

Universidade dos Açores
Departamento de Ciências Agrárias



Staphylococcus aureus no Queijo São Jorge
DOP – estudo da dinâmica do crescimento
durante o fabrico e de possíveis fontes de
contaminação

Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar

Célia Maria Frutuoso Silva

Orientador: Professor Doutor José Estevam da Silveira Matos

Co-Orientadora: Professora Doutora Maria da Graça Silveira

Angra do Heroísmo

2011

Agradecimentos

Gostaria de manifestar o meu sincero e reconhecido agradecimento a algumas pessoas que passo a citar:

Ao meu orientador Professor Doutor José Estevam da Silveira Matos, pela disponibilidade, dedicação e conselhos fornecidos ao longo deste trabalho;

À minha co-orientadora Professora Doutora Maria da Graça Silveira, pela ajuda e conhecimentos transmitidos;

À Direcção da Uniqueijo que gentilmente me acolheu e disponibilizou o laboratório para a realização de uma parte do trabalho, bem como aos técnicos e auxiliar de laboratório pela amizade e conhecimentos transmitidos;

À Cooperativa da Beira e à Cooperativa dos Lourais pelo acolhimento caloroso;

Ao Director do SERCLAT, o Engenheiro José Bernardo, pela simpatia e disponibilidade no fornecimento de dados;

À Márcia Coelho, pelo companheirismo e amizade;

Aos meus pais e irmãos pelo apoio, incentivo e preocupação;

Ao meu namorado, Cláudio Brasil, pela compreensão, paciência e entusiasmo que sempre me transmitiu;

E a todos aqueles que de algum modo contribuíram para que este trabalho fosse possível.

Resumo

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é apontado, actualmente, como sendo a contaminação microbiana mais preocupante no Queijo São Jorge DOP. Neste sentido, estudou-se, em duas empresas de lacticínios cooperativas daquela Ilha, na Cooperativa da Beira e na Cooperativa dos Lourais, a dinâmica de crescimento desta bactéria durante o fabrico deste queijo, bem como as possíveis fontes de contaminação, ao longo de 12 semanas, de Fevereiro a Maio de 2011. O comportamento do *S. aureus* em queijos depende do processo de fabrico e da sua consequente capacidade para resistir a diferentes factores de stress durante o processo. Os principais objectivos consistiram em avaliar a dinâmica de crescimento do *S. aureus* durante o processo de fabrico do Queijo São Jorge e estudar as possíveis fontes de contaminação, verificando o seu possível contributo relativo. Para o efeito recolheram-se amostras de leite cru, leite antes da adição de coalho, soro do fim de fabrico e coalhada escorrida, “soro fermento”, etc.. Verificou-se ainda se o processo de bactofugação tinha influência na contagem de *S. aureus*, células somáticas, mesófilos totais e teores de gordura, proteína e sólidos isentos de gordura e se existiam diferenças nestes parâmetros, entre as duas Cooperativas, uma vez que a bactofugação só era realizada na Cooperativa da Beira.

Foram recolhidos 188 isolados, em meio selectivo Baird-Parker, modificado por Devriese (1981), dos quais 167 foram confirmados como sendo *S. aureus*. Estes foram posteriormente biotipificados através do esquema preconizado por Devriese (1984), adaptado por Matos (1988).

Em relação à contagem de *S. aureus* no leite cru das duas Cooperativas, verificou-se que o seu valor médio foi superior na Cooperativa da Beira, 1.165 ufc/mL, enquanto que na Cooperativa dos Lourais foram 755 ufc/mL. Não sendo estatisticamente significativa a diferença entre as duas cooperativas, estes valores encontram-se abaixo do valor máximo permitido, de acordo com o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005. O processo de bactofugação utilizado na Cooperativa da Beira teve influências estatisticamente significativas na média da contagem de células somáticas (CCS), na contagem de mesófilos totais e na contagem média de *S. aureus*, ao longo das 8 semanas do estudo. Conclui-se assim que o processo de bactofugação, apesar de ter como função principal a eliminação de esporos bacterianos no leite, tem influência na redução de mesófilos totais, células somáticas e *S. aureus*, apresentando-se como um meio eficaz de melhorar estas características do leite, sendo neste caso notoriamente benéfica a redução de uma bactéria patogénica como o *S. aureus*. Porém, a bactofugação também teve efeitos negativos sobre a qualidade química do leite. O teor médio de sólidos isentos de gordura (SNF) e de proteína diminuíram significativamente.

Relativamente à evolução do crescimento de *S. aureus* durante o fabrico de queijo, verificou-se que não existiram diferenças estatisticamente significativas entre a contagem de *S. aureus* do leite em cuba e no leite imediatamente antes da adição do coalho e o soro, mas existiram diferenças estatisticamente significativas entre a contagem média de *S. aureus* no leite em cuba e na coalhada e entre o soro e a coalhada, atingindo neste último caso as contagens mais elevadas. A evolução do crescimento de *S. aureus* durante o fabrico de queijo foi semelhante nas duas cooperativas estudadas, apesar dos valores absolutos das contagens serem bastante diferentes, tendo sido mais elevados na Cooperativa dos Lourais, dado que o leite, no caso da Beira, era previamente bactofugado. O Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005 estipula valores máximos a verificar ~~no momento em que se prevê~~

que o número de estafilococos seja mais elevado”. Neste caso, as contagens obtidas na coalhada, na Cooperativa da Beira tiveram um valor bastante inferior ao valor limiar ($m = 10^4$ ufc/g). Todavia, a Cooperativa dos Lourais, ultrapassou este valor de referência, mas não o limite máximo admissível ($M = 10^5$ ufc/g), assumindo-se para este efeito que a grande maioria dos estafilococos coagulase positivos eram neste caso, *S. aureus*. O aquecimento final, designado localmente por “eozedura da coalhada”, será um factor determinante relativamente a este aspecto.

Em relação aos resultados da biotipificação, constatou-se que 56,2% dos biótipos encontrados correspondiam a hospedeiros específicos e 43,8% a hospedeiros não específicos. Os biótipos mais prevalentes foram os biótipos com hospedeiro não específico $K^- \beta^+ A$ (23,4%), o biótipo bovino (22,8%) e o biótipo de aves (18,6%). Na Cooperativa dos Lourais, os biótipos mais prevalentes foram o biótipo aves, o biótipo $K^- \beta^+ A$ e o biótipo humano. Contrariamente na Cooperativa da Beira, os biótipos mais frequentes foram o biótipo bovino, o biótipo não específico $K^- \beta^+ A$ e o biótipo aves. Os isolados de *S. aureus* foram também comparados quanto à produção de lecitinase e lipase, e os resultados relacionados com os biótipos, humano e bovino. Uma elevada percentagem de isolados pertencentes ao biótipo humano apresentou reacções positivas para a lecitinase em comparação com os isolados pertencentes ao biótipo bovino, que apresentaram baixa percentagem desta reacção. Estes resultados estão de acordo com os de outros autores (Owens e John, 1975; O’Toole, 1987; Matos, 1988; Matos *et al.*, 1995).

Palavras-chave: leite cru; Queijo São Jorge DOP; *S. aureus*; bactofugação; biotipificação.

Abstract

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) has been identified as the most significant microbial contamination in São Jorge DOP cheese. The research that is here presented – conducted in two local dairy cooperatives, the Cooperative of Beira and the Cooperative of Lourais, during 12 weeks, from February to May 2011 – addresses this subject. The study took into account the dynamic growth of the bacteria during the manufacture of this cheese as well as possible sources of contamination. The behavior of *S. aureus* in cheese depends on the manufacturing process and its consequent ability to withstand various stresses throughout. Taken into account this information, the main objective of this research was to evaluate the growth dynamics of *S. aureus* during the manufacture of São Jorge cheese and to assess possible sources of contamination. For this purpose, samples were collected from raw milk, milk before adding rennet, whey, drained curds and "whey starter". This research paper will also take into account the influence of the bactofugation process on the count of *S. aureus*, somatic cells and mesophilic count, total fat, protein and fat-free solids. Considering that the only cooperative using bactofugation was Beira, it will also consider the differences in these parameters between the two cooperatives.

188 isolates were collected in the selective Baird-Parker medium, modified by Devriese (1981), of which 167 were confirmed as being *S. aureus*. These isolates were later biotipified according to the method of Devriese (1984), adapted by Matos (1988).

In relation to the count of *S. aureus* in raw milk of the two cooperatives, it was found that the average value was higher in Beira Cooperative, 1165 cfu/mL, while in the Cooperative of Lourais was 755 cfu/mL. These values were below the maximum value allowed by the Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005. The bactofugation process used in the Cooperative of Beira had statistically significant influences on the average of somatic cell count (SCC), in total mesophilic count and the count of *S. aureus* over. We conclude that the bactofugation process, despite having as primary function the elimination of bacterial spores in milk, influenced the reduction of total mesophilic, somatic cells and *S. aureus* counts –presenting itself as an effective mean to improve the characteristics of milk. This study also shows that this processing method is remarkably beneficial when attempting to reduce pathogenic bacteria such as *S. aureus*. Despite the fact, the bactofugation also had negative effects on the chemical quality of milk, this considering that the average content of fat-free solids (SNF) and protein decreased significantly.

Regarding the evolution of the growth of *S. aureus* during the manufacture of cheese, the study suggests that there were no statistically significant differences between the count of *S. aureus* in raw milk and milk in cheese vat just before the addition of curd and whey. However there were statistically significant differences between the average count of *S. aureus* in milk in the vat, the curd, whey and curd where it reached the highest counts. The evolution of the growth of *S. aureus* during the manufacture of cheese was similar in the two studied cooperatives. The absolute values were quite different, being higher in the Cooperative Beira due to the bactofugation process. Considering that the Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 stipulates that the maximum values should be checked "*when it is expected that the number of staphylococci is higher*" the counts obtained in the curd at the Cooperative in Beira were well below the threshold value ($m = 10^4$ cfu/g). As for the Lourais Cooperative, the count values exceeded this benchmark however without reaching the maximum permissible limit ($M = 10^5$ cfu/g), assuming for this purpose that the vast

majority of coagulase positive were in this case *S. aureus*. In this respect, the final heating, "cooking the curd," was a determining factor.

Regarding the results of biotyping, it was found that 56.2% of the biotypes corresponded to specific hosts and 43.8% to non-specific hosts. The most prevalent biotypes were non host-specific K- β -A (23.4%), the bovine biotype (22.8%) and poultry biotype (18.6%). In the Lourais Cooperative, the most prevalent biotypes were the poultry biotype, biotype K+ β -A and the human biotype. Unlike the Cooperative of Beira, where the most frequent biotypes were the bovine, poultry and non specific biotype K + β -A. The isolates of *S. aureus* were also compared to quantitative production of lecithinase and lipase, and the results between the human and bovine biotypes. A high percentage of isolates belonging to the human biotype showed positive reactions to the lecithinase compared to bovine isolates belonging to bovine biotype, which had a low percentage when exposed to this reaction. These results are in agreement with those proposed by other authors (Owens and John, 1975; O'Toole, 1987; Matos 1988; Matos et al., 1995).

Keywords: raw milk, São Jorge DOP cheese, *S. aureus*, bacteriophage; biotyping.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract.....	iv
Siglas e Acrónimos.....	xi
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Enquadramento histórico do Queijo São Jorge.....	3
2.2. Qualidade microbiológica do leite para o fabrico de queijo	5
2.3. As Mamites como Factores determinantes para a Qualidade do leite	7
2.3.1. Células Somáticas	8
2.3.2. Etiologia das mamites	11
2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.4.1. Mamite causada por <i>S. aureus</i>	14
2.4.2. Outras fontes de contaminação por <i>S. aureus</i> durante o processo de fabrico de queijos.....	16
2.4.3. Factores de virulência.....	16
2.4.3.1. Componentes da parede celular	16
2.4.3.2. Componentes superficiais da célula	18
2.4.3.3. Produtos extracelulares.....	18
2.4.4. Enterotoxinas estafilocócicas (SEs)	20
2.5. Dinâmica da população de <i>S. aureus</i> durante o fabrico de queijos	21
2.5.1. Queijo fresco	22
2.5.2. Queijo de pasta mole.....	23
2.5.3. Queijo de pasta dura e semi-dura	24
2.6. Tecnologias disponíveis para a redução de <i>S. aureus</i> no leite e queijo	25
2.6.1. Utilização de bacteriófagos	25
2.6.2. Tratamentos a alta pressão (HPT)	26
2.6.3. Bactofugação	28
3. Material e Métodos.....	29
4. Apresentação e discussão dos resultados	33
4.1. Isolamento e contagens de <i>S. aureus</i> durante o processo de fabrico	33

4.2. Biotipificação dos isolados de <i>S. aureus</i> obtidos.....	43
4.3. Reacção da lecitinase e lipase dos isolados de <i>S. aureus</i> no meio de Baird-Parker, modificado segundo Devriese (1981)	47
5. Conclusões.....	48
6. Bibliografia.....	50
7. Anexos.....	59

Índice de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento da mamite num úbere infectado (adaptado de Viguier <i>et al.</i> , 2009).	15
Figura 2. Acção da SpA. As bactérias sem SpA são correctamente reconhecidas por anticorpos (a). A SpA na superfície da célula bacteriana (b) faz com que os anticorpos se liguem às bactérias na orientação errada, impedindo que os leucócitos reconheçam e destruam as bactérias. As bactérias também secretam SpA, que pode ligar-se a anticorpos causando aglutinação (Freeman-Cook, 2006).....	17
Figura 3. Algumas etapas do processo de fabrico do queijo São Jorge. Da esquerda para a direita: leite na cuba; corte e “cozedura da coalhada”; dessora; trabalho manual da coalhada (fotos do autor).	34
Figura 4. Aspecto de isolados de <i>S. aureus</i> em agar Baird-Parker modificado segundo Devriese (1981) (fotos do autor).	34
Figura 5. Isolado de <i>S. aureus</i> (halo de lipase e lecitinase) em agar Baird-Parker modificado segundo Devriese (1981) (foto do autor).	35
Figura 6. Coloração de Gram de isolados de <i>S. aureus</i> (foto do autor).	35
Figura 7. Hemólises α e β de um isolado de <i>S. aureus</i> (foto do autor).	36
Figura 8. Diferenças médias em três variáveis (mesófilos totais, CCS e <i>S. aureus</i>) entre o leite cru da Cooperativa da Beira e o leite cru da Cooperativa dos Lourais, verificadas ao longo de 8 semanas (de Março a Maio de 2011).	37
Figura 9. Diferenças médias em três variáveis (mesófilos totais, CCS e <i>S. aureus</i>) entre o leite cru e o leite bacto-fugado na Cooperativa da Beira, verificadas ao longo de 8 semanas (de Março a Maio de 2011).	38
Figura 10. Teor médio de matéria gorda, teor médio de gordura e teor médio de sólidos sem gordura do leite cru nas Cooperativas da Beira e Lourais, verificadas ao longo de 8 semanas (de Março a Maio de 2011).	39
Figura 11. Teor médio de matéria gorda, teor médio de gordura e teor médio de SNF do leite cru e bacto-fugado na Cooperativa da Beira, verificadas ao longo de 8 semanas (de Março a Maio de 2011).	40
Figura 12. Evolução da contagem de <i>S. aureus</i> em 4 momentos do processo de fabrico do Queijo São Jorge (DOP) na Cooperativa da Beira, verificada ao longo de 12 semanas (de Fevereiro a Maio de 2011).	41
Figura 13. Evolução média da contagem de <i>S. aureus</i> em 4 momentos do fabrico do Queijo São Jorge (DOP) na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 12 semanas (de Fevereiro a Maio de 2011).....	42
Figura 14. Resultado do teste da produção de estafiloquinase em isolados de <i>S. aureus</i> (de acordo com o esquema preconizado por Devriese (1984)) (foto do autor).	43

Figura 15. Resultado do teste da produção de β -hemolisina (reacção de CAMP) em isolados de <i>S. aureus</i> de acordo com o preconizado por Devriese (1984) (fotos do autor).....	44
Figura 16. Resultado do teste da coagulação de plasma bovino em isolados de <i>S. aureus</i> de acordo com o preconizado por Devriese (1984) (fotos do autor).....	44
Figura 17. Resultado do teste do crescimento de <i>S. aureus</i> na presença de cristal violeta de acordo com o preconizado por Devriese (1984) (fotos do autor).....	45
Figura 18. Distribuição percentual dos isolados de <i>S. aureus</i> pelos vários biótipos nas Cooperativas dos Lourais e Beira.....	46
Figura 19. Reacção da lecitinase e lipase e, ou apenas lipase, nos isolados de <i>S. aureus</i> obtidos durante o fabrico do Queijo São Jorge nas Cooperativas dos Lourais e Beira e biotipificados como biótipos humanos e bovinos.....	47

Índice de Quadros

Quadro 1. Tipos de células somáticas (%) num úbere são e num úbere com mamites (x1.000).	8
Quadro 2. Correlação negativa entre a CCST e a produção de leite dos rebanhos leiteiros (CCST X 1.000) (Adaptado de Harmon, 1994).....	10
Quadro 3. Síntese dos efeitos negativos associados à elevada CCS e às alterações da composição do leite.	11
Quadro 4. Esquema de classificação para subdivisão dos isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> em biótipos (Adaptado de Devriese, 1984; e Matos, 1988).	30
Quadro 5. Fluxograma de fabrico do Queijo São Jorge DOP.....	33
Quadro 6. Biótipos (segundo Devriese, 1984) encontrados nos 167 isolados de <i>S. aureus</i> durante o fabrico do Queijo São Jorge nas Cooperativas dos Lourais e Beira, de Fevereiro a Maio de 2011.....	45

Siglas e Acrónimos

BAL – Bactérias do Ácido Lático

BAL – PB – Bactérias do Ácido Lático Produtoras de Bacteriocinas

BHI – Brain Heart Infusion

CALF – Cooperativa Agrícola dos Lacticínios do Faial

CCS – Contagem de Células Somáticas

CCSI – Contagem de Células Somáticas Individuais

CCSIQ – Contagem de Células Somáticas Individuais de cada Quarto

CCST – Contagem de Células Somáticas Totais

CE – Comunidade Europeia

cs – células somáticas

DOP – Denominação de Origem Protegida

EDTA – ácido etileno diaminotetra-acético

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

FINISTERRA - Cooperativa de Lacticínios do Topo

HHP – High Hydrostatic Pressure

HPT – High Pressure Treatment

PCA – Plate Count Agar

PMNs – Polimorfonucleares

SAg – exotoxinas superantigénicas

SERCLAT – Serviço de Classificação do Leite da Ilha Terceira

SEs – Enterotoxinas Estafilocócicas

SNF – Sólidos Isentos de Gordura

SpA – Proteína A

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

TCM – Teste Californiano de Mamites

TSST-1 – Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico

UHT – Ultra-High Temperature

ufc – unidades formadoras de colónias

UHPH – Ultra High Pressure Homogenization

UNIQUEIJO – União de Cooperativas Agrícolas de Lacticínios de S. Jorge

1. Introdução

Na ilha de S. Jorge, a criação de gado bovino para a produção de leite continua, ainda hoje em dia, a ter um grande interesse por parte da população local, apresentando-se o fabrico de Queijo como a principal fonte de receitas da ilha. A qualidade do leite entregue pelos produtores assume-se como o factor mais importante para a obtenção de um produto de elevada qualidade.

De acordo com a FAO (1989), os factores que contribuem para a contaminação do leite são as infecções no úbere (mamites), a sujidade no úbere e nos tetos, a má higiene do equipamento de ordenha, as mãos dos manipuladores e os panos de limpeza do úbere. A expansão do Queijo São Jorge para novos mercados e as exigências em matéria de qualidade implícitas tem levado a um grande controlo dos microrganismos indesejáveis presentes no queijo. Por essa razão, a identificação e o controlo das etapas do processo de fabrico que possam comprometer a qualidade microbiológica do produto é de grande importância para o fabrico de queijos, particularmente os produzidos a partir do leite cru, como é o caso do Queijo São Jorge.

