarão todas as providências necessárias para manter o sigilo. Entretanto, existe a remota possibilidade da quebra do sigilo, mesmo que involuntário e não intencional.
9. **Pagamento:** O Sr. (Sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa as quais estão sendo custeadas pelo referido projeto de pesquisa o qual é financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa de Santa Catarina - FAPESC, bem como, nada será pago por sua participação. O produtor receberá o laudo contendo os resultados das análises de amostras da sua propriedade e em caso de algum diagnóstico positivo o pesquisador se compromete em fornecer as orientações necessárias e legais para o controle sanitário devido. Em caso de eventuais danos decorrentes dos procedimentos da pesquisa é um direito do participante a solicitação de indenização dos mesmos.

Declaramos para os devidos fins, que os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem à Resolução 879, de 15 de fevereiro de 2008 e à Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008, bem como está em conformidade com o que prevê

os termos da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, respeitando incondicionalmente os itens IV.3 e IV.4 da mesma e Resolução 22/2015 do Conselho Nacional de Experimentação Animal.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa.

Consentimento Pós-Informação:

Eu, _____,

RG: _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ____/ ____/

Assinatura do participante

Vagner Miranda Portes

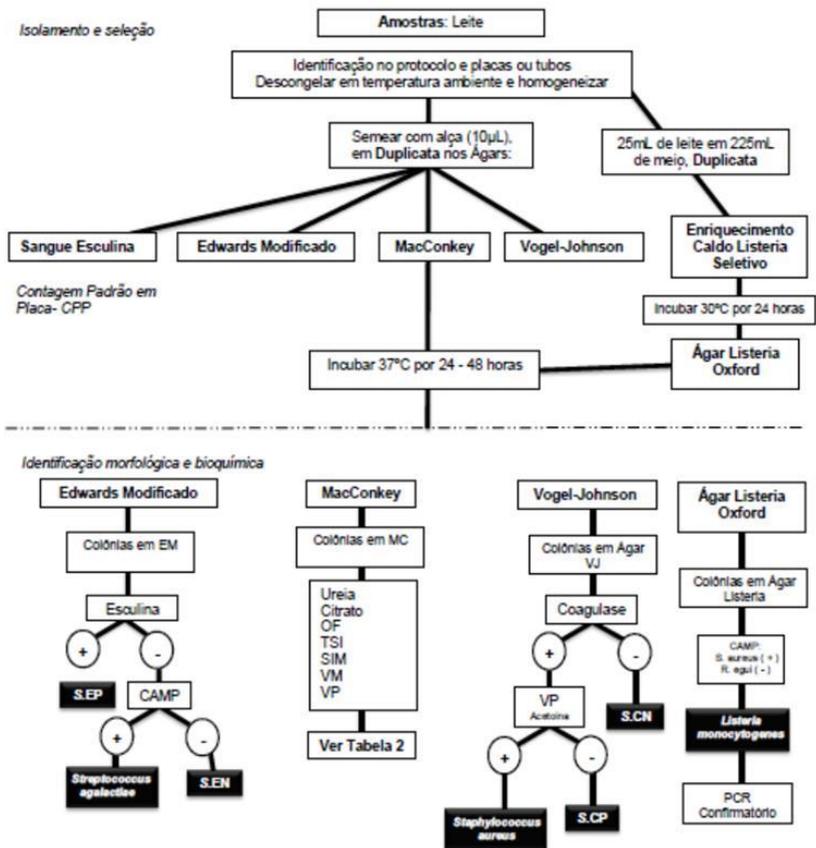
Mário

Steindel

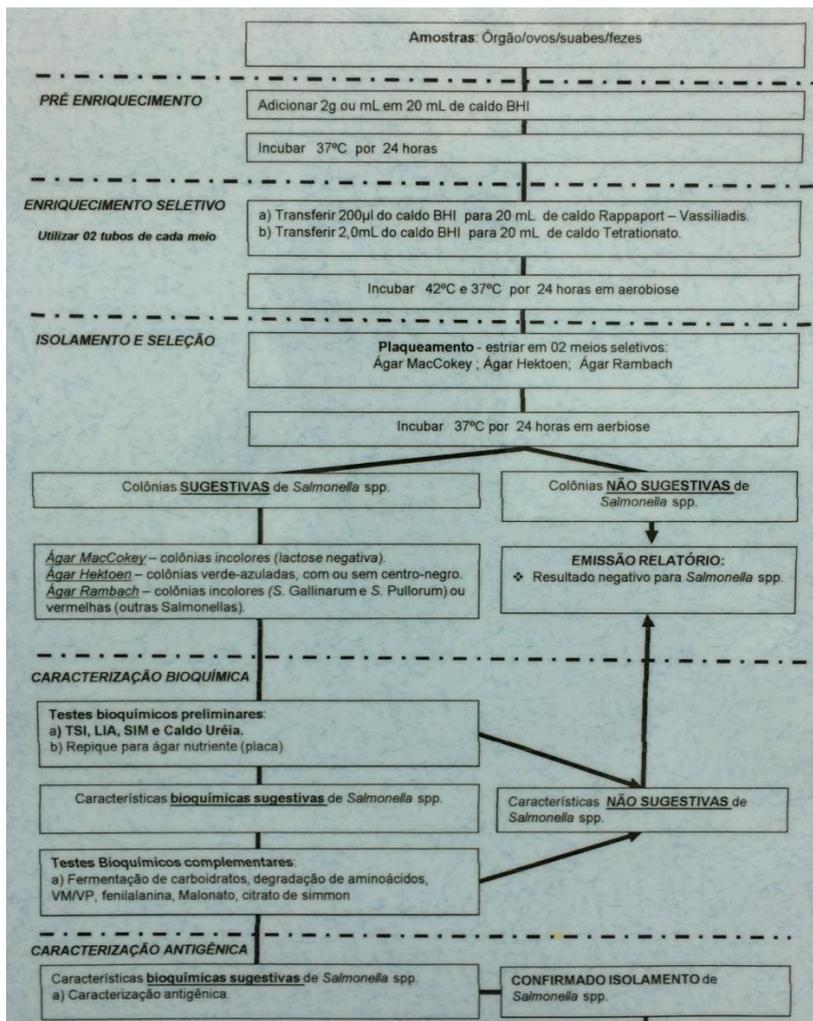
Pesquisador Responsável

Pesquisador Principal

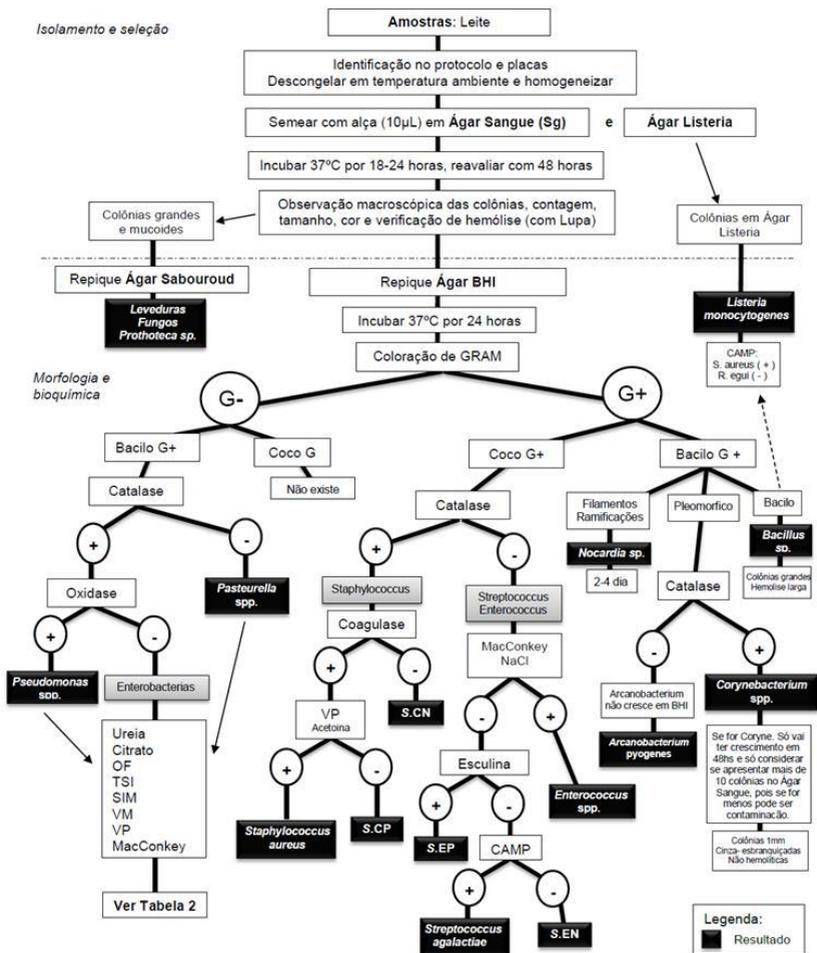
APÊNDICE B – Organograma do isolamento e identificação microbiológica em leite bovino proveniente de tanque de expansão