No Queijo São Jorge, a contaminação por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é apontada como sendo, neste momento, a contaminação microbiana mais preocupante. As contaminações por este microrganismo podem ser de origem ambiental; dos próprios animais, em particular dos úberes infectados; da indústria; e do manuseio inadequado do leite, uma vez que os humanos são, muitas vezes, portadores desta bactéria. A contaminação do queijo por *S. aureus* pode ocorrer durante o processo de fabrico (em qualquer fase) ou pode resultar de uma contaminação procedente da matéria-prima. A presença deste microrganismo indesejável no leite e nos seus derivados traz prejuízos à indústria e à saúde. Assim, a pesquisa de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas no alimento tornou-se uma importante ferramenta para o controlo da qualidade e segurança alimentar (Pereira, 2006; Necidová *et al.*, 2009).

O *S. aureus* possui uma enorme capacidade de crescer em diferentes condições, pois apresenta características peculiares, como uma faixa de temperatura de crescimento entre os 7 e os 48 °C, sendo que a sua temperatura óptima de crescimento é 37 °C; cresce rapidamente em meios com presença de 5-7% de NaCl; cresce numa variada gama de pH (de 4,2 a 9,3); e multiplica-se em alimentos com valores de actividade da água inferiores aos normalmente considerados mínimos para outras bactérias halófilas (valor mínimo para o crescimento $a_w = 0,86$) (Wong e Bergdoll, 2002; Bhatia e Zahoor,

2007; Adams e Moss, 2008). O comportamento do *S. aureus* em queijos depende do processo de fabrico e da sua consequente capacidade para resistir a diferentes factores de stress durante o processo. Em queijos de pasta dura, como é o caso do queijo São Jorge, o risco de crescimento de *S. aureus* depende principalmente da aplicação de tratamentos térmicos na coalhada (Cretenet *et al.*, 2011).

O presente trabalho teve como principais objectivos avaliar a dinâmica de crescimento do *S. aureus* durante o processo de fabrico do Queijo São Jorge DOP e estudar as suas possíveis fontes de contaminação, verificando o contributo relativo das várias possíveis origens: animal, humano, “soro fermento”, etc., em duas Cooperativas de Lacticínios da Ilha de São Jorge, na Cooperativa da Beira e na Cooperativa dos Lourais. Verificou-se ainda qual seria a influência do processo de bactofugação nas contagens de *S. aureus*, células somáticas, mesófilos totais e teores de gordura, proteína e sólidos isentos de gordura e se existiam diferenças nestes parâmetros entre as duas Cooperativas, uma vez que este processo só é utilizado pela Cooperativa da Beira.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Enquadramento histórico do Queijo São Jorge

Os Açores foram descobertos, ou redescobertos, entre os anos de 1432 a 1460. Consta que o primeiro povoamento terá sido feito com animais, por Gonçalo Velho, a mando do Infante, experimentando-se assim a possibilidade de sobrevivência humana.

Gaspar Frutuoso, nas suas *“Saudades da Terra”*, num estilo pitoresco, recorda-nos quão bem sucedido foi este início da pecuária açoriana:

“Fudo multiplicou tanto entre o basto arvoredo, com os bons pastos que havia de erva e rama, que quando vieram os primeiros povoadores, d’ali a alguns anos, achavam grandes manadas deste gado em toda ela, e muito mais nas partes onde o deitaram, pelo que havia tanta fartura nesta terra, que não se cortava n’aquele tempo carne nos açougues, nem os havia, mas cada um fazia açougue em sua casa, tomando os bois, carneiros e cabras, e mortos dependuravam à porta em uma árvore, e d’ali partiam e comiam quanto queriam...”

O primeiro aproveitamento pecuário terá sido essencialmente da carne e lã, para abastecimento das populações e das naus, não merecendo inicialmente o leite grande apreço por parte do lavrador, conforme se depreende das palavras de Frutuoso. —*João do Outeiro da Ribeira Grande, tinha um curral de gado nas Feteiras, e era tanto o leite, que de continuo tinham na cafúa os pastores cinco e seis cêstos grandes de leite escorrido, porque deitavam fetos debaixo dos cêstos grandes e o leite em cima a escorrer, o qual davam aos porcos e às galinhas; e, para ordenhar às vezes as vacas em um dia, deitavam o leite dos outros dias fora”*.

A produção de queijo na ilha de São Jorge terá ocorrido nos primórdios da colonização, já que Gaspar Frutuoso refere nas *Saudades da Terra* (Livro VI, capítulo 33º, intitulado *“Da Descrição da Ilha de S. Jorge”*), que *“há nela muito gado vacum, ovelhum e cabrum, do leite do qual se fazem muitos queijos em todo o ano, o que dizem ser os melhores de todas as ilhas dos Açores, por causa dos pastos...”*

A natureza dos pastos e a introdução de gado na Ilha, ainda antes do seu povoamento, terão feito com que os primeiros colonos recorressem naturalmente à transformação do leite em queijo, como forma de o aproveitar e conservar. Inicialmente é provável que esse leite fosse produzido não só por vacas, mas também por ovelhas e cabras.

A presença de um grande número de flamengos entre os primeiros povoadores, com destaque para o grupo capitaneado por Willelm van der Haagen (Flanders, Bruges or Maastricht, 1430 - Topo, São Jorge, 1510), terá contribuído certamente para esta tradição e o tipo de queijo fabricado na Ilha.

José Pereira da Cunha da Silveira e Sousa Júnior, ele próprio um dinamizador do fabrico do queijo em São Jorge, no século XIX, escreveu em 1887 que “*S. Jorge, cognominada a terra do queijo e onde há mais de um século se manipula industrialmente o leite, tem-se em bem verdade, multiplicado o número de fabricantes....*” (Uniqueijo, 2011). Já em meados do século XVIII, o fabrico de queijo se expandira bastante, exportando-se para as restantes ilhas dos Açores (Terceira, S. Miguel e Faial), conforme confirmam os registos municipais (Uniqueijo, 2011).

A família Cunha da Silveira introduziu melhorias tecnológicas na produção de queijo, recorrendo à vinda de técnicos estrangeiros, nomeadamente Fernand Ranchel, um flamengo, que desenvolveu o seu trabalho no lugar do Lournal (Kongo, 2010; Uniqueijo, 2011).

Desde cedo os queijos de São Jorge terão assumido uma forma cilíndrica e de grandes dimensões. Ernesto de Lacerda Lavallièrè Rebelo (Lisboa, 26 de Abril de 1842 — Horta, 15 de Novembro de 1890), um escritor faialense, refere-se a um queijo em particular, fabricado em São Jorge para oferta ao bispo de Angra, D. José Pegado de Azevedo, de visita à ilha do Faial. Este queijo terá sido descarregado no porto do Faial em padiola, às costas de quatro homens (Uniqueijo, 2011).

Mais recentemente, no século XX, o médico veterinário Dr. Patrick Keating (Horta, 1915 – Porto, 2011), açoriano de ascendência irlandesa, especializado em Lacticínios pelo Instituto Rosell, Canadá, e em Lactologia, pela Universidade de Reading, Reino Unido, terá tido uma grande influência no fabrico do queijo em São Jorge, com a introdução do aquecimento das cubas de fabrico, processo que contribuiu para uma maior acidificação da massa e melhor conservação do queijo, em curas prolongadas. Esta modificação terá aproximado a textura e o tipo de queijo até aí fabricado –a frio” ao queijo Cheddar inglês.

Por volta de 1870, transformava-se em São Jorge um volume de cerca de 4 milhões de litros de leite e cerca de 340 toneladas de queijo e 60 toneladas de manteiga (Souza, 1887; citado por Kongo, 2010). Os fabricantes e os produtores de leite estabeleciam os preços a pagar por –canada” de leite, mediante contrato anual.

No início do século XX existiam mais de 84 “fábricas” (cooperativas) de queijo São Jorge, e, em 1937, contabilizavam-se ainda 40 unidades de transformação. A proliferação de unidades de produção de queijo em São Jorge foi tal que causou uma escassez de leite para consumo na ilha, resultando na subida de preço do leite e das pastagens, o que levou as autoridades locais a promulgarem um acórdão obrigando os produtores à venda de leite para consumo directo (Avellar, 1902; citado por Kongo, 2010).

No início do século XX, a indústria local adaptou-se com a aquisição de maquinaria considerada moderna para o tempo. Esta adaptação reabilitou a indústria local, surgindo novas unidades que fabricavam queijos de boa qualidade e muito apreciados no mercado de Lisboa. Em 2000, contabilizavam-se na ilha apenas nove Cooperativas de produção de queijo, sendo estas as Cooperativas do Topo, Lourais, Norte Pequeno, Norte Grande, Santo António, Beira, Rosais, Manadas e Santo Amaro.

A importância da actividade queijeira em São Jorge e a sua manutenção até aos nossos dias implicou o desenvolvimento do movimento cooperativo - um dos mais antigos do país (a Cooperativa da Beira foi fundada em 1927). Este desenvolvimento culminou na década de 80 com a formação da UNIQUEIJO, União de Cooperativas de São Jorge, levando à redução do número de fábricas. Em 2004, foi criada a LactAçores - empresa constituída por uniões de cooperativas de lacticínios de S. Miguel, S. Jorge e Faial (UNILEITE, UNIQUEIJO e CALF) - que tem como objectivo primeiro a comercialização dos produtos lácteos transformados pelas suas fábricas. Em 2006, por decisão do executivo regional, estipulou-se a redução do número de cooperativas em São Jorge para três: UNIQUEIJO (zona Oeste da ilha); LOURAIS (centro da ilha); e FINISTERRA (zona este da ilha).

O Queijo São Jorge ostenta a distinção DOP (Denominação de Origem Protegida) que foi oficialmente reconhecida e estabelecida desde 1986 e as suas características estão descritas no Decreto Regulamentar Regional n.º 24/86/A, de 9 de Julho.

2.2. Qualidade microbiológica do leite para o fabrico de queijo

A qualidade higiénica do leite é um elemento fundamental da confiança associada pelo consumidor aos produtos lácteos. A qualidade do leite é multidimensional e não simples, requerendo da parte do produtor uma compreensão de todo o sistema de produção.

Um leite obtido de uma vaca saudável e directamente do interior do seu úbere é estéril. A existência de mamites, o contacto do leite com o equipamento e com as mãos do ordenhador, e a presença de bactérias no canal e exterior do teto, torna possível a contaminação do leite, mesmo quando se ordenha em condições máximas de limpeza. O canal e a pele do teto, o ar do estábulo ou a sala de ordenha e os quartos com mamites, contribuem no máximo com 10% da carga microbiana inicial do leite. Os restantes 90% têm origem nos equipamentos de ordenha e no vasilhame. Esta carga inicial de germes é um factor importante para a produção de leite de máxima qualidade.

A regulamentação higiénica e sanitária actualmente em vigor no sector dos lacticínios resulta da transcrição para o direito português das normas comunitárias (Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004). A indústria não deve transformar leite cuja contagem de células somáticas (CCS) e a contagem de microrganismos totais excedam, respectivamente, 400.000 cs/mL e 100.000 ufc/mL para o leite de vaca cru, e 1.500.000 ufc/mL para o leite de outras espécies (sem tratamento térmico). Caso o leite destas últimas se destine ao fabrico em cru, o limite reduz-se para 500.000 ufc/mL.

Para além disso, nos termos do Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, no caso do leite destinado ao fabrico de queijos com leite cru, devem observar-se os seguintes critérios relativos aos Estafilococos coagulase positivos: $m = 10^4$ ufc/g; $M = 10^5$ ufc/g; $n = 5$; e $c = 2$. Em que, m = número limiar de bactérias; M = número máximo de bactérias admissível; c = número de unidades da amostra em que é admissível que se ultrapasse o valor de m mas não de M e n = número de unidades que compõem a amostra.

As bactérias que aparecem no leite têm origem principalmente na superfície do úbere e dos tetos; no leite das vacas com mamites; nas superfícies do equipamento da ordenha, das bilhas ou dos tanques; e no ar (pouco). Para que se verifiquem baixas contagens de bactérias no leite contribuem vários factores como a higiene da ordenha, particularmente a secagem dos tetos com toalha individual; a higiene do estábulo, especialmente das camas; a limpeza das vacas; a higiene do equipamento de ordenha, particularmente das tetinas e outras borrachas, do lactoduto, dos pulsadores, da linha de vácuo e do tanque de reserva de vácuo; o método de ordenha; a filtração do leite; e a limpeza do tanque de refrigeração. Para diminuir a contaminação a partir do úbere e dos tetos, devem manter-se as vacas, entre as ordenhas, num local limpo (Blowey e

Edmondson, 2010). Neste aspecto, os animais criados nos Açores são privilegiados, uma vez que são mantidos em condições naturais, na pastagem. A selecção para úberes bem conformados, uma tosquia dos úberes uma vez por ano após o parto, e a limpeza e desinfecção do teto antes de cada ordenha, com uma simples toalha de papel, individual, ligeiramente humedecida com água e desinfectante para os tetos, poderiam ainda ajudar a controlar os microrganismos com esta origem.

2.3. As Mamites como Factores determinantes para a Qualidade do leite

As mamites são uma grande preocupação para os produtores de leite e para a indústria de alimentos em todo o mundo, por razões de rentabilidade agrícola, qualidade dos alimentos, sanidade animal e saúde pública (Zadoks, 2002). As mamites são a causa mais comum de doença infecciosa que afecta as vacas leiteiras e continua a ser a doença de maior importância económica nas indústrias de lacticínios em todo o Mundo (Gillespie e Oliver, 2005). O termo mamite tem as suas raízes na palavra grega “~~m~~mastos” que significa mama (glândula mamária) (Matos, 1988).

As mamites bovinas são definidas como uma inflamação do tecido da glândula mamária, geralmente em resposta a uma infecção microbiana no úbere (Matos, 1988; Bradley, 2002; Zadoks, 2002).

A inflamação do úbere bovino é geralmente causada por uma infecção, principalmente por bactérias, mas também pode ser o resultado de uma inflamação estéril devido a agentes químicos, trauma físico ou mecânico. As infecções intramamárias podem ser acompanhadas por sinais visíveis, como coagulação e descoloração do leite, inchaço e descoloração do úbere, febre, anorexia e até mesmo a morte. Quando os sinais são perceptíveis a olho nu, a infecção causa mamite clínica. Quando não há sinais visíveis, a presença do patógeno resulta em mamite subclínica, e técnicas de laboratório, como a CCS e a cultura bacteriológica, de amostras de leite de cada quarto, são necessárias para detectar a infecção. As mamites subclínicas são caracterizadas pela redução da secreção de leite e pela alteração da composição do leite (Harmon, 1994; Zadoks, 2002). A mamite clínica pode ser dividida em três tipos: superaguda, aguda e crónica (Matos, 1988).

As mamites subclínicas têm maior importância económica do que as mamites clínicas, pelo facto de serem mais numerosas (Matos, 1988).

Os principais factores relacionados com a alteração dos componentes do leite são as lesões das células epiteliais secretoras de leite, que podem resultar em alterações

da concentração de lactose, proteína e gordura; e aumento da permeabilidade vascular, que determina o aumento da passagem de substâncias do sangue para o leite, tais como sódio, cloro, imunoglobulinas e outras proteínas séricas (Steffert, 1993; citado por Cunha *et al.*, 2008).

As mamites resultam em danos nos tecidos e diminuição da capacidade de síntese do complexo enzimático das células secretoras, pelo que a biossíntese de lactose também é reduzida. A concentração de lactose no leite pode ser usada como um indicador da mamite, uma vez que esta diminui claramente durante a inflamação (Pyörälä, 2003).

Durante as mamites é comum observar-se um aumento no número de células somáticas (neutrófilos) no leite (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007). A CCS é um indicador da intensidade da defesa celular imunológica. O leite proveniente de úberes saudáveis exibe uma contagem celular fisiológica basal que varia entre 50.000 a 200.000 células/mL de leite, dependendo da idade da vaca. Vacas com mamites subclínicas podem excretar até alguns milhões de células por mililitro, mas a excreção comumente varia de 200.000 a 500.000 células/mL (Urech *et al.*, 1998).

2.3.1. Células Somáticas

As células somáticas (do grego "soma" = corpo) são células provenientes do organismo da vaca definindo-se por oposição à presença eventual no leite de células estranhas ao animal (Serieys, 1985). Este grupo de células é composto principalmente por leucócitos, chamados glóbulos brancos do sangue, que incluem os macrófagos, os linfócitos e os neutrófilos (PMNs). As células epiteliais encontram-se presentes em menor número (Bradley, 2002) (Quadro 1).

Quadro 1. Tipos de células somáticas (%) num úbere são e num úbere com mamites (x1.000).

	Úbere são	Úbere com mamites
PMNs	3-26	40-98
Linfócitos	10-24	2-5
Eosinófilos	0-1	
Macrófagos	35-79	
Células Epiteliais	2-15	

(Lee *et al.*, 1980; Miller *et al.*, 1993; Paape *et al.*, 2002a,b; Mehrzad *et al.*, 2010)

Na glândula mamária saudável as células somáticas não ultrapassam as 200.000 por mL, sendo os macrófagos o tipo celular predominante, bem como alguns linfócitos. Por outro lado, os neutrófilos e as células epiteliais encontram-se em menor número. Ocorrendo uma infecção, esta relação altera-se radicalmente, passando os neutrófilos (PMNs) a serem as células representadas em maioria podendo atingir mesmo os 100%. Esta transição pode ocorrer em apenas algumas horas (Persson *et al.*, 1992). O afluxo de neutrófilos PMNs ao leite é demonstrativo da infecção da glândula mamária. A contagem global e indiferenciada do conjunto destas células, qualquer que seja o seu tipo, constitui uma medida suficiente e muito mais fácil de determinar (Serieys, 1985).

As células somáticas não são a causa das mamites, mas são a resposta defensiva necessária contra a presença de micróbios na glândula mamária. O leite da glândula mamária saudável, não infectada, contém sempre algumas células somáticas, embora em pequeno número. Um estudo efectuado por Eberhart *et al.*, (1979) indica que 50% das vacas sãs têm contagens inferiores a 100.000 cs/mL e 80% menos de 200.000 cs/mL. A facilidade com que estas células podem ser contadas electronicamente (através de aparelhos como o Fossomatic, o Coulter Counter, etc.), faz delas um parâmetro muito utilizado para o pagamento do leite em muitos países.

As bactérias que causam uma maior elevação da CCS são as bactérias mais virulentas, chamadas agentes patogénicos maiores: *S. aureus*, Coliformes, Estreptococos (*S. agalactiae*, *S. uberis*, *S. dysgalactie*) e Enterococos (*E. faecium* e *faecalis*). Os agentes patogénicos menores, *Corynebacterium bovis* e alguns *Staphylococcus* Coag⁺, provocam um aumento negligenciável da contagem das células somáticas (Harmon e Langlois, 1986; Hillerton e Berry, 2005).

Uma correcta interpretação do resultado global da contagem de células somáticas totais (CCST) num rebanho, assim como a contagem de células somáticas individuais na vaca (CCSI) e a contagem de células somáticas individuais de cada quarto (CCSIQ), facilitam uma avaliação epidemiológica das infecções do úbere, focando-se a atenção na causa mais provável da existência de um problema, ou problemas, de mamites num rebanho. A combinação da CCS com culturas bacteriológicas e observações de campo resultam na formulação de medidas específicas para cada rebanho (Reneau, 1985).

O aumento da CCS tem uma correlação negativa com a produção de leite (hipogalactia) (Quadro 2) (Ward e Schultz, 1972; Raubertas e Shook, 1982; Fox *et al.*, 1985; Fetrow *et al.*, 1988).

Quadro 2. Correlação negativa entre a CCST e a produção de leite dos rebanhos leiteiros (CCST X 1.000) (Adaptado de Harmon, 1994).

CCST	% Quartos Infectados	% Perca de Produção
200	6	0
500	16	6
1000	32	18
1500	48	29

A correlação entre a CCS e a percentagem de quartos infectados num rebanho não é muito elevada ($r = 0.64$), razão pela qual este parâmetro não deverá ser utilizado como critério de decisão único para o tratamento. Alguns estudos suportam a ideia de que a redução na produção se deve ao dano feito ao epitélio mamário, pelos neutrófilos em migração, enquanto que outros estudos sugerem que outros mecanismos fisiológicos da inflamação possam estar envolvidos (Shuster *et al.*, 1991a,b). A injeção de endotoxina provoca a quebra de produção em quartos tratados (inflamados) e não tratados (não inflamados), o mesmo acontecendo quando se faz a injeção da endotoxina intravenosamente, sugerindo uma justificação sistémica para a perca de produção. Os mesmos autores descobriram que as vacas tornadas parcialmente refractárias recuperavam rapidamente a produção de leite após tratamento com endotoxina, mesmo na presença de um influxo intenso de leucócitos nos quartos tratados (Shuster *et al.*, 1991a,b).