APÊNDICE C – Organograma do isolamento e identificação microbiológica de *Salmonella* spp. em leite bovino proveniente de tanque de expansão



APÊNDICE D – Organograma do isolamento e identificação microbiológica em leite bovino



ANEXO A – Protocolo LMW - padrão molecular de baixo peso**Padrão de baixo peso molecular (LMW)**

Material necessário:

- 100µg de DNA do pUC
- Tampão 10X da enzima *HaeIII*: 100 µl
- 50 unidades da enzima *HaeIII*
- Água Milli-Q (q.s.p. 1000µl)

Procedimento:

- Incubar durante 4 horas a 37°C ou overnight
- Checar 5µl em gel de agarose 1%
- * Se ocorrer a digestão completa → adicionar 300µl de tampão de amostra ficoll 6X

Para as corridas aplicar 5µl de padrão no gel.

Bandas

587
458
434
298
267
257
174
102
80
18
11bp

Revisado em fevereiro 2014

ANEXO B – Organograma das fases do desenvolvimento e validação de um novo teste diagnósticas - OIE (2014)

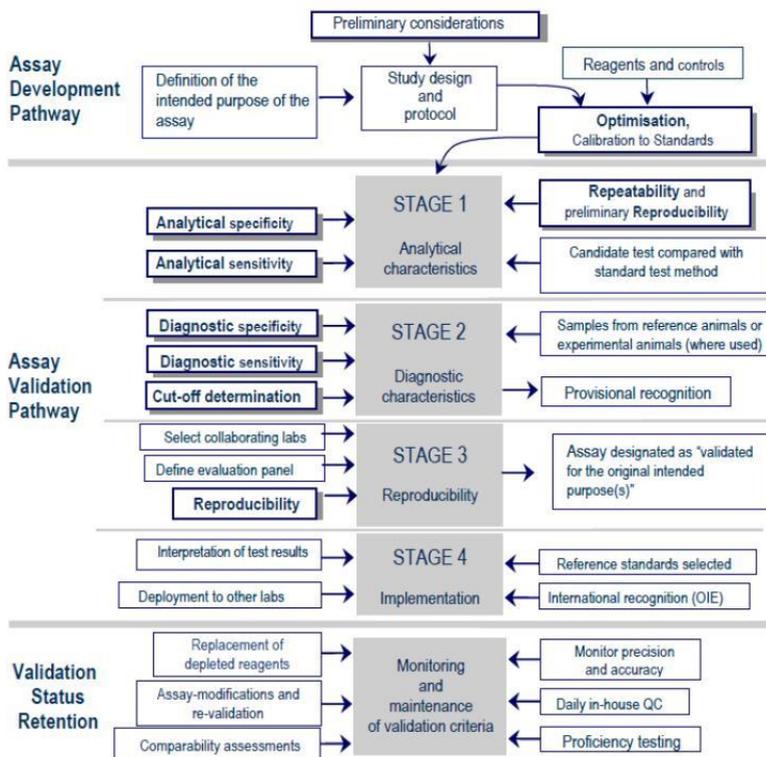


Figure 1. The assay development and validation pathways with assay validation criteria highlighted in bold typescript within shadowed boxes.