As CCS são mais elevadas no Verão, coincidindo com um aumento do número de infecções que ocorrem neste período. O cio não tem qualquer efeito sobre a CCS (Paape *et al.*, 1973; Guidry *et al.*, 1975; Smith *et al.*, 1985; Hogan *et al.*, 1989; citados por Matos, 1988).

O leite rico em células somáticas contém teores muito elevados de plasmina, uma enzima responsável pela degradação, menor qualidade e rendimento dos lacticínios (Matos, 1988). As alterações da composição do leite devido às mamites são múltiplas como se observa no Quadro 3.

Quadro 3. Síntese dos efeitos negativos associados à elevada CCS e às alterações da composição do leite.

↓	Gordura	↑	Proteína do Soro
↓	Lactose	↑	Imunoglobulinas
↓	Ponto de Congelação	↑	Sódio
↓	Caseína Total	↑	Cloro
↓	Potássio	↑	Lactoferrina
↓	Cálcio		
↓	Magnésio		
↓	Fósforo		

(Matos, 1988; Harmon, 1994; Pyörälä, 2003; Batavani *et al.*, 2007)

O controlo das mamites deve ser feito através do uso sistemático de pelo menos 5 medidas de controlo: desinfecção dos tetos após a ordenha, tratamento de secagem, tratamento imediato das mamites clínicas, reforma de vacas com mamites crónicas e manutenção e um bom funcionamento da máquina de ordenha (Blowey e Edmonson 2010).

2.3.2. Etiologia das mamites

Microrganismos tão diversos como bactérias, fungos, micoplasma e algas têm sido implicados como causas da mamite (Bradley, 2002). Watts (1988) identificou 137 espécies microbianas causadoras desta doença e, segundo a literatura científica actual existem cerca de 200 microrganismos diferentes (Blowey e Edmondson, 2010).

Existem dois tipos básicos de mamites: a contagiosa, causada por patógenos contagiosos, e a ambiental, causada por patógenos ambientais. Os patógenos contagiosos podem ser considerados como organismos adaptados para sobreviver dentro do hospedeiro, em particular na glândula mamária, e são capazes de estabelecer infecções subclínicas, que se manifestam tipicamente com elevação na CCS no leite. Pelo contrário, os patógenos ambientais são descritos como invasores oportunistas da glândula mamária, não adaptados para a sobrevivência dentro do hospedeiro, uma vez que ao “invadirem” e se multiplicarem, ocorre uma resposta imunitária que os elimina rapidamente. Os maiores patógenos contagiosos são o *S. aureus*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae*, enquanto que os maiores patógenos ambientais compreendem a *Escherichia coli* e o *Streptococcus uberis*. Dentro dos patógenos contagiosos também se encontram os *Staphylococcus coagulase-negativos*,

Corynebacterium bovis e *Mycoplasma*. Relativamente aos patógenos ambientais, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Pasteurella*, *Streptococcus faecalis*, fungos, leveduras e outros coliformes como *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas aeruginosa* são outros dos microrganismos causadores das mamites (Bradley, 2002; Blowey e Edmondson, 2010).

2.4. *Staphylococcus aureus*

O género *Staphylococcus* é formado, actualmente, por 32 espécies. Destas, o *S. aureus* é a mais relacionada a casos e a surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade de produção de enterotoxinas pela maioria das suas estirpes (Gandra, 2003). O habitat principal dos estafilococos é a pele, as glândulas da pele e as membranas mucosas dos animais de sangue quente. Várias espécies estão associadas a determinados hospedeiros, por exemplo o *S. hyicus* com porcos, e o *S. gallinarum* com galinhas, mas, o *S. aureus* é mais generalizado, ocorrendo mais frequentemente na pele dos primatas superiores. Nos seres humanos, é particularmente associado com o trato nasal, onde é encontrado em 30-50% dos indivíduos saudáveis (Wong e Bergdoll, 2002; Loir *et al.*, 2003; Adams e Moss, 2008). Pode ser encontrado nas fezes e, esporadicamente, a partir de uma vasta gama de outros locais ambientais, como nas superfícies de plantas, poeira e ar (Adams e Moss, 2008).

O *S. aureus* foi descoberto na década de 80, do século XIX e, desde essa data, tem sido apontado como patogénico (Deurenberg e Stobberingh, 2008). Os *S. aureus* são Gram-positivos, são cocos com forma esférica a ovóide, com diâmetro variando entre 0,5 e 1,5 µm, são imóveis e não formadores de esporos (Gandra, 2003; Adams e Moss, 2008). A divisão celular ocorre em mais do que um plano, de modo a que formem grupos lembrando cachos de uvas (Adams e Moss, 2008). Entre as características morfo-fisiológicas do *S. aureus*, destacam-se as seguintes: coagulase positivos, β-hemolíticos, maltose e manitol positivos e formadores de colónias pigmentadas (Jay, 1994).

Os estafilococos são catalase positivos, oxidase-negativos e anaeróbios facultativos (Bhatia e Zahoor, 2007; Adams e Moss, 2008). A sua capacidade de fermentar a glicose pode ser usada para distingui-los do género *Micrococcus* estritamente aeróbios, embora existam espécies em ambos os géneros em que esta distinção não é clara, devido à baixa produção de ácido por alguns estafilococos e produção de pequenas quantidades de ácido, em condições anaeróbias por alguns

micrococos. A produção de enterotoxinas é adversamente afectada por condições anaeróbias muito mais do que o crescimento (Adams e Moss, 2008).

O *S. aureus* é um mesófilo típico, com uma faixa de temperatura de crescimento entre os 7 e os 48 °C e uma temperatura óptima a 37 °C (Bhatia e Zahoor, 2007). As enterotoxinas estafilocócicas, por outro lado, são produzidas entre 10 e 46 °C, com uma temperatura óptima a 35 - 40 °C (Smith *et al.*, 1983; Adams e Moss, 2008) e apresentam elevada resistência térmica, podendo sobreviver aos tratamentos térmicos comumente aplicados ao leite, como a pasteurização (Fagundes e Oliveira, 2004). Relativamente ao pH, é capaz de crescer numa vasta gama de pH de 4,2 a 9,3, com um óptimo desenvolvimento a 7 - 7,5 (Bhatia e Zahoor, 2007).

Uma característica do *S. aureus*, que constitui um aspecto particularmente importante em alguns alimentos, é a sua tolerância ao sal (NaCl), crescendo rapidamente em meios contendo 5-7% de NaCl, sendo algumas estirpes capazes de crescer em até 15-20% de NaCl, o que faz com que os alimentos curados também sejam veículos potenciais de intoxicação (Wong e Bergdoll, 2002; Bhatia e Zahoor, 2007; Adams e Moss, 2008).

Quanto à actividade da água (a_w), os estafilococos são únicos na sua capacidade de se multiplicarem em alimentos com valores de actividade da água inferiores aos normalmente considerados mínimos para outras bactérias halófilas. O valor mínimo de a_w para o crescimento é 0,86, apesar de já ter sido relatada a multiplicação desses microrganismos em alimentos com a_w de 0,83 (Wong e Bergdoll, 2002; Pereira, 2006; Adams e Moss, 2008). Mais uma vez, o intervalo em que ocorre a produção de enterotoxinas é mais limitado, com um a_w mínimo registado de 0,86. Embora, normalmente o *S. aureus* seja uma bactéria inofensiva, quando na superfície do corpo humano, onde desempenha um papel útil, metabolizando produtos para a pele e, eventualmente, prevenindo a colonização da pele por micróbios patogénicos, pode causar abscessos menores da pele, tais como furúnculos e, de um modo mais grave, pode actuar como um patógeno oportunista, quando a barreira da pele é violada ou a resistência do hospedeiro é baixa (Adams e Moss, 2008).

A versatilidade nutricional e a capacidade de crescer em diferentes condições ambientais fazem com que o *S. aureus* se desenvolva com facilidade em vários alimentos (Loir *et al.*, 2003).

2.4.1. Mamite causada por *S. aureus*

A maior causa das mamites bovinas resulta da infecção do úbere por bactérias patogénicas (Phuektes *et al.*, 2001) e estas constituem a principal fonte de contaminação do leite com estes agentes. O *S. aureus* representa o maior agente causador de mamites contagiosas nos bovinos (Fox e Gay, 1993; Peles *et al.*, 2007). Há cerca de 40 anos atrás, o *S. aureus* infectava mais de 50% das vacas leiteiras (Hillerton e Berry, 2005).

As infecções intramamárias causadas por *S. aureus*, e também por outras espécies bacterianas, são devidas à entrada das bactérias através do canal do teto para a glândula mamária. Um quarto do úbere da vaca é geralmente infectado independentemente dos outros três (Sutra e Poutrel, 1994).

A presença de lesões na pele do teto, como fissuras, permite a colonização persistente da pele por *S. aureus* (Sutra e Poutrel, 1994). Os principais reservatórios do *S. aureus* nas vacas são úberes infectados, canais do teto, lesões e pele do teto, focinho e narinas (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010). Como o *S. aureus* está principalmente localizado no úbere, a transmissão de bactérias de teto para teto na mesma vaca ou de uma vaca para outra, normalmente ocorre durante a ordenha (Sutra e Poutrel, 1994). Os principais vectores de transmissão são as mãos dos ordenhadores, os panos usados para lavar e secar o úbere, os copos de ordenha, moscas e o leite contaminado que pode fluir para volta do teto durante a ordenha, como consequência de variações bruscas de vácuo na máquina de ordenha (Bramley e Todd, 1984; citado por Sutra e Poutrel, 1994; Petersson-Wolfe *et al.*, 2010).

O *S. aureus* pode ter acesso ao leite tanto pela excreção directa das glândulas mamárias com mamite estafilocócica clínica ou subclínica, como por contaminação do meio ambiente durante a manipulação e transformação de leite cru (Scherrer *et al.*, 2004; Jørgensen *et al.*, 2005).

O reservatório primário do *S. aureus* é dentro da glândula mamária. Os estafilococos são notoriamente difíceis de tratar, uma vez que, quando a infecção já está estabelecida, torna-se extremamente difícil a sua eliminação. O tratamento de infecções primárias em novilhas pode resultar numa melhor taxa de resposta, porém, vacas mais velhas cronicamente infectadas podem ter taxas de cura bacteriológicas tão baixas quanto 10%. As razões que levam a uma baixa eficácia no tratamento prendem-se com o facto de que, quando os estafilococos já se encontram estabelecidos no úbere, ocorrer a formação de uma barreira de tecido fibroso que permite uma baixa penetração dos antibióticos; e do *S. aureus* ser capaz de sobreviver dentro dos macrófagos, leucócitos e

células epiteliais, estando assim fora do alcance dos antibióticos. Quando os neutrófilos morrem (normalmente em 1 ou 2 dias), a bactéria é libertada para retomar o processo de infecção. Os antibióticos podem circular dentro dos fluidos corporais, mas na sua maioria, são incapazes de penetrar as células. Estes factores também explicam, em parte, as CCS e as taxas de excreção bacteriana muito variáveis, em vacas cronicamente infectadas com *S. aureus*. Por outro lado, devido à excreção intermitente e excreção em número reduzido, apenas cerca de um terço das amostras de leite de vacas efectivamente infectadas evidenciam culturas positivas. As pobres respostas ao tratamento também enfatizam a importância das medidas profiláticas, assegurando que as vacas não sejam infectadas (Blowey e Edmondson, 2010; Petersson-Wolfe *et al.*, 2010).

O *S. aureus* produz toxinas que destroem as membranas celulares e podem danificar directamente os tecidos produtores de leite. Os leucócitos são atraídos para o local da infecção, onde a tentam travar. Inicialmente, as bactérias danificam os tecidos de revestimento dos tetos e as glândulas, que eventualmente levam à formação de tecido cicatricial (Figura 1). A bactéria, em seguida, desloca-se para o sistema de ductos e estabelece bolsas de infecção profundas nas células secretoras de leite (alvéolos). Posteriormente, formam-se abscessos que constituem uma barreira para prevenir a propagação, mas permitem à bactéria evitar a detecção pelo sistema imune. Os abscessos previnem que os antibióticos cheguem às células e são a principal razão pela qual a resposta ao tratamento é fraca (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010).

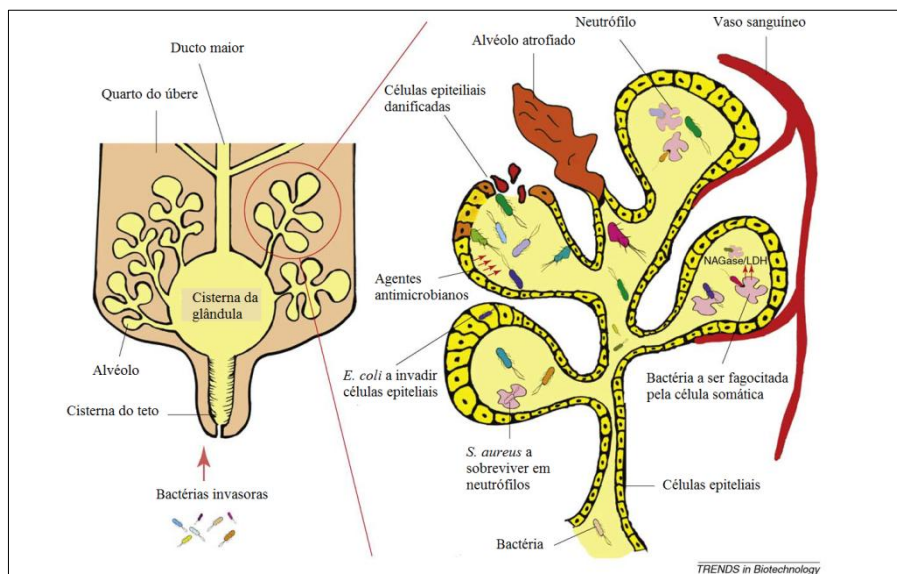


Figura 1. Representação esquemática do desenvolvimento da mastite num úbere infectado (adaptado de Viguier *et al.*, 2009).

Durante a infecção, a destruição das células alveolares e dos ductos reduz a produção de leite. Estas células danificadas podem combinar-se com os leucócitos e obstruir os ductos de leite que drenam as áreas alveolares, contribuindo para uma maior formação de tecido cicatricial, oclusão dos ductos, e diminuição da produção de leite. Os ductos podem reabrir num momento posterior, mas isto resulta numa libertação de *S. aureus* para outros locais da glândula mamária. A disseminação de *S. aureus* dentro da glândula resulta na formação adicional de abscessos que podem tornar-se muito grandes e detectáveis como caroços dentro do úbere (Petersson-Wolfe *et al.*, 2010).

2.4.2. Outras fontes de contaminação por *S. aureus* durante o processo de fabrico de queijos

A manipulação do leite e queijo pelos queijeiros, o equipamento e o ambiente envolvente são algumas das fontes de contaminação do leite por *S. aureus* durante o processo de fabrico (Jørgensen *et al.*, 2005; André *et al.*, 2008).

Num estudo efectuado por Assumpção *et al.*, (2003), a contaminação por *S. aureus* no queijo Prato foi provavelmente causada pelos queijeiros, devido às elevadas contagens de *S. aureus* nas mãos e antebraços dos mesmos. A não utilização de luvas ou a higienização inadequada das mãos e antebraços podem ter sido os motivos das elevadas contagens.

2.4.3. Factores de virulência

A capacidade do *S. aureus* interferir com as defesas bovinas resulta da acção múltipla de factores de virulência, que incluem a superfície de moléculas, hemolisinas, enzimas e um grupo de exotoxinas superantigénicas (SAg) (Honeyman *et al.*, 2001).

A patogenicidade do *S. aureus* no úbere bovino não está totalmente compreendida, mas o número e as combinações de exotoxinas estafilocócicas secretadas podem ser importantes contribuintes para o potencial patogénico (Haveri *et al.*, 2007).

Os factores de virulência do *S. aureus* podem ser agrupados de acordo com os componentes da parede celular, componentes superficiais da célula e produtos extracelulares (Matos, 1988).

2.4.3.1. Componentes da parede celular

A parede celular tem que suportar a enorme pressão interna para evitar a lise da célula bacteriana. No entanto, as células também devem crescer e, para que isso ocorra,

a parede celular deve ampliar, processo este que requer várias enzimas. As enzimas denominadas autolisinas quebram as ligações cruzadas na teia da parede celular e as enzimas transpeptidases ampliam a parede celular e fecham-na. Uma das formas clássicas em que os antibióticos matam bactérias é na interferência no processo de construção de novas paredes celulares (Freeman-Cook, 2006).

A maioria das amostras de *S. aureus* apresenta ancorada à parede celular uma estrutura proteica denominada proteína A (SpA) e proteínas A livres, que são secretadas para fora da célula (Freeman-Cook, 2006). A SpA é a maior proteína na superfície do *S. aureus* (O'Seaghda *et al.*, 2006). Esta proteína possui a capacidade de se ligar à porção Fc de muitas subclasses de IgG, observando-se posteriormente a sua interação com outras imunoglobulinas não-específicas, além de outros componentes do hospedeiro, o que torna a bactéria mais resistente à acção fagocítica (Hartleib *et al.*, 2000). A SpA liga-se às imunoglobulinas (Figura 2) e faz com que estas se agreguem e se vinculem ao complemento. Isto esgota tanto as imunoglobulinas como o complemento, o que impede a sua ligação às bactérias evitando a fagocitose. A proteína A secretada também se liga a quaisquer anticorpos que já estejam vinculados à bactéria, funcionando como camuflagem para esconder eficazmente a bactéria de outros anticorpos e das células fagocitárias (Freeman-Cook, 2006).

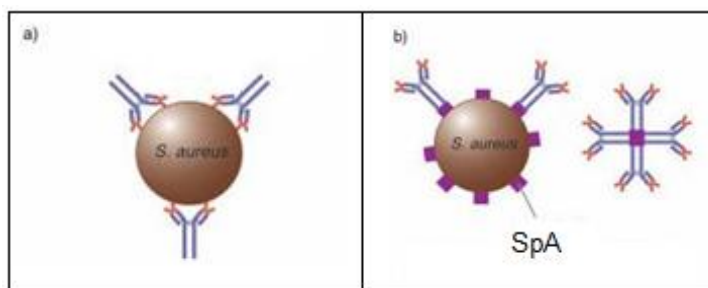


Figura 2. Acção da SpA. As bactérias sem SpA são correctamente reconhecidas por anticorpos (a). A SpA na superfície da célula bacteriana (b) faz com que os anticorpos se liguem às bactérias na orientação errada, impedindo que os leucócitos reconheçam e destruam as bactérias. As bactérias também secretam SpA, que pode ligar-se a anticorpos causando aglutinação (Freeman-Cook, 2006).

A proteína A também se liga directamente às células produtoras de anticorpos B, fazendo com que cometam suicídio celular (apoptose). Isto impede não só a produção de anticorpos específicos, mas também a formação de células memória que trabalhem para evitar a re-infecção (Freeman-Cook, 2006). No entanto, quando as IgG não estão presentes, a proteína A da parede celular pode activar o sistema complemento na

superfície bacteriana e por conseguinte promover a opsonização (Peterson *et al.*, 1977).

2.4.3.2. Componentes superficiais da célula

Durante a infecção intramamária por *S. aureus*, os componentes da superfície celular participam na adesão bacteriana aos tecidos da glândula mamária do hospedeiro e na resistência à fagocitose pelas células do leite (Sutra e Poutrel, 1994).

Um dos componentes superficiais celulares associado a factores de virulência é a cápsula (Honeyman *et al.*, 2001). A cápsula, apresentada por algumas estirpes de *S. aureus*, é uma camada polissacarídica mais estável e está intimamente associada com a célula bacteriana (Silva *et al.*, 2007). A maioria dos isolados clínicos de *S. aureus* produz cápsula polissacarídica, tendo sido identificados 11 serotipos. De acordo com a morfologia da colónia, as cápsulas podem ser divididas em dois grupos distintos. As cápsulas serotipo 1 e 2 são classificadas como cápsulas tipo mucóide porque as suas estirpes produtoras são fortemente encapsuladas e são mucosas em meio sólido. As cápsulas serotipo 3 à 11 são classificadas como microcápsulas porque as estirpes com estas cápsulas têm uma fina camada capsular e formam colónias não mucóides em meio sólido (Honeyman *et al.*, 2001). A cápsula resiste às defesas imunológicas do hospedeiro prejudicando a fagocitose. A natureza química da cápsula parece prevenir a célula fagocítica de aderir à bactéria (Tortora *et al.*, 2010).

O peptidoglicano pode ajudar a desencadear respostas inflamatórias e imobilizar leucócitos no foco da infecção (Hirsh e Zee, 1999).

2.4.3.3. Produtos extracelulares

Depois de o *S. aureus* penetrar na glândula, as exosecreções bacterianas são potencialmente responsáveis pela gravidade da doença (Leitner *et al.*, 2003). O *S. aureus* é capaz ainda de produzir uma série de enzimas e toxinas extracelulares. Quase todas as estirpes secretam citotoxinas que incluem quatro hemolisinas (α , β , γ e δ) e um grupo de enzimas que incluem nucleases, coagulases, catalases, proteases, lipases (ex. lecitinase), hialuronidase, fosfatase, estafiloquinas e colagenases. A sua principal função é poder converter tecidos locais do hospedeiro em nutrientes necessários para o crescimento bacteriano (Sutra e Poutrel, 1994; Dinges *et al.*, 2000). De entre as enzimas produzidas, a coagulase é a mais conhecida. As coagulases são enzimas bacterianas que induzem a polimerização de fibrinogénio em fibrina (Ikawaty *et al.*, 2010; Tortora *et al.*, 2010). O fibrinogénio, proteína plasmática produzida pelo fígado, é convertido pela

coagula-se em fibrina, formando um coágulo de sangue. O coágulo de fibrina, ao redor da célula bacteriana, protege a bactéria da fagocitose e isola-a de outras defesas do hospedeiro, dificultando a acção dos mecanismos de defesa (Prescott *et al.*, 2002; Tortora *et al.*, 2010). A lecitinase é uma enzima que normalmente actua na membrana da célula animal pela sua inserção na membrana (formando um poro que resulta em lise celular) ou por ataque enzimático nos fosfolípidos, o que destabiliza a membrana (Todar, 2011).

As hemolisinas α e β são as mais importantes na patogénese das infecções intramamárias (Park *et al.*, 2004). A hemolisina α é tóxica para uma ampla gama de células dos mamíferos: é particularmente activa contra eritrócitos, provocando a sua lise; também é dermonecrótica e neurotóxica (Dinges *et al.*, 2000); e promove a desregulação na transmissão de iões através da membrana de diversos tipos de células (Bhakdi e Tranum-Jensen, 1991). A β -hemolisina hidrolisa a esfingomiéline presente na membrana plasmática das células da glândula mamária da maioria dos mamíferos, resultando num aumento da permeabilidade (Graves *et al.*, 2007). Além disso, a hidrólise da esfingomiéline pode tornar as células mais susceptíveis à acção da α -hemolisina (Coelho *et al.*, 2009). A actividade da hemolisina β requer a presença de Mg^{2+} (Dinges *et al.*, 2000).

O *S. aureus* produz e secreta uma grande variedade de exoproteínas que apresentam actividade superantigénica (SAg), sendo estas pertencentes a uma família de toxinas pirogénicas. Estas induzem a activação anormal de linfócitos T e contribuem para a capacidade de colonizar e causar doença em hospedeiros mamíferos (Dinges *et al.*, 2000; Leitner *et al.*, 2003).

Algumas estirpes produzem uma ou mais exoproteínas adicionais, que incluem a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1), as enterotoxinas estafilocócicas A até à E, as toxinas esfoliativas e a leucocidina. Cada uma dessas toxinas é conhecida por ter grandes efeitos em células do sistema imunológico, mas muitas delas têm também outros efeitos biológicos. A sua principal função *in vivo* pode ser a de inibir as respostas imunes do hospedeiro para o *S. aureus*. A TSST-1 e as enterotoxinas estafilocócicas são também conhecidas como toxinas pirogénicas superantigénicas (Dinges *et al.*, 2000).

A leucocidina apresenta acção destrutiva direccionada a neutrófilos e macrófagos, pela alteração da permeabilidade da membrana, permitindo que os *S. aureus* escapem ilesos da fagocitose (Hirsh e Zee, 1999; Dinges *et al.*, 2000).

2.4.4. Enterotoxinas estafilocócicas (SEs)

O *S. aureus* é considerado a terceira causa mais importante de doença no mundo entre os relatos de doenças transmitidas por alimentos (Normanno *et al.*, 2005; Boerema *et al.*, 2006). A presença de *S. aureus* nos alimentos relaciona-se, muitas vezes, com a manipulação indevida por parte do pessoal (Hatakka *et al.*, 2000; citado por André *et al.*, 2008). O crescimento de *S. aureus* nos alimentos representa um potencial risco de saúde pública porque muitas estirpes de *S. aureus* produzem enterotoxinas, que causam intoxicações alimentares, se ingeridas (Akineden *et al.*, 2001; Boerema *et al.*, 2006; Bhatia e Zahoor, 2007). O leite e produtos lácteos têm sido frequentemente implicados em intoxicações alimentares estafilocócicas e o leite cru contaminado está frequentemente envolvido (De Buyser *et al.*, 2001).

As enterotoxinas estafilocócicas são divididas em diversos tipos: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, TSST-1, SEG, SEH, SEI e SEJ e, com base nas diferenças sorológicas, a enterotoxina C é subdividida em SEC₁, SEC₂ e SEC₃ (Kenny *et al.*, 1993; Balaban e Rasooly, 2000).

Alguns *S. aureus* isolados de leite bovino transportam diferentes SEs que contribuem para a persistência de *S. aureus* na glândula mamária e aumentam a patogenicidade no úbere (Kenny *et al.*, 1993; Ferens *et al.*, 1998). As SEs são uma família de exoproteínas que formam uma cadeia única com um peso molecular variando de 26,000 a 29,000 Da (Balaban e Rasooly, 2000; Normanno *et al.*, 2005).

A enterotoxina A, relacionada com maior ênfase nos casos de toxinfecções alimentares, pode ser veiculada pelo leite cru, pasteurizado e subprodutos lácteos. A síndrome do choque tóxico é causada mais frequentemente pela TSST-1, porém as enterotoxinas do tipo B e C também podem estar implicadas (Sá *et al.*, 2004).

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos contendo uma ou mais enterotoxinas (Bhatia e Zahoor, 2007). Os tipos de toxina A e D, isoladamente ou em combinação, são mais frequentemente implicados em surtos de intoxicação alimentar. No Reino Unido, o tipo A é responsável por 52% dos focos, o tipo D por 6%, os tipos A e D combinados por 19% e os tipos C e D combinados por 9% (Adams e Moss, 2008).

O aparecimento de sintomas de intoxicação alimentar depende da quantidade, do tipo e da toxicidade da toxina (Bhatia e Zahoor, 2007). A susceptibilidade varia entre indivíduos, mas estima-se que, em surtos, menos de 1 mg de toxina pura seja necessária para provocar os sintomas (Adams e Moss, 2008). A intoxicação alimentar por *S.*

aureus é caracterizada por um curto período de incubação, tipicamente uma a seis horas (Nema *et al.*, 2007). Os sintomas podem variar de leve, moderado a grave e incluem cólicas abdominais, náuseas, vômitos, diarreia, febre e desidratação e, em casos mais graves, a morte pode sobrevir. Em casos de desidratação severa, palidez acentuada e colapso pode-se necessitar de tratamento por infusão intravenosa (Balaban e Rasooly, 2000; Fagundes e Oliveira, 2004; Bhatia e Zahoor, 2007; Adams e Moss, 2008).

As enterotoxinas produzidas e libertadas pelos estafilococos durante a sua multiplicação nos alimentos são termoestáveis, o que indica que as temperaturas normalmente atingidas pelos alimentos durante a sua preparação culinária não interferem na sua actividade biológica, possibilitando a instalação de quadros de intoxicação alimentar no homem. As SEs são também resistentes à inactivação por proteases gastrointestinais como a pepsina, assim como pelo calor (Balaban e Rasooly, 2000).

Diversos estudos têm demonstrado que a produção de SEs em *S. aureus* isolados de mamites bovinas pode ser determinada por factores ambientais e de gestão em cada área geográfica. Esta variabilidade genética na produção de SEs contribuiu para o surgimento de distintos perfis epidemiológicos, dependentes de estirpes predominantes dentro de uma manada. Isto indica a necessidade de identificar cada estirpe ou subtipos antes de aplicar medidas específicas para o controlo de mamites (Larsen *et al.*, 2000; Stephan *et al.*, 2001; da Silva *et al.*, 2005; Moon *et al.*, 2007).

Devido à importância destas toxinas para a saúde pública e segurança alimentar, a triagem eficiente da prevalência de estirpes enterotoxigénicas na mamite bovina é essencial (Moon *et al.*, 2007).

2.5. Dinâmica da população de *S. aureus* durante o fabrico de queijos

São vários os parâmetros físico-químicos relevantes para as condições de fabrico de queijos, que afectam tanto o crescimento de *S. aureus* como a produção de enterotoxinas. Estes são, a acidificação, a quantidade de sal, a actividade da água, a temperatura, a atmosfera (aeróbia e anaeróbia) e a composição do leite e flora láctica presente. Os parâmetros físico-químicos do queijo são influenciados pela actividade bacteriana e esta, por sua vez, depende tanto das condições físico-químicas do leite (por exemplo, acidez, temperatura e salinidade), como dos nutrientes presentes (por exemplo, azoto e fontes de carbono). Uma vez que o processo de fabrico afecta os

parâmetros físico-químicos do queijo, o tipo de processamento condiciona o comportamento do *S. aureus* no queijo (Cretenet *et al.*, 2011).

A presença de grande número de bactérias do ácido láctico (BAL), a descida do pH, a concentração de sal e a temperatura de processamento são factores determinantes para o destino dos microrganismos no queijo durante o processamento e amadurecimento (Comissão Europeia, 2003). Um estudo realizado num queijo modelo fabricado com leite cru mostrou que, em geral, as BAL testadas eram mais eficazes a inibir a flora contaminante quando esta era constituída apenas por um tipo de microrganismo e que, de entre as BAL testadas o *Lactococcus lactis*, devido ao seu forte potencial acidificante, foi a mais eficaz no controlo de bactérias não desejadas, nomeadamente o *S. aureus* (Pereira *et al.*, 2009).

2.5.1. Queijo fresco

Os queijos frescos são preparados a partir de leite cru ou pasteurizado e, para a grande maioria destes queijos, a coalhada é obtida por acção do coalho e pela fermentação devido à acção de culturas de arranque ou da flora de BAL natural do leite (Comissão Europeia, 2003; Cretenet *et al.*, 2011). O pH geralmente diminui para cerca de 5 e a actividade de água é elevada ($a_w = 0,95$ a $0,97$). Após o fabrico, estes queijos são consumidos frescos, sem maturação, entre 5 e 30 dias (Comissão Europeia, 2003). Erkmen (1995) observou um aumento na população de *S. aureus* durante o fabrico. No entanto, após a salga e durante todo o período de armazenamento, o número de *S. aureus* diminuiu a uma taxa dependente da concentração de sal, da actividade da cultura de arranque, e do tempo de armazenamento. A quantidade de inóculo inicial não afectou a sobrevivência de *S. aureus*, durante o período de armazenamento. Por outro lado, no queijo Domiati, a presença de uma elevada concentração de sal (10%) foi vantajosa para o crescimento de *S. aureus* quando competindo com as BAL (Ahmed *et al.*, 1983; citado por Cretenet *et al.*, 2011). No queijo Camero, verificou-se que o crescimento de *S. aureus* foi maior em lotes sem culturas de arranque, mas mesmo nesses casos não detectaram qualquer SEs (Olarte *et al.*, 2000).

A Comissão Europeia (2003), baseada num trabalho de Lodi *et al.*, (1994), classificou 32 queijos frescos em 3 categorias: a) queijos com elevado número de BAL; b) queijos com ausência de BAL e baixo número de flora natural; e c) queijos com ausência de BAL, mas com altas contagens de flora natural. Eles concluíram que, na categoria (a), o número de bactérias patogénicas (por exemplo, *S. aureus*) diminuiu

rapidamente durante o processamento, enquanto nas categorias (b) e (c) os patógenos sobreviveram por várias semanas. Os dados existentes sugerem que o crescimento de *S. aureus* é limitado em queijos frescos, se a coagulação se dever principalmente à fermentação láctica.

Os queijos tipo fresco que correm maior risco de que as enterotoxinas possam ser produzidas são aqueles em que a actividade da cultura de arranque é reduzida ou a flora natural é fraca. Os dados existentes sugerem que, em queijos frescos com elevado número de BAL, os estafilococos diminuem rapidamente em número e na capacidade de produção de enterotoxina, até mesmo quando um grande número de estafilococos (10^3 - 10^5 ufc/mL) está presente no início do processo (Comissão Europeia, 2003).

2.5.2. Queijo de pasta mole

Muitos dos queijos de pasta mole eram produzidos com leite cru e a fermentação baseava-se na flora natural láctica. No entanto, devido a problemas de higiene na maioria dos queijos, actualmente são produzidos com termização (65 °C - 68 °C/5-15 min) ou pasteurização (68 °C - 72 °C/15 s) do leite, com o uso de culturas de arranque seleccionadas (Scott *et al.*, 1998). Em queijos de pasta mole, como o Camembert, a actividade de água é elevada ($a_w = 0,95$), permitindo o crescimento de *S. aureus*.

Estudos sobre o crescimento de *S. aureus* durante o fabrico de queijo pasta mole com leite de bovinos e caprinos têm demonstrado um aumento na população durante as primeiras fases do processo até ao momento da salga (Meyrand *et al.*, 1998). Após este período de crescimento, a população de *S. aureus* normalmente mantém-se estável durante a maturação, mas depende da temperatura de maturação e pH do produto. As condições favoráveis para o crescimento de *S. aureus* nesses queijos também afectam a produção de SEs (Cretenet *et al.*, 2011). Assim, Meyrand *et al.*, (1998) observou uma variação na produção de enterotoxina A de 1-3,2 ng/g para um queijo feito com uma população inicial de *S. aureus* de 10^3 a 10^6 ufc/mL.

Num estudo realizado por Necidová *et al.*, (2009), monitorizou-se o crescimento de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas em queijo de pasta mole durante o processamento tecnológico. A produção de SEs foi detectada no queijo produzido a partir de leite pasteurizado, quando inoculado com $2,9 \times 10^5$ ufc/g de *S. aureus* após a pasteurização. Quando o leite cru foi inoculado com elevadas contagens de *S. aureus*, a temperatura mais elevada de pasteurização (85 °C/15 s) mostrou-se mais segura na eliminação de *S. aureus* do que a menor temperatura de pasteurização (72 °C/15 s). No

entanto, a contagem crítica de *S. aureus* de 10^5 ufc/mL não foi excedida com as duas temperaturas de pasteurização. Assim, ambos os procedimentos de pasteurização utilizados foram seguros o suficiente para reduzir a contagem de *S. aureus* para níveis incapazes de produzir SEs em tão grandes quantidades como seria necessário para causar intoxicações de origem alimentar. Após a separação do soro da coalhada, ou seja, antes de salga, a enterotoxina estafilocócica permaneceu muito menos no produto. Isto foi de acordo com o facto de as SEs, proteínas com um polipéptido de cadeia curta, solúveis em água e solução salina (Loir *et al.*, 2003), serem parcialmente removidas do queijo junto com o soro. Os resultados do estudo confirmaram que leites com contagens de *S. aureus* superiores a 10^5 ufc/g não são adequados para a produção de queijo de pasta mole. A presença de SEs em queijo de pasta mole produzido com leite pasteurizado indica uma contaminação secundária com *S. aureus* (Necidová *et al.*, 2009).

Em conclusão, os queijos de pasta mole apresentam ambientes favoráveis para o crescimento de *S. aureus* que podem causar problemas de ordem sanitária, especialmente nos casos em que há uma contaminação inicial maior que 10^3 ufc/mL (Cretenet *et al.*, 2011).

2.5.3. Queijo de pasta dura e semi-dura

Os queijos semi-duros e duros variam em termos da sua composição, formato e aparência exterior (diferenças no aspecto da casca ou flora microbiana). O risco de crescimento de *S. aureus* depende principalmente da aplicação de tratamentos térmicos sobre a coalhada (por exemplo, 52-55 °C por um máximo de 60 min para Emmental, Gruyère) ou não (por exemplo Cheddar) (Cretenet *et al.*, 2011).

Diversos estudos relatam que, na tecnologia Cheddar, a população de *S. aureus* cresce durante o processo de fabrico de queijo até à prensagem e depois diminui durante a maturação. A actividade da flora competitiva é um parâmetro crucial que influencia o crescimento de *S. aureus* e a produção de SEs (Bachmann e Spahr 1995). A salga do queijo Cheddar e uma diminuição de temperatura induzem a um aumento na população de *S. aureus*, provavelmente devido à menor actividade das culturas de arranque em resposta ao aumento da concentração de sal (Ibrahim *et al.*, 1981). Além disso, a duração da prensagem é um parâmetro crítico que deve ser levado em conta ao avaliar os riscos de crescimento de *S. aureus* no queijo Cheddar.

Em queijos como Tomme de Savoie e St Nectaire, as primeiras horas do fabrico determinam o crescimento de *S. aureus* quando as condições do meio são ideais para o crescimento. Nestes queijos, a população de *S. aureus* aumenta durante as primeiras 6 h de fabrico, em função do nível inicial de contaminação no leite cru e independentemente do pH, devido à lenta taxa de acidificação, que permite o crescimento de *S. aureus*. No entanto, o crescimento de *S. aureus* entre as 6 e 24 h depende do pH alcançado em 6 h: quanto mais ácida for coalhada, menor o crescimento (Delbes *et al.*, 2006).

Em queijos semi-duros e duros do tipo láctico, o crescimento de *S. aureus* é sempre possível e as enterotoxinas podem ser produzidas, na maioria dos tipos de queijo, se a população inicial do patógeno no leite for maior do que 10^3 ufc/mL. Os processos de fabrico permitem a multiplicação de *S. aureus* de 3-5 logs ufc/g antes do pH cair para níveis inibitórios (Comissão Europeia, 2003).

2.6. Tecnologias disponíveis para a redução de *S. aureus* no leite e queijo

O fabrico de queijo a partir de leite cru, particularmente em casos de acidificação lenta ou insuficiente da coalhada, levou a surtos estafilocócicos associados a este produto (Loir *et al.*, 2003). O *S. aureus* pode contaminar também leite tratado termicamente ou coalhada, se as condições de higiene forem inadequadas. Além disso, uma população inicial de 10^3 ufc/mL de *S. aureus* no leite pode ser suficiente para a produção de enterotoxina A no queijo, em níveis detectáveis (Meyrand *et al.*, 1998), pelo que é fundamental garantir que estes são eliminados.

2.6.1. Utilização de bacteriófagos

Os bacteriófagos fornecem uma alternativa atraente, já que os fagos são ubíquos em diferentes ambientes e específicos, incapazes de infectar células humanas e, por isso, têm grande potencial para uso como agentes de biocontrolo em alimentos (Hudson *et al.*, 2005).

Um estudo realizado por García *et al.*, (2007) demonstrou que fagos líticos adicionados ao leite (leite UHT e leite pasteurizado) foram capazes de diminuir rapidamente a contagem de *S. aureus* durante a obtenção da coalhada. Na coalhada que sofreu coagulação ácida, após 4 h de incubação a 25 °C, não se detectou *S. aureus*, enquanto que, na coalhada que sofreu coagulação enzimática, após 1 h de incubação a 30 °C, encontraram-se alguns *S. aureus*. Mesmo quando o fago foi parcialmente inactivado pelo pH baixo, este foi capaz de erradicar completamente células viáveis de

S. aureus na coalhada. Um estudo anterior de Gill *et al.*, (2006) mostrou que as proteínas do leite podem inibir a adsorção do fago à superfície celular. No entanto, de acordo com os resultados obtidos por García *et al.*, (2007), os fagos foram muito estáveis e activos durante a coagulação enzimática, o que implica que o pH seja o factor mais crucial na inactivação. Estes resultados indicam que os bacteriófagos líticos poderão ser usados como biopreservativos no fabrico de produtos lácteos. Contudo, é necessário trabalhar mais para determinar a densidade mínima de *S. aureus* que garanta a replicação do fago nestas condições.

O'Flaherty *et al.*, (2005) num estudo realizado, demonstrou que o fago K foi capaz de se replicar normalmente, levando à eliminação do *S. aureus* no leite que tinha sido previamente submetido a tratamento térmico (UHT). Quando o leite cru foi submetido a condições idênticas, os fagos foram incapazes de se replicar. Também demonstraram que a adsorção do fago foi significativamente reduzida no leite cru, enquanto que foi restaurada na amostra com tratamento térmico. A resistência ao fago no leite cru foi atribuída à aglutinação dos glóbulos de gordura, enquanto que no leite tratado termicamente, a aglutinação bacteriana não ocorreu.

2.6.2. Tratamentos a alta pressão (HPT)

De entre as mais recentes inovações tecnológicas para preservação de alimentos, nomeadamente do leite e produtos lácteos, encontram-se os tratamentos por altas pressões, considerados a alternativa mais promissora aos tradicionais tratamentos térmicos (O'Reilly *et al.*, 2000; Trujillo *et al.*, 2002; Pflanzler *et al.*, 2008).

A magnitude da pressão, o tempo de tratamento e temperatura, as espécies microbianas e a fase de crescimento celular, influenciam a sensibilidade dos microrganismos ao tratamento de alta pressão (Arqués *et al.*, 2006). Vários estudos têm mostrado a eficácia do tratamento de altas pressões no leite e coalhada para reduzir a contagem de *S. aureus* em variedades de queijo diferente (O'Reilly *et al.*, 2000; Arqués *et al.*, 2004).

O tratamento a alta pressão hidrostática (HHP) é um processo físico que se baseia em dois princípios: a sua aplicação é uniforme e instantânea no alimento; e a pressão acelera os processos, o que se traduz numa diminuição de volume, enquanto que, por outro lado, esta mesma pressão inibe os processos provocando um aumento de volume (Gervilla *et al.*, 2001).

López-Pedemonte *et al.*, (2006) avaliaram a influência do tratamento de homogeneização a pressão ultra alta (UHPH) aplicado em leite contaminado com *S. aureus*, tendo verificado que a utilização apenas da UHPH a 6°C no leite com contagem inicial $7,3 \log_{10}$ ufc/mL de *S. aureus*, reduziu a contagem de *S. aureus* no queijo logo após o fabrico para $5,0 \pm 0,3 \log_{10}$ ufc/g. Após 15 dias, diminuiu significativamente para $2,8 \pm 0,2 \log_{10}$ ufc/g, e ficaram abaixo do limite de detecção após 30 dias de armazenamento ($1 \log_{10}$ ufc/g). Verificaram também que o uso de um tratamento adicional a este no queijo - HHP (10 min, 400 MPa a 20 °C) - teve um efeito sinérgico, aumentando as reduções até $7,0 \pm 0,3 \log_{10}$ ufc/g. No entanto, para ambos os queijos UHPH e UHPH + HHP, com uma temperatura de entrada de 6 °C, foram encontradas células viáveis de *S. aureus* após o armazenamento. Para amostras com UHPH a 20 °C, a inactivação completa de *S. aureus* foi verificada após 15 dias de armazenamento para ambos os queijos, UHPH e UHPH + HHP. A presença de enterotoxinas estafilocócicas foi encontrada nos controlos, mas não nas amostras testadas UHPH ou UHPH + HHP. Este estudo mostrou uma nova abordagem para a melhoria significativa da segurança de queijos, por meio do uso de UHPH ou em combinação com HHP.

As reduções na contagem de *S. aureus* em amostras de leite, como consequência dos tratamentos UHPH a 6 °C, foram inferiores aos obtidos a 20 °C, provavelmente devido à maior temperatura atingida pela válvula de alta pressão. Para uma temperatura inicial de 4 e 24 °C, as temperaturas medidas imediatamente após a passagem pela alta pressão foram $64,5 \pm 1,0$ e $78,0 \pm 1,9$ °C, respectivamente (Thiebaud *et al.*, 2003).

Com base em estudos com leite e queijo (Gervilla *et al.*, 1999; O'Reilly *et al.*, 2000) e estudos de queijo modelo com a mesma estirpe de *S. aureus* (López-Pedemonte *et al.*, 2006), seleccionou-se 400 MPa e 20 °C como sendo as condições ideais de pressão e de temperatura no tratamento HHP. É esperado que pressões mais elevadas produzam altos níveis de inactivação, mas também afectem adversamente as características físico-químicas do queijo e alterem a sua maturação normal (Malone *et al.*, 2003; Wick *et al.*, 2004).

Um estudo realizado por Arqués *et al.*, (2006) no queijo Serena demonstrou que tratamentos a altas pressões, 300 ou 400 MPa, reduziram significativamente a contagem de microrganismos indesejáveis, melhorando a qualidade e segurança microbiológica do queijo, imediatamente após o processo de fabrico e no fim do período de maturação. Arqués *et al.*, (2004) estudou o efeito combinado de tratamentos de alta pressão (HPT) e inoculação no leite de bactérias do ácido láctico produtoras de bacteriocinas (BAL-PB),

sobre a sobrevivência de *S. aureus* durante a maturação de queijo de leite cru, verificando que os dois métodos quando combinados, são mais eficazes na eliminação de *S. aureus* do que cada um sozinho. Uma vez que as elevadas pressões podem ter efeitos nefastos para a qualidade do queijo, a combinação de HPT a baixas pressões com a inoculação de BAL-PB apresenta-se como uma alternativa viável para melhorar a segurança do queijo (Arqués *et al.*, 2004).

2.6.3. Bactofugação

O *Clostridium tyrobutyricum* quando presente no leite pode levar a um defeito conhecido como "flato tardio", que envolve a fermentação do ácido láctico em ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrogénio no final do processo de maturação do queijo. O excesso de gás produzido neste momento leva à produção de numerosos olhos grandes ou fendas e, simultaneamente, a produção de ácido butírico leva ao desenvolvimento de um odor desagradável (Fox *et al.*, 2004; Law e Tamime, 2010). Esta situação é prevalente em queijos onde as condições de fabrico favorecem o crescimento de clostrídios, nomeadamente, o uso de leite de vacas alimentadas com silagem, a inexistência de pré-tratamentos como a clarificação ou a bactofugação, aquecimento da coalhada (> 45 °C), baixo teor de sal (< 1 g/100 g) e pH elevado (Law e Tamime, 2010).

A bactofugação é utilizada para remover do leite bactérias e esporos de bactérias resistentes ao calor (por exemplo, *Clostridium* e *Bacillus spp.*) pela aplicação de força centrífuga (8.000-10.000 gf). A eficiência deste processo depende do número inicial de microrganismos presentes no leite, uma vez que remove 95% dos esporos do leite, o que significa que o risco de produção de gás tardio, devido à germinação e crescimento de *Clostridium tyrobutyricum* é muito reduzido, mas não eliminado. Dos sólidos do leite, cerca de 1-2% são transferidos para o bactofugado que, em particular, contém caseína, para além de células somáticas e bactérias (Law e Tamime, 2010; Hill, 2011).

3. Material e Métodos

Durante 12 semanas consecutivas, de Fevereiro a Maio de 2011, recolheram-se asepticamente amostras de leite cru, soro fermento, leite antes da adição de coalho, soro do fim de fabrico e coalhada escorrida, de duas Cooperativas distintas da ilha de S. Jorge, Açores, nomeadamente a Cooperativa dos Lourais e a Cooperativa da Beira. Recolheram-se ainda amostras de leite bactofugado na Cooperativa da Beira. Em paralelo, com o fim de avaliar a possível contaminação do ar por *S. aureus*, expuseram-se placas de Petri abertas, contendo agar Baird-Parker, modificado segundo Devriese (1981) (Oxoid[®]), durante uma hora na sala de fabrico, durante o tempo de laboração.

Os frascos com as amostras foram acondicionados em caixas térmicas, refrigeradas, e encaminhados para o laboratório da Uniqueijo onde se efectuaram as análises.

No laboratório foram preparadas diluições decimais em água peptonada (Oxoid[®]), sob condições de rigorosa assepsia e na câmara de fluxo laminar, seguindo-se os procedimentos geralmente recomendados em laboratórios de microbiologia.

Alíquotas de 0,1 mL, de diluições sucessivas, das várias amostras, foram inoculadas por incorporação à superfície em agar Baird-Parker, modificado segundo Devriese (1981), procedendo-se à incubação das mesmas a 37 °C, por 48 horas. Após o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa, seguindo-se a contagem de colónias e observação da morfologia das mesmas. Colónias com presença de um halo de lecitinase (halo transparente à volta da colónia) e colónias com presença de halo de lipase (zona opaca imediatamente à volta da colónia) (Matos *et al.*, 1995), foram seleccionadas para posterior isolamento, em agar de Baird-Parker, modificado segundo Devriese (1981), através de riscado com a ansa estéril até esgotamento, e incubadas a 37 °C durante 48 horas. A partir de uma colónia isolada, foram inoculados tubos de ensaio com BHI agar (Brain Heart Infusion) (Oxoid[®]) em rampa, para, após incubação, serem transportados para o Laboratório de Tecnologia Alimentar da Universidade dos Açores onde foram realizados os testes posteriores. Foram assim seleccionados um total de 188 isolados, presumivelmente identificados como *S. aureus*.

No Laboratório de Tecnologia Alimentar, as colónias foram transferidas para tubos com caldo BHI (Oxoid[®]), sendo estes incubados a 37 °C por 24 h.

Procedeu-se à inoculação e purificação dos isolados em meio de PCA (Plate Count Agar) (Oxoid[®]) e à sua caracterização primária pela Coloração de Gram, os testes

da coagulase (Roberts e Greenwood 2003; Winn *et al.*, 2006) e da catalase (Tang e Stratton, 2006; Winn *et al.*, 2006; Goldman e Green, 2009). Procedeu-se ainda à observação das zonas de hemólise pela inoculação em Agar Sangue (Oxoid®) suplementado com 5% de sangue estéril e fresco de bovino.

A biotipificação dos isolados foi realizada através dos testes de produção de estafiloquinase, β -hemolisina, coagulação do plasma bovino e crescimento em meio com cristal violeta, de acordo com o esquema preconizado por Devriese (1984), adaptado por Matos (1988) (Quadro 4). De acordo com este esquema, os isolados de *S. aureus* foram então classificados como Hospedeiros Específicos (biótipos bovino, ovino, aves e humano) ou biótipos Sem Hospedeiro Específico, de acordo com o mesmo esquema.

Quadro 4. Esquema de classificação para subdivisão dos isolados de *Staphylococcus aureus* em biótipos (Adaptado de Devriese, 1984; e Matos, 1988).

Biótipo	Estafiloquinase	β - hemolisina	Plasma Bovino	Crescimento com C.V ¹
Hospedeiro específico:				
- humano	+	-/+	-	C
- aves	-	-	-	A
- bovino	-	+	+	A
- ovino	-	+	+	C
Hospedeiro não específico:				
- K ⁺ β ⁺ A	+	+	+	A
- K ⁻ β ⁺ C	-	+	-	C
- K ⁻ β ⁺ A	-	+	-	A
- K ⁺ β ⁻ A	+	-	-	A
- K ⁻ β ⁻ C	-	-	-	C

¹ Crescimento com Cristal Violeta.

A produção de estafiloquinase foi determinada na presença de fibrinogénio bovino, com ou sem plasma de cão adicionado, como fonte de plasminogénio (Devriese e Van de Kerckhove, 1980). Uma solução 0,2% de fibrinogénio bovino (Seralab®), dissolvido em tampão fosfato, foi preparada em dupla concentração de Caldo Nutritivo (Merck®), esterilizada por filtração e adicionada a 50% (v/v), de agar a 3% fundido (Biokar Diagnostics®). A mistura foi mantida a 55 °C durante 10 minutos para precipitar a fibrina. O plasma do cão (Seralab®) foi adicionado ao agar, imediatamente antes de o distribuir em placas, numa concentração final de 0,5%. Elaboraram-se placas de controlo sem o plasma de cão. Os isolados de *S. aureus* foram inoculados em “spots”

densos nas placas de teste e nas placas de controlo e incubadas por 48 horas a 37 °C. Somente foram consideradas positivas as amostras que apresentaram uma zona clara de lise à volta da colónia nas placas com plasma canino, e ausência de lise nas placas sem o plasma canino.

A produção de β -hemolisina (esfingomielinase C) foi testada usando a reacção inversa CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson), semeando verticalmente em placas de Agar Sangue com 5% de sangue de bovino um inoculo denso de *Streptococcus agalactiae* (ATCC 13813). Os isolados de *S. aureus* em teste foram inoculados num ângulo de 90°, em relação ao inoculo do *Strep. agalactiae*. A presença de uma zona de hemólise em forma de seta dentro da zona hemolítica do *Strep. agalactiae* indica uma reacção positiva.

A actividade da coagulase foi determinada em tubo, utilizando uma diluição 1:3 de plasma de bovino fresco. O plasma bovino foi obtido a partir de sangue de bezerras, utilizando EDTA como anticoagulante. 0,1 mL de uma cultura de 12 horas em caldo BHI foi adicionada a 0,5 mL de plasma, em tubos estéreis, e incubados a 37 °C. Após 2 e 6 horas, os tubos foram observados para a presença de coágulos. Somente foram consideradas positivas as amostras que formaram um coágulo compacto, firmemente aderente às paredes dos tubos, ou um grande coágulo solto, até seis horas após o início da incubação. Reacções na forma de pequenos grumos ou coágulos soltos não foram considerados.

O teste do crescimento em meio com cristal violeta foi realizado em placas de agar Tryptone Soy (Biokar Diagnostics®) com 6,0-8,0 $\mu\text{g/mL}$ de cristal violeta incorporado. As placas foram semeadas em "spots", com um inoculo muito denso retirado de uma cultura em Agar Sangue (com menos de 12 horas). Após respectivamente 24 e 48 horas de incubação, a 37°C, foram verificados os crescimentos e classificados como C (coloração azul ou violeta com, ou sem, halo em tom de laranja) ou A (coloração amarela, brilhante ou pálida, com ou sem uma margem violeta).

Neste estudo, os isolados humanos e bovinos, previamente biotipificados de acordo com o descrito por Devriese (1984), foram comparados também quanto à produção de lecitinase e, ou, lipase, no meio de Baird-Parker, modificado segundo Devriese (1981).

Aquando da recolha de amostras, recolheu-se uma amostra de leite em cuba, nos Lourais, e leite cru no silo e na cuba de fabrico (bactofugado), na Beira, para posterior determinação de mesófilos totais, contagem de células somáticas, teor de matéria

proteica bruta, teor de matéria gorda e teor de sólidos isentos de gordura. Estas análises foram efectuadas pelo Serviço de Classificação do Leite da Ilha Terceira (SERCLAT).

Tratamento estatístico

Nos procedimentos estatísticos, foram utilizados os recursos do programa informático Microsoft Office Excel 2007 para a tabulação dos dados e o programa estatístico SPSS[®] versão 15.0 para a respectiva análise. Os dados da contagem de células somáticas, contagem de mesófilos totais, contagem de *S. aureus*, teor de proteína, teor de gordura e teor de sólidos sem gordura, entre a Cooperativa da Beira e a Cooperativa dos Lourais, foram comparados pelo teste de Mann-Whitney para se detectarem eventuais diferenças entre as variáveis correspondentes, com $\alpha = 0,05$. Por outro lado, os mesmos dados referentes ao leite cru e ao leite bactofugado na Cooperativa da Beira foram analisados para detectar diferenças no mesmo grupo de sujeitos, antes e após o tratamento (bactofugação) através do teste de Wilcoxon, com $\alpha = 0,05$. Efectuaram-se ainda testes de correlação entre variáveis (mesófilos totais, CCS e *S. aureus*) através do teste de Spearman.

4. Apresentação e discussão dos resultados

4.1. Isolamento e contagens de *S. aureus* durante o processo de fabrico

Para uma melhor compreensão do processo de fabrico do queijo São Jorge DOP apresentamos um fluxograma das suas etapas e algumas imagens das mesmas.

Quadro 5. Fluxograma de fabrico do Queijo São Jorge DOP.

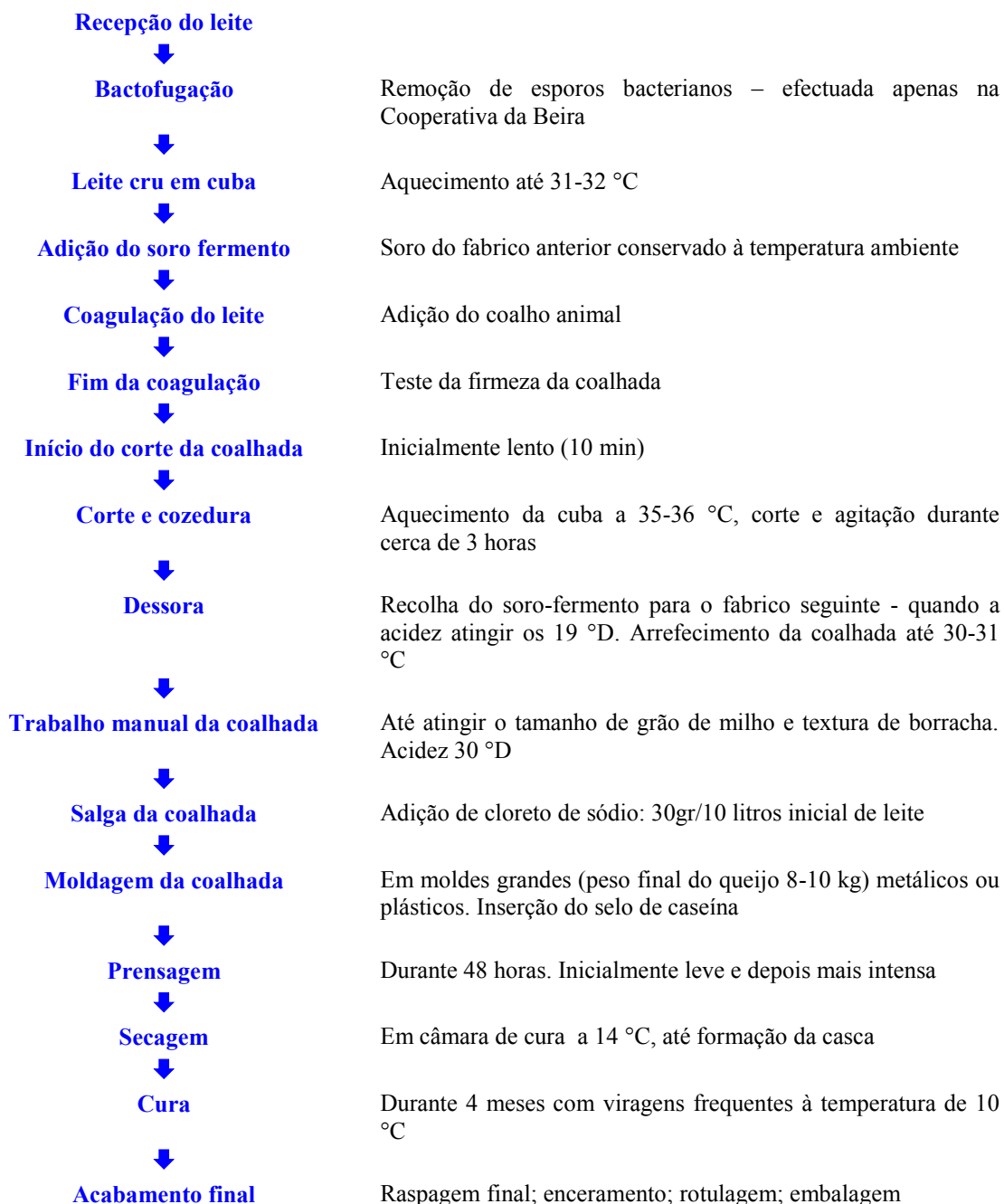




Figura 3. Algumas etapas do processo de fabrico do queijo São Jorge. Da esquerda para a direita: leite na cuba; corte e “cozedura da coalhada”; dessoragem; trabalho manual da coalhada (fotos do autor).

Dada a grande selectividade do meio utilizado, Baird-Parker, modificado segundo Devriese (1981), todas as colónias com halos de lipase e ou lecitinase foram presumivelmente assumidas como sendo *S. aureus* (Figura 4). Não foram observadas, em nenhum caso, colónias apenas com halo de lecitinase.

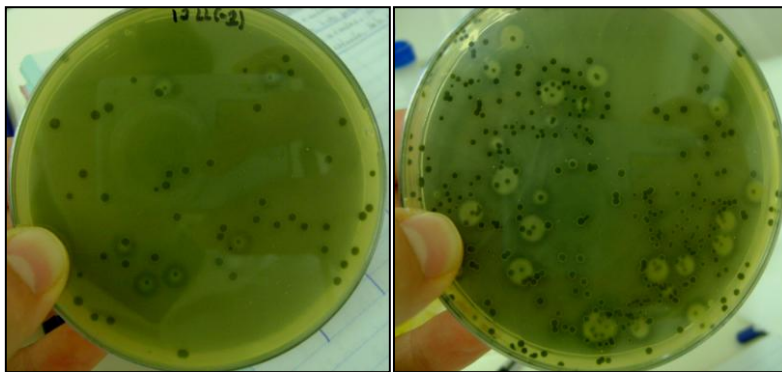


Figura 4. Aspecto de isolados de *S. aureus* em agar Baird-Parker modificado segundo Devriese (1981) (fotos do autor).

A presença de gema de ovo no meio de Baird-Parker modificado segundo Devriese (1981) permite a detecção de duas reacções devido à actividade lipolítica dos estafilococos: 1) reacção da lecitinase, uma zona de precipitação no meio, ao redor das colónias; e 2) reacção da lipase ou "camada de pérola", um filme iridescente e envolvendo imediatamente as colónias, visível pelo reflexo da luz (brilho iridescente ou "óleo em água") (Matos, 1988).

O isolamento de colónias de *S. aureus* com halo de lipase e lecitinase e colónias apenas com halo de lipase foi efectuado também no agar de Baird-Parker, modificado segundo Devriese (1981) (Figura 5).

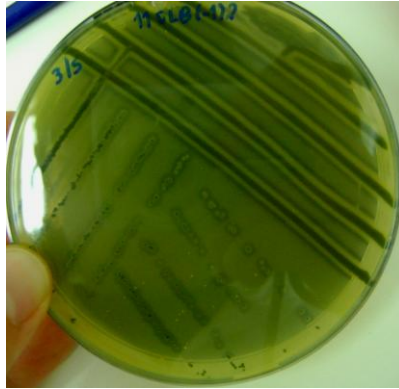


Figura 5. Isolado de *S. aureus* (halo de lipase e lecitinase) em agar Baird-Parker modificado segundo Devriese (1981) (foto do autor).

Do total de 188 isolados recolhidos, 167 foram confirmados como sendo *S. aureus*, pela observação morfológica das colónias, através da visualização de hemólises em agar sangue e coloração de Gram (Figura 6), assim como através dos testes da catalase e coagulase. Uma combinação das actividades de hemólise e de coagulase parece representar um critério ideal para a identificação de *S. aureus* em culturas de amostras de leite (Lam *et al.*, 1995). Observaram-se dois tipos de hemólise, hemólise α e hemólise β . A hemólise α caracterizada por uma zona de descoloração parcial ao redor da colónia, enquanto que a hemólise β é caracterizada por uma hemólise completa (Figura 6).

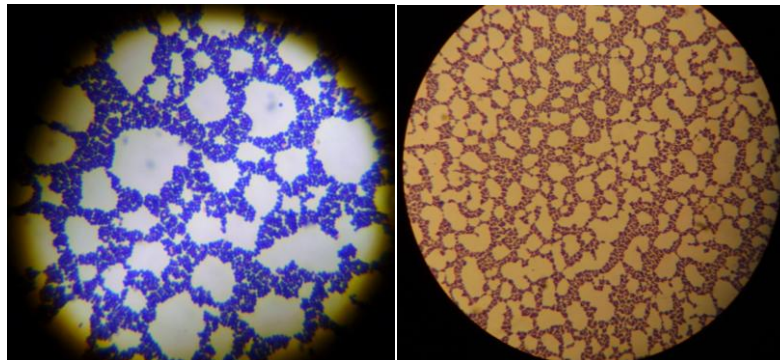


Figura 6. Coloração de Gram de isolados de *S. aureus* (foto do autor).



Figura 7. Hemólises α e β de um isolado de *S. aureus* (foto do autor).

O valor médio da contagem de mesófilos totais, ao longo de 8 semanas, foi mais elevado no leite cru em cuba na Cooperativa dos Lourais (1.206.125 ufc/mL), em comparação com o valor médio observado na Cooperativa da Beira (946.625 ufc/mL) (Figura 8), não sendo, no entanto, estas diferenças significativas ($p \geq 0,05$; ver Quadro 4.1 - anexo 4). De acordo com o Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, este valor deveria ser inferior a 100.000 ufc/mL. A ultrapassagem deste valor deverá dever-se ao facto de o leite recepcionado não ser refrigerado e, possivelmente, ao crescimento bacteriano durante o enchimento das cubas de fabrico, visto que o leite não é refrigerado e vai sendo aquecido de imediato, uma vez que a média da contagem microbiana de mesófilos totais das amostras individuais recolhidas periodicamente pelo SERCLAT, para efeitos de classificação do leite de todos os produtores de leite da Ilha de S. Jorge, ser bastante inferior (média ponderada do ano de 2004 = 82.642 ufc/mL).

Ao contrário do que se verificou com os mesófilos totais, já se observaram diferenças estatisticamente significativas entre a contagem média de células somáticas no leite cru da Cooperativa da Beira (135.625 cs/mL) e do leite cru na Cooperativa dos Lourais (49.000 cs/mL) (Figura 8) ($p < 0,05$; ver Quadro 4.2 - anexo 4). De acordo com o Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, o número máximo de células somáticas/mL não deve ultrapassar as 400.000. Verificou-se assim que estes valores, tanto na Cooperativa da Beira como na Cooperativa dos Lourais, se encontraram bastante abaixo do valor máximo permitido. Um factor que certamente contribui para este êxito é a realização diária do Teste Californiano de Mamites (TCM), como prova rápida de cais, no momento de entrega do leite (a média ponderada da CCS do ano de 2004 foi de 249.473).

Em relação à contagem de *S. aureus* no leite cru das duas Cooperativas, verificou-se que na Beira o valor foi superior, cerca de 1.165 ufc/mL, enquanto que nos Lourais rondou as 755 ufc/mL. Esta diferença não foi, contudo, estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$, ver Quadro 4.3 - anexo 4). De acordo com o Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005, estes valores encontram-se abaixo do valor máximo permitido.

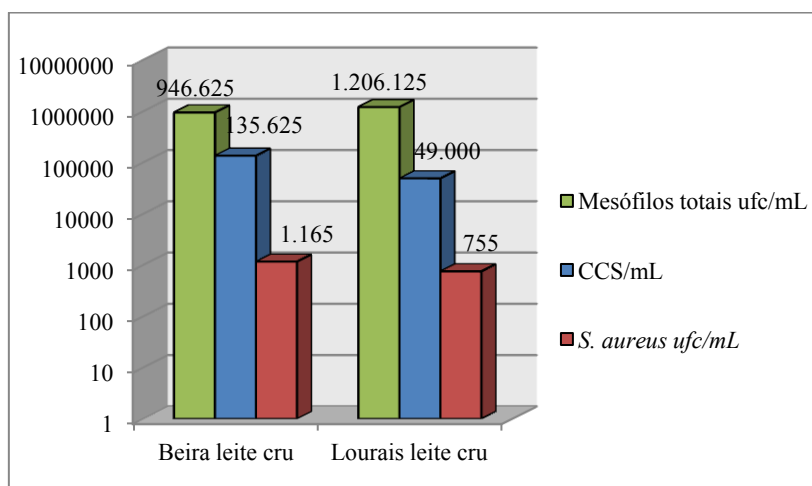


Figura 8. Diferenças médias em três variáveis (mesófilos totais, CCS e *S. aureus*) entre o leite cru da Cooperativa da Beira e o leite cru da Cooperativa dos Lourais, verificadas ao longo de 8 semanas (de Março a Maio de 2011).

No caso da Cooperativa da Beira, observámos uma forte correlação negativa, estatisticamente significativa, entre a CCS e os mesófilos totais no leite cru ($r = -0,826$; $p = 0,011$; $\alpha = 0,05$; ver Quadro 5.1 - anexo 5), o que nos indica que as categorias mais elevadas de uma variável estão associadas com as categorias mais baixas da outra variável e que as mamites não foram um contributo para a contagem microbiana verificada. Por outro lado, não se observou uma correlação significativa entre a CCS e a contagem de *S. aureus* no leite cru ($r = -0,575$; $p = 0,136$; ver Quadro 5.2 - anexo 5) e entre os mesófilos totais e os *S. aureus* no leite cru ($r = 0,310$; $p = 0,456$; ver Quadro 5.3 - anexo 5).

Na Cooperativa dos Lourais, não se verificou uma correlação significativa entre a CCS e os mesófilos totais no leite cru ($r = -0,455$; $p = 0,257$; ver Quadro 6.1 - anexo 6), assim como entre a CCS e a contagem de *S. aureus* ($r = -0,359$; $p = 0,382$; ver Quadro 6.2 - anexo 6). Pelo contrário, existiu uma correlação estatisticamente muito significativa entre as contagens de mesófilos totais e *S. aureus* ($r = 0,905$; $p = 0,002$; $\alpha = 0,01$; ver Quadro 6.3 - anexo 6), o que indica que nesta Cooperativa o aumento dos

mesófilos totais pressupos também o aumento de *S. aureus* e que as mamites possam ser um contribuinte positivo para o número destas bactérias presentes inicialmente no leite.

O processo de bactofugação realizado na Cooperativa da Beira afectou tanto a contagem de mesófilos totais, como a CCS e de *S. aureus* (Figura 9). A bactofugação reduziu neste caso a contagem média de mesófilos totais, de 946.625 ufc/mL para 38.000 ufc/mL, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, ver Quadro 7.1 - anexo 7). A percentagem de redução de mesófilos totais foi de 96,0%. Por outro lado, o processo de bactofugação teve influências estatisticamente significativas na CCS média e na contagem média de *S. aureus*, ao longo de 8 semanas ($p < 0,05$, ver Quadro 7.2 e 7.3 - anexo 7). Com a bactofugação, a redução da CCS foi de 91,6% (de 135.625 para 11.377 cs/mL). As alterações da composição do leite devido ao aumento das células somáticas são múltiplas e, diminuem a gordura, a lactose, a caseína total, o potássio e o cálcio; aumentam por outro lado a proteína do soro, as imunoglobulinas, o sódio, o cloro, a lactoferrina e o ponto de congelação do leite (Matos, 1998). No entanto, a bactofugação, por si só, não remediará os danos no leite associados a uma contagem celular muito elevada, nomeadamente os inconvenientes relacionados com os níveis muito elevados de plasmina (uma protease) (Bastian e Brown, 1996). Em relação à contagem do *S. aureus*, a percentagem de redução foi de 98,2% (de 1.165 ufc/mL para 21 ufc/mL). A eficiência da bactofugação depende do número inicial de microrganismos presentes no leite (Law e Tamime, 2010; Hill, 2011;).

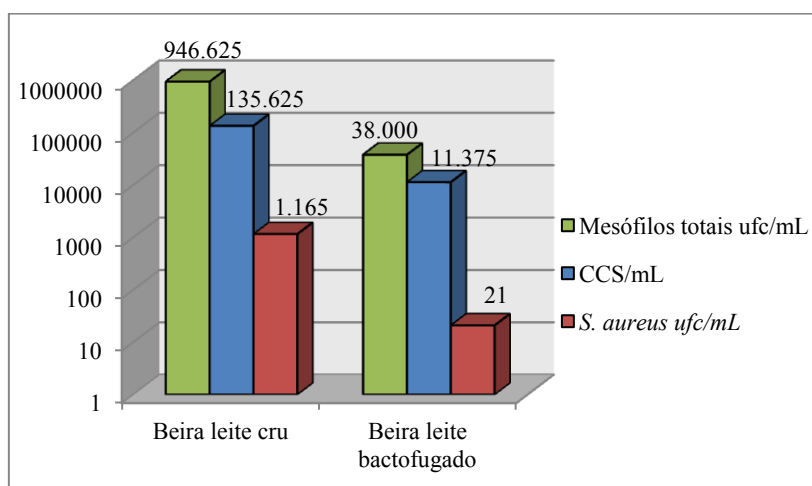


Figura 9. Diferenças médias em três variáveis (mesófilos totais, CCS e *S. aureus*) entre o leite cru e o leite bactofugado na Cooperativa da Beira, verificadas ao longo de 8 semanas (de Março a Maio de 2011).

Constata-se que o processo de bactofugação, apesar de ter como função primordial a eliminação de esporos bacterianos no leite, tem muita influência na redução de mesófilos totais, células somáticas e *S. aureus*, apresentando-se como uma eficaz forma de melhorar estas características, com influência na qualidade do leite, sendo, neste caso, notoriamente benéfica a redução de uma bactéria patogénica como o *S. aureus*.

O teor médio de sólidos isentos de gordura (SNF – do inglês –solids non fat”) (proteína, lactose e cinzas), gordura e proteína, no leite cru, e as diferenças verificadas entre a Cooperativa da Beira e a Cooperativa dos Lourais, são apresentados na Figura 10. Na Cooperativa dos Lourais, o valor médio de SNF - 9,01% - foi superior ao valor observado da Cooperativa da Beira (8,90%), diferença esta que se revelou significativa ($p < 0,05$, ver Quadro 8.1 - anexo 8). A Cooperativa dos Lourais apresentou um menor valor médio de teor de gordura - 3,10% - comparativamente com a Cooperativa da Beira em que o valor desta foi 3,22%, não sendo estas diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$, ver Quadro 8.2 - anexo 8). Relativamente ao teor médio de proteína presente no leite das Cooperativas da Beira e Lourais, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$, ver Quadro 8.3 - anexo 8), sendo que o valor médio de proteína da Cooperativa dos Lourais - 3,28% - foi superior ao valor médio da Cooperativa da Beira - 3,24% (Figura 10).

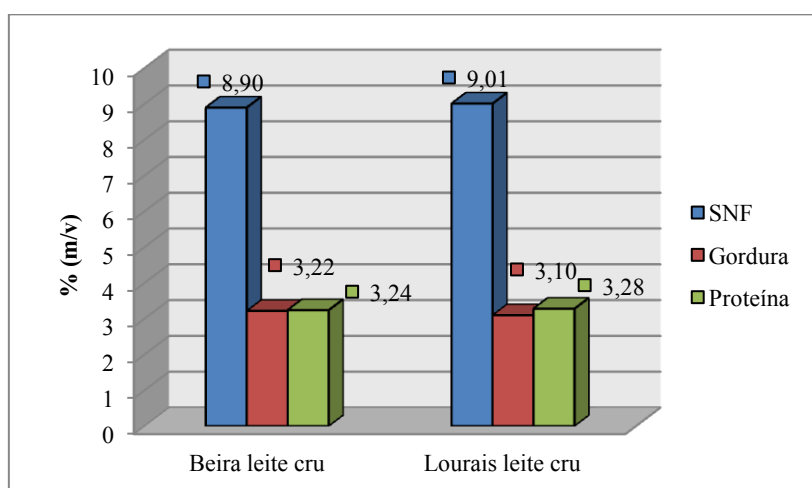


Figura 10. Teor médio de matéria gorda, teor médio de gordura e teor médio de sólidos sem gordura do leite cru nas Cooperativas da Beira e Lourais, verificadas ao longo de 8 semanas (de Março a Maio de 2011).

A grande parte das vacas existentes em S. Jorge pertence à raça Holstein-Frísia. O leite das vacas Holstein-Frísia tem cerca de 3,2% de proteína e 3,4% de gordura

(Harris e Bachman, 1988; Akers, 2002). Para além dos factores genéticos, alimentares, ambientais, fase da lactação, etc., susceptíveis de fazer variar a composição do leite, a quantidade de leite produzida é das mais importantes causas de variação, tanto do teor em proteína, como de gordura, como também das células somáticas, facto referido na bibliografia (Akers, 2002). Assim, as variações nos teores médios de gordura e de proteína obtidas podem ser ambas explicadas pelos factores supramencionados.

Com a bactofugação do leite na Cooperativa da Beira (Figura 11), o teor médio de SNF diminuiu de 8,90% para 8,77%, ou seja, cerca de 1,5%, sendo estas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, ver Quadro 9.1 - anexo 9). O teor médio de gordura no leite cru - 3,22% - aumentou com a bactofugação para 3,30%, não sendo, no entanto, esta diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$, ver Quadro 9.2 - anexo 9). Em relação à proteína, houve uma redução do seu teor médio em consequência da bactofugação, de 3,24% para 3,12%, sendo este resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$, ver Quadro 9.3 - anexo 9). Estas diferenças poderão eventualmente dever-se à retenção das partículas de maiores tamanhos no bactofugador, uma vez que, de acordo com a literatura, cerca de 1-2% dos sólidos do leite são transferidos para o bactofugador que, em particular, contém caseína, juntamente com células somáticas e bactérias (Hill, 2011).

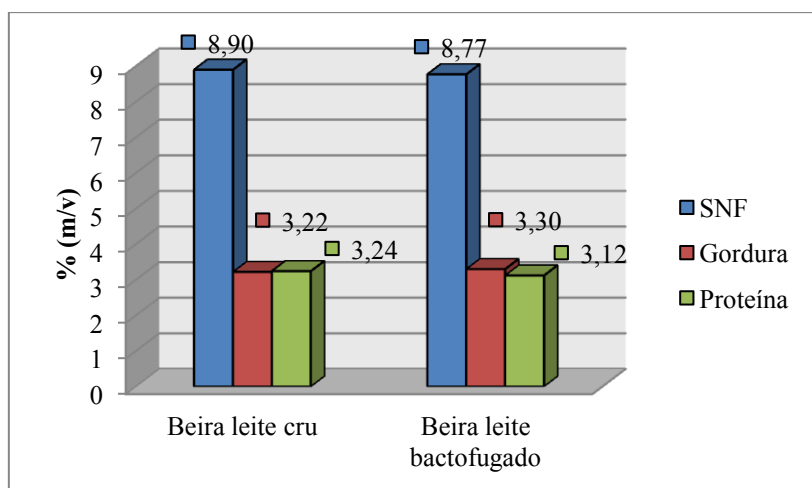


Figura 11. Teor médio de matéria gorda, teor médio de gordura e teor médio de SNF do leite cru e bactofugado na Cooperativa da Beira, verificadas ao longo de 8 semanas (de Março a Maio de 2011).

Relativamente à evolução do crescimento de *S. aureus* durante o fabrico de queijo na Cooperativa da Beira (Figura 12), verificou-se que não existiram diferenças estatisticamente significativas entre a contagem de *S. aureus* do leite em cuba (21

ufc/mL) e no leite imediatamente antes da adição do coalho (27 ufc/mL) ($p \geq 0,05$, ver Quadro 10.1 - anexo 10), assim como não existiram também diferenças estatisticamente significativas entre o leite em cuba e o soro ($p \geq 0,05$, ver Quadro 10.2 - anexo 10), 21 ufc/mL e 50 ufc/mL, respectivamente. Novamente não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$, ver Quadro 10.3 - anexo 10) entre o leite antes da adição do coalho (27 ufc/mL) e o soro (50 ufc/mL). A quantidade média de *S. aureus* presente no soro fermento foi de 387 ufc/mL (Figura 12), valor este que não terá tido influência nos resultados obtidos de seguida, uma vez que a quantidade de soro adicionada, comparativamente com a quantidade de leite presente na cuba de fabrico, é mínima. Por outro lado, existiram diferenças estatisticamente significativas entre a contagem média de *S. aureus* no leite em cuba (21 ufc/mL) e na coalhada (1.733 ufc/mL) ($p < 0,05$, ver Quadro 10.4 - anexo 10), e da mesma forma entre o soro e a coalhada ($p < 0,05$, ver Quadro 10.5 - anexo 10).

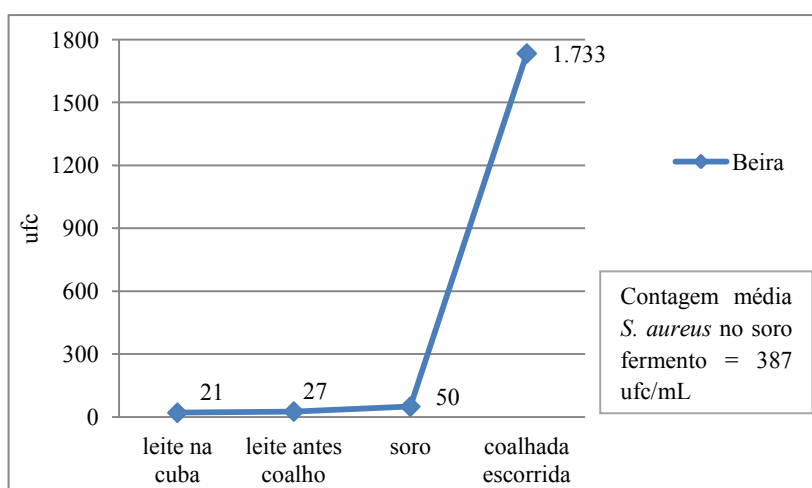


Figura 12. Evolução da contagem de *S. aureus* em 4 momentos do processo de fabrico do Queijo São Jorge (DOP) na Cooperativa da Beira, verificada ao longo de 12 semanas (de Fevereiro a Maio de 2011).

Na Cooperativa dos Lourais, a evolução do crescimento de *S. aureus* no fabrico de queijo (Figura 13), apresentou um padrão semelhante ao observado na Cooperativa da Beira, apesar de os valores de *S. aureus* serem bastante diferentes, dado que o leite no caso da Beira foi previamente bacteriologicamente tratado. A contagem de *S. aureus* do leite em cuba apresentou um valor médio de 1.029 ufc/mL. Imediatamente antes da adição do coalho, a contagem foi um pouco superior, 1.423 ufc/mL, não sendo, contudo, estas diferenças estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$, ver Quadro 11.1 - anexo 11). Também não existiram diferenças estatisticamente significativas entre o leite em cuba e

o soro ($p \geq 0,05$, ver Quadro 11.2 - anexo 11) e entre o leite antes da adição do coalho e o soro ($p \geq 0,05$, ver Quadro 11.3 - anexo 11). No soro fermento, a quantidade média de *S. aureus* foi de 866 ufc/mL (Figura 13), não tendo influenciado as etapas posteriores, pois a quantidade de soro adicionada é muito baixa comparativamente com a quantidade de leite presente na cuba. Existiram também neste caso diferenças estatisticamente significativas entre a contagem média de *S. aureus* no leite em cuba e na coalhada ($p < 0,05$, ver Quadro 11.4 - anexo 11), (no leite, 1.029 ufc/mL, e na coalhada 50.250 ufc/mL). Também se observaram igualmente diferenças extremamente significativas entre o soro e a coalhada ($p < 0,05$, ver Quadro 11.5 - anexo 11).

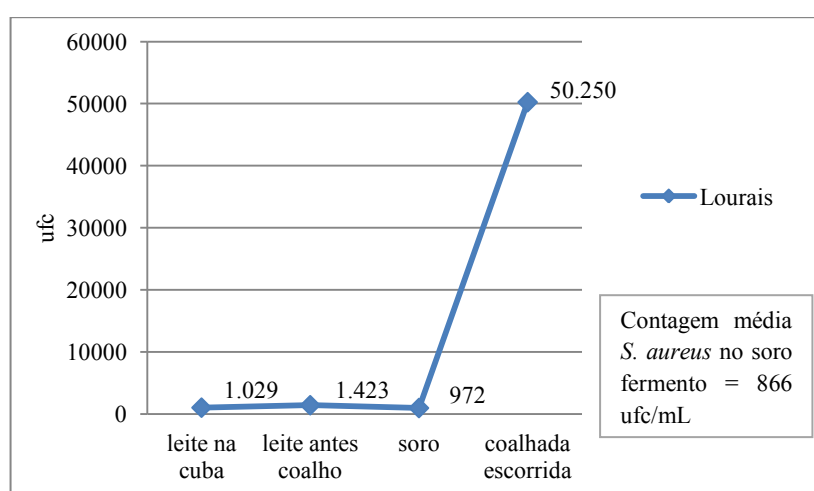


Figura 13. Evolução média da contagem de *S. aureus* em 4 momentos do fabrico do Queijo São Jorge (DOP) na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 12 semanas (de Fevereiro a Maio de 2011).

Assumindo que a maioria dos estafilococos coagulase positivos seriam, em princípio, *S. aureus*, nos termos do Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005, na Cooperativa da Beira o valor obtido foi bastante inferior ao valor limiar ($m = 10^4$ ufc/g) ao passo que, na Cooperativa dos Lourais, ultrapassou o valor limiar, mas não o limite máximo admissível ($M = 10^5$ ufc/g), uma vez que o mesmo regulamento estipula os mesmos valores para “Durante o processo de fabrico, no momento em que se prevê que o número de estafilococos seja mais elevado”, neste caso como se verificou, na coalhada.

Comparando a evolução da contagem de *S. aureus* nas duas cooperativas, constatou-se que, na Cooperativa da Beira, devido ao processo de bactofugação, a contagem inicial de *S. aureus* foi reduzida, influenciando todo o processo. Verificou-se, em ambos os casos, um aumento significativo na contagem de *S. aureus* na coalhada

escorrida. Tal facto se deverá, por um lado, ao tempo decorrido a temperatura muito favorável para o crescimento da bactéria e, eventualmente, a alguma adesão da bactéria à fase sólida, a coalhada, uma vez que esta apresentará capacidade de aderir aos glóbulos de gordura (Ali-Vehmas *et al.*, 1997). O aquecimento final, “cozedura da coalhada”, será um factor determinante. Será assim de extrema importância garantir um baixo valor inicial de *S. aureus*, uma vez que a quantidade de *S. aureus* no queijo é directamente dependente do seu número no leite cru (Medvedová *et al.*, 2009).

A contaminação do ar por *S. aureus* só foi observada apenas uma vez, na Cooperativa da Beira – 1 ufc/placa de Petri (o equivalente a 59 ufc/m² por hora), o que demonstra que a eventual contaminação do ar pode ter tido algum contributo nessa semana para a contagem de *S. aureus*, mas, ao longo das 12 semanas esse contributo não foi notório.

4.2. Biotipificação dos isolados de *S. aureus* obtidos

Considerando-se o padrão de resultados nos testes de produção de estafiloquinase (K), β -hemolisina (β), coagulação de plasma bovino e crescimento na presença de cristal violeta, os 167 isolados de *S. aureus* distribuíram-se por 8 biótipos diferentes.

No teste da produção de estafiloquinase (Figura 14), foi possível visualizar amostras positivas e amostras negativas. Nas amostras positivas visualizou-se uma zona de lise à volta da colónia.

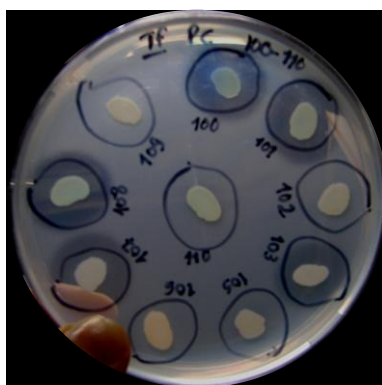


Figura 14. Resultado do teste da produção de estafiloquinase em isolados de *S. aureus* (de acordo com o esquema preconizado por Devriese (1984)) (foto do autor).

Na Figura 15 encontram-se alguns resultados do teste da produção de β -hemolisina. Na imagem da esquerda visualizam-se apenas resultados positivos e na imagem da direita é possível observar resultados positivos e negativos. A presença de

uma zona clara, em forma de seta, dentro da zona hemolítica do *Strep. agalactiae* indica uma reacção positiva.

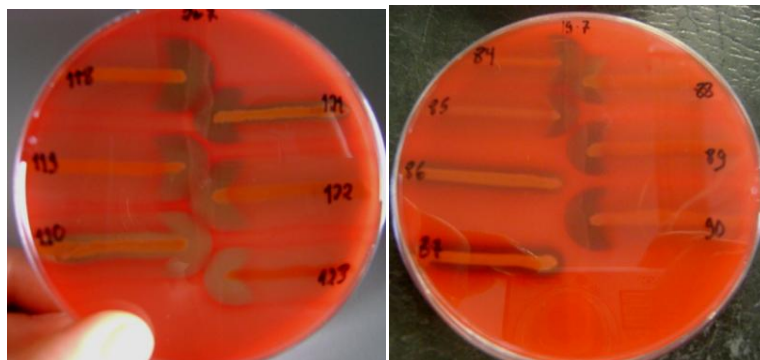


Figura 15. Resultado do teste da produção de β -hemolisina (reacção de CAMP) em isolados de *S. aureus* de acordo com o preconizado por Devriese (1984) (fotos do autor).

No teste da coagulação de plasma de bovino puderam observar-se coágulos sólidos ou coágulos grandes soltos, sendo ambos os resultados considerados positivos (Figura 16).

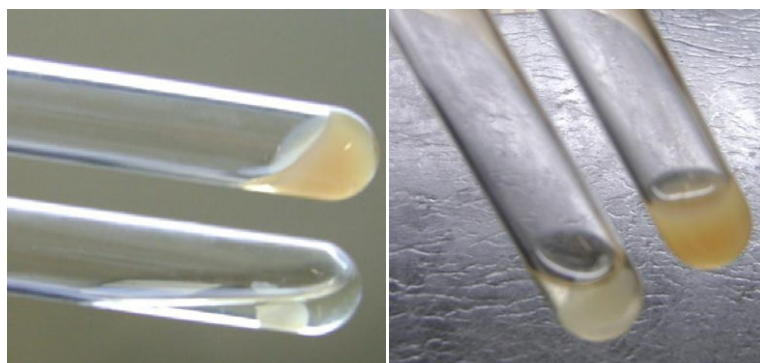


Figura 16. Resultado do teste da coagulação de plasma bovino em isolados de *S. aureus* de acordo com o preconizado por Devriese (1984) (fotos do autor).

O crescimento de *S. aureus* na presença de cristal violeta, pelos isolados obtidos em São Jorge, mostrou crescimento das amostras em spots, com coloração amarela (A) e violeta (C) (Figura 17).

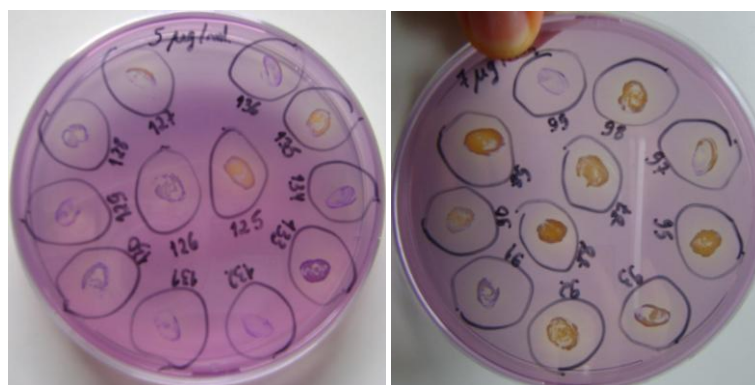


Figura 17. Resultado do teste do crescimento de *S. aureus* na presença de cristal violeta de acordo com o preconizado por Devriese (1984) (fotos do autor).

Os resultados da classificação dos 167 isolados de *S. aureus* são apresentados no Quadro 6. Cerca de 56,2% dos biótipos encontrados correspondiam a hospedeiros específicos e 43,8% a hospedeiros não específicos. Os biótipos mais prevalentes foram os biótipos com hospedeiro não específico $K^- \beta^+ A$ (23,4%), o biótipo bovino (22,8%) e o biótipo de aves (18,6%). Os biótipos bovinos e de aves foram os mais predominantes, possivelmente devido às próprias vacas e à grande afluência de pardais e pombos ao redor das Cooperativas, respectivamente. Os biótipos que apresentaram uma menor incidência foram os biótipos com hospedeiro não específico $K^+ \beta^+ A$ (0%) e $K^- \beta^- C$ (3%), e o biótipo com hospedeiro específico - ovino (3,0%). Interessantemente registamos o facto da quase inexistência de ovelhas na ilha de S. Jorge.

Quadro 6. Biótipos (segundo Devriese, 1984) encontrados nos 167 isolados de *S. aureus* durante o fabrico do Queijo São Jorge nas Cooperativas dos Lourais e Beira, de Fevereiro a Maio de 2011.

Biótipo	Nº de amostras	Estafiloquinase	β - hemolisina	Plasma Bovino	Crescimento com C.V	Biótipo (%)
Hospedeiro específico:						
- humano	20	+	-/+	-	C	12,0
- aves	31	-	-	-	A	18,6
- bovino	38	-	+	+	A	22,8
- ovino	5	-	+	+	C	3,0
Total						56,2
Hospedeiro não específico:						
$K^+ \beta^+ A$	0	+	+	+	A	0,0
$K^- \beta^+ C$	12	-	+	-	C	7,2
$K^- \beta^+ A$	39	-	+	-	A	23,4
$K^+ \beta^- A$	17	+	-	-	A	10,2
$K^- \beta^- C$	5	-	-	-	C	3,0
Total						43,8

Curiosamente, na Cooperativa dos Lourais, os biótipos mais prevalentes foram o biótipo de aves, o biótipo $K^- \beta^+ A$ e o biótipo humano. Registamos o facto de, em redor desta Cooperativa se encontrarem muitos pardais e pombos, e de os queijeiros não utilizarem, neste caso, luvas durante o fabrico do queijo ou as utilizarem esporadicamente. Por sua vez, os biótipos que apresentaram uma menor incidência foram os biótipos ovino e os biótipos não específicos $K^- \beta^- C$ e $K^- \beta^+ C$. Contrariamente, na Cooperativa da Beira, os biótipos mais frequentes foram o biótipo bovino, o biótipo não específico $K^- \beta^+ A$ e o biótipo de aves. O biótipo bovino é o mais prevalente devido à sua presença nas vacas e o biótipo de aves também é muito frequente, talvez devido à forte afluência de pardais e pombos à volta da Cooperativa, tal como nos Lourais. Os biótipos menos frequentes foram o biótipo humano, o biótipo ovino e o biótipo não específico $K^- \beta^- C$. Ao contrário do que se verifica nos Lourais, na Beira é obrigatório o uso de luvas em todas as etapas de fabrico do queijo (Figura 18).

O isolado de *S. aureus*, proveniente da contaminação do ar, foi identificado como pertencente ao biótipo de aves.

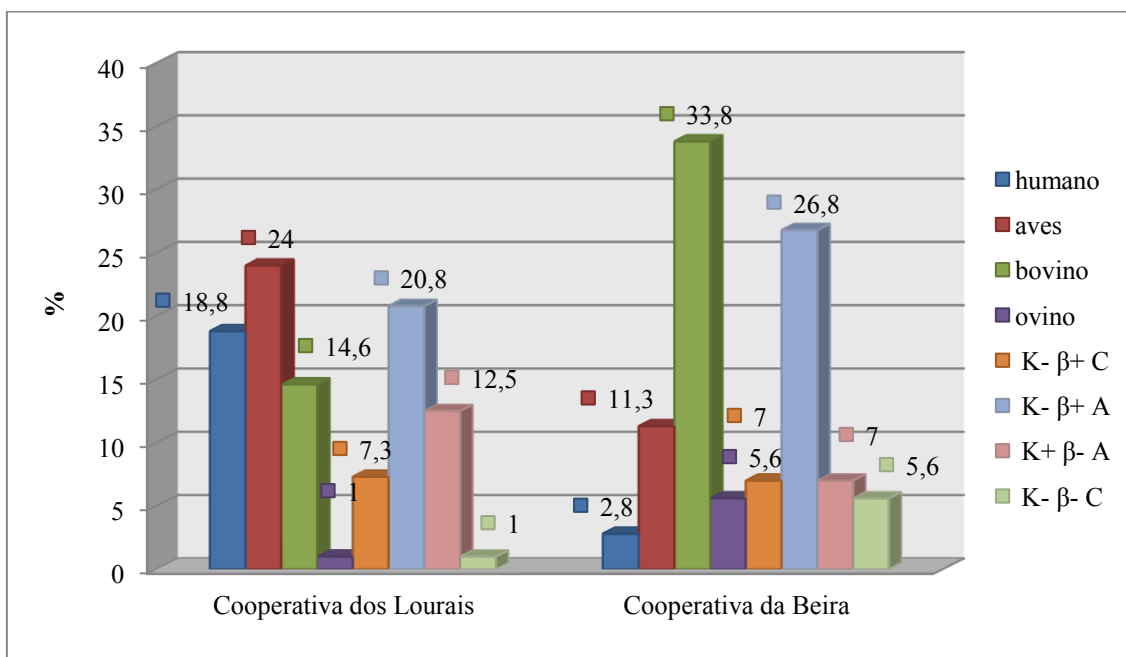


Figura 18. Distribuição percentual dos isolados de *S. aureus* pelos vários biótipos nas Cooperativas dos Lourais e Beira.

4.3. Reacção da lecitinase e lipase dos isolados de *S. aureus* no meio de Baird-Parker, modificado segundo Devriese (1981)

Os isolados de *S. aureus* foram também comparados pela produção de lecitinase e lipase e os resultados relacionados com os biótipos, humano e bovino (ver Quadro 12.2 - anexo 12). Uma elevada percentagem de isolados pertencentes ao biótipo humano apresentaram reacções positivas para a lecitinase em comparação com isolados pertencentes ao biótipo bovino, que apresentam baixa percentagem desta reacção (Figura 19). Estes resultados estão de acordo com estudos já efectuados por outros autores (Owens e John, 1975; O'Toole, 1987; Matos, 1988; Matos *et al.*, 1995). Nenhum dos isolados do estudo apresentou apenas reacção da lecitinase. Verificou-se também que, nos isolados biotipificados como humanos, ocorria maior incidência de amostras com actividade da lecitinase e lipase (85%), em vez de apenas actividade da lipase (15%). Relativamente aos biótipos bovinos, observou-se que existia predominância da actividade da lipase (79%). Estes valores estão de acordo com o referido por Matos *et al.*, (1995).

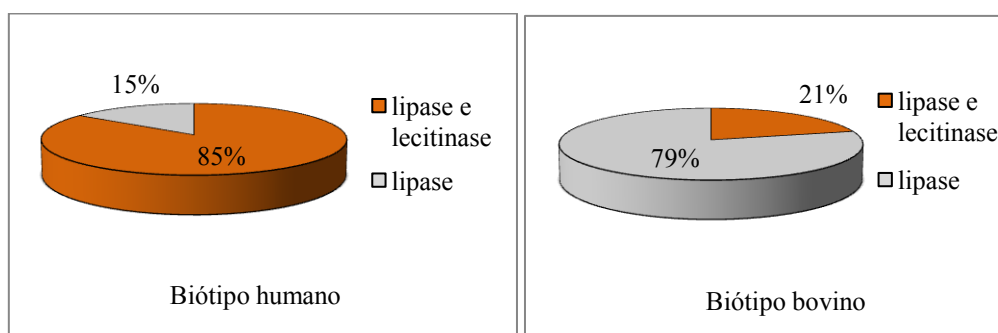


Figura 19. Reacção da lecitinase e lipase e, ou apenas lipase, nos isolados de *S. aureus* obtidos durante o fabrico do Queijo São Jorge nas Cooperativas dos Lourais e Beira e biotipificados como biótipos humanos e bovinos.

5. Conclusões

1. O processo de bactofugação, apesar de ter como função primordial a eliminação de esporos bacterianos no leite, tem influência na redução de mesófilos totais, células somáticas e *S. aureus*, apresentando-se como um meio eficaz de melhorar estas características do leite, sendo, neste caso, notoriamente benéfica a redução de uma bactéria patogénica como o *S. aureus*. Porém a bactofugação também teve efeitos negativos sobre a qualidade química do leite, já que o teor médio de sólidos isentos de gordura (SNF) e de proteína diminuíram significativamente;
2. Relativamente à evolução do crescimento de *S. aureus* durante o fabrico verificou-se que não existiram diferenças estatisticamente significativas entre a contagem de *S. aureus* do leite em cuba e no leite imediatamente antes da adição do coalho e o soro, mas existiram diferenças estatisticamente significativas entre a contagem média de *S. aureus* no leite em cuba e na coalhada e entre o soro e a coalhada, atingindo aqui as contagens mais elevadas;
3. O Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005 estipula valores máximos a verificar *“no momento em que se prevê que o número de estafilococos seja mais elevado”*, neste caso, nas contagens obtidas na coalhada na Cooperativa da Beira, o valor foi bastante inferior ao valor limiar ($m = 10^4$ ufc/g); ao passo que, na Cooperativa dos Lourais, ultrapassou o valor limiar, mas não o limite máximo admissível ($M = 10^5$ ufc/g), assumindo-se que a grande maioria dos estafilococos coagulase positivos, são neste caso, *S. aureus*. O aquecimento final, *“eozedura da coalhada”*, será um factor determinante;
4. Em relação aos resultados da biotipificação, constatou-se que 56,2% dos biótipos encontrados correspondiam a hospedeiros específicos e 43,8% a hospedeiros não específicos. Os biótipos mais prevalentes foram os biótipos com hospedeiro não específico K⁻ β⁺ A (23,4%), o biótipo bovino (22,8%) e o biótipo de aves (18,6%). Na Cooperativa dos Lourais, os biótipos mais prevalentes foram o biótipo aves, o biótipo K⁻ β⁺ A e o biótipo humano. Contrariamente, na Cooperativa da Beira, os biótipos mais frequentes foram o biótipo bovino, o biótipo não específico K⁻ β⁺ A e o biótipo de aves;
5. Uma elevada percentagem de isolados pertencentes ao biótipo humano apresentou reacções positivas para a lecitinase em comparação com isolados pertencentes ao

biótipo bovino que apresentaram baixa percentagem desta reacção. Estes resultados estão de acordo com os de outros autores;

6. Recomenda-se que o uso de luvas seja obrigatório em todas as etapas do processo de fabrico do queijo São Jorge DOP e que se estabeleçam medidas que impeçam a existência de aves dentro das fábricas;
7. Consideramos que os resultados obtidos no presente estudo poderão ser úteis na definição das estratégias a adoptar para um melhor controlo do *S. aureus*.

6. Bibliografia

- Adams, M. R., e M. M. Moss. 2008. Food Microbiology. 3th ed. RSC Publishing, UK.
- Akers, R. M. 2002. Lactation and the mammary gland. 1st ed. Iowa State Press. Blackwell Publishing Company, USA.
- Akineden, Ö., C. Annemüller, A. A. Hassan, C. LämmLer, W. Wolter, e M. Zschöck. 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8:959–964.
- Ali-Vehmas, T., P. Westphalen, e S. Markus. 1997. Binding of *Staphylococcus aureus* to milk fat globules increases resistance to penicillin-G. J. Dairy Res. 64(2):253-260.
- André, M. C., M. R. Campos, L. J. Borges, A. Kipnis, F. C. Pimenta, e Á. B. Serafini. 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. Food Control. 19:200–207.
- Arqués, J. L., E. Rodríguez, P. Gaya, M. Medina, B. Guamis, e M. Nuñez. 2004. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high pressure treatments and bacteriocin- producing lactic acid bacteria. J. Appl. Microbiol. 98:254–260.
- Arqués, J. L., S. Garde, P. Gaya, M. Medina, e M. Nuñez. 2006. *Short Communication: Inactivation of Microbial Contaminants in Raw Milk La Serena Cheese by High-Pressure Treatments.* J. Dairy Sci. 89:888–891.
- Assumpção, E. G., R. H. Piccoli-Valle, D. Hirsch, e L. R. Abreu. 2003. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 55(3):366-370.
- Bachmann, H. P., e U. Spahr. 1994. The Fate of Potentially Pathogenic Bacteria in Swiss Hard and Semihard Cheeses Made from Raw Milk. J. Dairy Sci. 78:476-483.
- Balaban, N., e A. Rasooly. 2000. Staphylococcal enterotoxins. Int. J. Food Microbiol. 61:1–10.
- Bastian, E. D., e R. J. Brown. 1996. Plasmin in milk and dairy products: an update. Int. Dairy J. 6(5):435-457.
- Batavani, R. A., S. Asri, e H. Naebzadeh. 2007. The effect of subclinical mastitis on milk composition in dairy cows. Iran. J. Vet. Res. 8(3):205-211.
- Bhakdi, S., e J. Trantum-Jensen. 1991. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 55(4):733-751.
- Bhatia, A., e S. Zahoor. 2007. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: A review. J. Clin. Diagn. Res. 1(2):188-197.
- Blowey, R., e P. Edmondson. 2010. Mastitis Control in Dairy Herds. 2nd ed. CAB International, UK.
- Boerema, J. A., R. Clemens, e G. Brightwell. 2006. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. Int. J. Food Microbiol. 107:192–201.
- Bradley, A. J. 2002. Bovine Mastitis: an Evolving Disease. Vet. J. 163:1-13.

- Coelho, S. M., E. Reinoso, I. A. Pereira, L. C. Soares, M. Demo, C. Bogni, e M. M. Souza. 2009. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.* 29(5):369-374.
- Comissão Europeia, 2003. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Staphylococcal Enterotoxins in milk products, particularly cheeses. Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health. Consultado a: 6 de Outubro de 2011. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf.
- Cretenet, M., S. Even, e Y. Le Loir. 2011. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Sci. Technol.* 91:127–150.
- Cunha, R. P., L. R. Molina, A. U. Carvalho, E. J. Facury Filho, P. M. Perreira, e M. B. Gentilini. 2008. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60(1):19-24.
- da Silva, E. R., L. S. Carmo, e N. Silva. 2005. Detection of the enterotoxin A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. *Vet. Microbiol.* 106:103–107.
- De Buyser, M. L., B. Dufour, M. Maire, e V. Lafarge. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* 67:1–17.
- Decreto Regulamentar Regional n.º 24/86/A, de 9 de Julho, que cria a Região demarcada do Queijo São Jorge.
- Delbes, C., J. Alomar, N. Chougui, J. F. Martin, e M. C. Montel. 2006. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. *J. Food Pro.* 69:2161–2167.
- Deurenberg, R. H., e E. E. Stobberingh. 2008. The evolution of *Staphylococcus aureus*: A Review. *Infect. Geneti. Evol.* 8(6):747–763.
- Devriese, L. A. 1981. Baird-Parker medium supplemented with acriflavine, polymyxins and sulphonamide for the selective isolation of *Staphylococcus aureus* from heavily contaminated materials. *J. Appl. Bacteriol.* 50(2):351–357.
- Devriese, L. A. 1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *J. Appl. Bacteriol.* 56:215-220.
- Devriese, L. A., e A. Van De Kerckhove. 1980. A comparison of methods used for testing staphylokinase (fibrinolysin) production in *Staphylococcus* strains. *Antonie van Leeuwenhoek* 46:457-465.
- Dinges, M. M., P. M. Orwin, e P. M. Schlievert. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13(1):16-34.
- Eberhart, R. J., H. C. Gilmore, L. J. Hutchinson, e S. B. Spencer. 1979. Somatic cell counts in DHI samples. *Proc. Ann. Mtg. Natl. Mastitis Counc.* Arlington, VA, USA.
- Erkmen, O. 1995. Behavior of *Staphylococcus aureus* in Turkish Feta cheese during manufacture and ripening. *J. Food Prot.* 58(11):1201–1205.

- Fagundes, H., e C. A. Oliveira. 2004. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural*. 34(4):1315-1320.
- Ferens, W. A., W. C. Davis, M. J. Hamilton, Y. H. Park, C. F. Deobald, L. Fox, e G. Bohach. 1998. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. *Infect. Immun.* 66(2):573–580.
- Fetrow, J., K. Anderson, e S. Sexton. 1988. Herd Composite Somatic Cell Counts: Average Linear Score and Weighted Average Somatic Cell count Score and Milk Production. *J. Dairy Sci.* 71(1):257-260.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1989. Milking, milk production hygiene and udder health. Data de consulta: 15 de Outubro de 2011. <http://www.fao.org/DOCREP/004/T0218E/T0218E00.HTM>.
- Fox, L. K., e J. M. Gay. 1993. Contagious mastitis. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 9:475–487.
- Fox, L. K., *et al.*, 1985. Factors related to milk loss in quarters with low somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 68:2100-2107.
- Fox, P. F., P. L. McSweeney, T. M. Cogan, e T. P. Guinee. 2004. *Major Cheese Groups in Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3th ed. Vol. 2. Elsevier Academic Press, UK.
- Freeman-Cook, L., e K. D. Freeman-Cook. 2006. *Staphylococcus aureus* Infections. Deadly Diseases and Epidemics. 1th ed. Chelsea House Publishers, USA.
- Frutuoso, G. Saudades da Terra. Livro VI. Nova ed 1998. Instituto Cultural de Ponta Delgada, Açores.
- Gandra, E. A. 2003. Identificação de *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* através de testes bioquímicos e da amplificação por PCR de sequências dos genes *coa* e *nuc*. Tese de Mestrado. Univ. Federal de Pelotas, Brasil.
- García, P., C. Madera, B. Martínez, e A. Rodríguez. 2007. Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *Int. Dairy J.* 17(10):1232-1239.
- Gervilla, R., E. Sendra, V. Ferragut, e B. Guamis. 1999. Sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus helveticus* in ovine milk subjected to high hydrostatic pressure. *J. Dairy Sci.* 82:1099–1107.
- Gervilla, R., V. Ferragut, e B. Guamis. 2001. High Hydrostatic Pressure Effects on Color and Milk-Fat Globule of Ewe's Milk. *J. Food Sci.* 66(6):880-885.
- Gill, J. J., P. M. Sabour, K. E. Leslie, e M. W. Griffiths. 2006. Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K. *J. Appl. Microbiol.* 101:377–386.
- Gillespie, B. E., e S. P. Oliver. 2005. Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. *J. Dairy Sci.* 88:3510–3518.
- Goldman, E., e L. H. Green. 2009. *Practical Handbook of Microbiology*. 2nd ed. CRC Press, USA.
- Graves, E. L., A. D. Beaulieu, e J. K. Drackley. 2007. Factors Affecting the Concentration of Sphingomyelin in Bovine Milk. *J. Dairy Sci.* 90:706–715.

- Harmon, R. J. 1994. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. *J. Dairy Sci.* 77:2103-2112.
- Harmon, R. J., e B. E. Langlois. 1986. Prevalence of minor mastitis pathogens and associated somatic cell counts. *Proc. Ann. Mtg. Natl. Inc.* 25th Annu. p. 11-23.
- Harris, B., e K. C. Bachman. 1988. Nutritional and Management Factors Affecting Solid-Non-Fat, Acidity and Freezing Point of Milk. Gainesville, Institute of Food and Agricultural Sciences (Florida Cooperative Extension Service, DS25).
- Hartleib, J., N. Köhler, R. B. Dickinson, G. S. Chhatwal, J. J. Sixma, O. M. Hartford, T. J. Foster, G. Peters, B. E. Kehrel, e M. Herrmann. 2000. Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood.* 96:2149-56.
- Haveri, M., A. Roslöf, L. Rantala, S. Pyörälä. 2007. Virulence genes of bovine *Staphylococcus aureus* from persistent and nonpersistent intramammary infections with different clinical characteristics. *J. Appl. Microbiol.* 103:993–1000.
- Hill, A., 2011. Dairy Science and Technology. University of Guelph. Data de consulta: 5 de Outubro de 2011. <http://www.foodsci.uoguelph.ca/cheese/sectionc.htm#milk-treatment>.
- Hillerton, J. E., e E. A. Berry. 2005. Treating mastitis in the cow – a tradition or an archaism. A Review. *J. Appl. Microbiol.*, 98:1250-1255.
- Hirsh, D. C., e Y. C. Zee. 1999. *Veterinary Microbiology*. 1th ed. Blackwell Science, USA.
- Honeyman, A., H. Friedman, e M. Bendinelli. 2001. *Staphylococcus aureus* Infection and Disease. Infectious Agents and Pathogenesis. 2nd ed. Springer, New York.
- Hudson, J. A., C. Billington, G. Carey-Smith, e G. Greening. 2005. Bacteriophages as biocontrol agents in food. *J. Food Prot.* 68(2):426-437.
- Ibrahim, G. F., A. K. Baldock, D. R. Radford, e L. B. Ireland. 1981. Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin A production in cheddar cheese produced with variable starter activity. *J. Food Prot.* 44:263–267.
- Ikawaty, R., E. C. Brouwer, E. V. Duijkeren, D. Mevius, J. Verhoef, e A. C. Fluit. 2010. Virulence Factors of Genotyped Bovine Mastitis *Staphylococcus aureus* Isolates in the Netherlands. *Int. J. Dairy Sci.* 5(2):60-70.
- Jay, J. M. 1994. *Microbiologia Moderna de los Alimentos*. Zaragoza. Acribia.
- Jørgensen, H. J., T. Mørk, e L. M. Rørvik. 2005. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *J. Dairy Sci.* 88:3810–3817.
- Kenny, K., R. F. Reiser, F. D. Bastida-Corcuera, e N. L. Norcross. 1993. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 31(3):706-707.
- Kongo, J. M. 2010. *São Jorge: o Queijo e a Ilha 500 anos*. 1th ed. Universidade dos Açores, Portugal.
- Lam, T. J., A. Pengov, A. Schukken, Y. H. Smith, e A. Brand. 1995. The differentiation of *Staphylococcus aureus* from other *Micrococcaceae* isolated from bovine mammary glands. *J. Appl. Bacteriol.* 79:69–72.

- Larsen, H. D., A. Huda, N. H. Eriksen, e N. E. Jensen. 2000. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. *Vet. Microbiol.* 76:153–162.
- Law, B. A., e A. Y. Tamime. 2010. *Technology of Cheesemaking*. 2nd ed. Blackwell Publishing Ltd, UK.
- Lee, C. S., F. B. Wooding, e P. Kemp. 1980. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretion, colostrum, and milk from normal cows. *J. Dairy Sci.*, 47:39-50.
- Leitner, G., O. Krifucks, A. Glickman, A. Younis, e A. Saran. 2003. *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis: virulence, antibody production and protection from challenge in a mouse model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35:99-106.
- Loir, Y. L., F. Baron, e M. Gautier. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2(1):63-76.
- López-Pedemonte, T., W. J. Brinez, A. X. Roig-Sagués, e B. Guamis. 2006. Fate of *Staphylococcus aureus* in Cheese Treated by Ultrahigh Pressure Homogenization and High Hydrostatic Pressure. *J. Dairy Sci.* 89:4536–4544.
- Malone, A. S., C. Wick, T. H. Shellhammer, e P. D. Courtney. 2003. High pressure effects on proteolytic and glycolytic enzymes involved in cheese manufacturing. *J. Dairy Sci.* 86:1139–1146.
- Matos, J. E. 1988. Epidemiological studies of *Staphylococcus aureus* infections in a dairy herd. PhD Diss. Univ. Kentucky, Lexington.
- Matos, J. E., R. J. Harmon, e B. E. Langlois. 1995. Lecithinase reaction of *Staphylococcus aureus* strains of different origin on Baird-Parker medium. *Lett. Appl. Microbiol.* 21(5):334-335.
- Medvedová, A., L. Valík, Z. Sirotná, e D. Liptáková. 2009. Growth Characterization of *Staphylococcus aureus* in Milk: a Quantitative Approach. *Czech J. Food Sci.* 27(6):443–453.
- Mehrzad, J., C. Burvenich, e M. Paape. 2010. Role of neutrophils in protection of udder from infection in high yielding dairy cows. *Iranian J. Vet. Res.* 11(2):102-118.
- Meyrand, A., S. Boutrand-Loei, S. Ray-Gueniot, C. Mazuy, C. E. Gaspard, G. Jaubert, G. Perrin, C. Lapeyre, e C. Vernozy-Rozand. 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from goats' milk. *J. Appl. Microbiol.* 85:537–544.
- Miller, R. H., M. J. Paape, L. A. Fulton, e M. M. Schutz. 1993. The relationship of milk somatic cell count to milk yield for Holstein heifers after first calving. *J. Dairy Sci.* 76:728- 733.
- Moon, J. S., A. R. Lee, H. M. Kang, E. S. Lee, Y. S. Joo, Y. H. Park, M. N. Kim, e H. C. Koo. 2007. Antibigram and Coagulase Diversity in Staphylococcal Enterotoxin - Producing *Staphylococcus aureus* from Bovine Mastitis. *J. Dairy Sci.* 90:1716–1724.
- Necidová, L., Z. Stástková, M. Pospíšilová, H. Janstová, J. Strejcek. M. Dusková, e R. Karpísková. 2009. Influence of Soft Cheese Technology on the Growth and Enterotoxin Production of *Staphylococcus aureus*. *Czech J. Food Sci.* 27(2):127–133.

- Nema, V., R. Agrawal, D. V. Kamboj, A. K. Goel, e L. Singh. 2007. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. *Int. J. Food Microbiol.* 117:29-35.
- Normanno, G., A. Firinu, S. Virgilio, G. Mula, A. Dambrosio, A. Poggiu, L. Decastelli, R. Mioni, S. Scuota, G. Bolzoni, E. D. Giannatale, A. P. Salinetti, G. L. Salandra, M. Bartoli, F. Zuccon, T. Pirino, S. Sias, A. Parisi, N. C. Quaglia, e G. V. Celano. 2005. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 98:73–79.
- Olarte, C., S. Sanz, E. Gonzalez-Fandos, e P. Torre. 2000. The effect of a commercial starter culture addition on the ripening of an artisanal goat's cheese (Cameros cheese). *J. Appl. Microbiol.* 88:421–429.
- O'Flaherty, S. O., A. Coffey, W. J. Meaney, G. F. Fitzgerald, e R. P. Ross. 2005. Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 41:274–279.
- O'Reilly, C. E., P. M. O'Connor, A. L. Kelly, T. P. Beresford, e P. M. Murphy. 2000. Use of Hydrostatic Pressure for Inactivation of Microbial Contaminants in Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(11):4890–4896.
- O'Seaghdha, M., C. J. van Schooten, S. W. Kerrigan, J. Emsley, G. J. Silverman, D. Cox, P. J. Lenting, T. J. Foster. 2006. *Staphylococcus aureus* protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *FEBS J.* 273:4831–4841.
- O'Toole, D. K. 1987. Differences in the egg yolk reaction on Baird-Parker medium between bovine and human strains of coagulase-positive staphylococci. *Lett. Appl. Microbiol.* 4:111-112.
- Oviedo-Boyso, J., J. J. Valdez-Alarcón, M. Cajero-Juárez, A. Ochoa-Zarzosa, J. E. López-Meza, A. Bravo-Patiño, e V. M. Baizabal-Aquirre. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infection.* 54:399-409.
- Owens, J. J., e P. C. L. John. 1975. The Egg Yolk and Lipolytic Reactions of Coagulase Positive Staphylococci. *J. App. Bacteriol.* 39:23-30.
- Paape, M. J., J. Mehrzad, X. Zhao, J. Dettloux, e C. Burvenich. 2002a. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 7(2):109-121.
- Paape, M. J., K. Shafer-Weaver, A. V. Capuco, K. Van Oostveldt, e C. Burvenich. 2002b. Immune Surveillance of Mammary Tissue by Phagocytic Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 480:259-277.
- Park, P. W., T. J. Foster, E. Nishi, S. J. Duncan, M. Klagsbrun, e Y. Chen. 2004. Activation of Syndecan-1 Ectodomain Shedding by *Staphylococcus aureus* α -Toxin and β -Toxin. *J. Biol. Chem.* 279(1):251-258.
- Peles, F., M. Wagner, L. Varga, I. Hein, P. Rieck, K. Gutser, P. Keresztúri, G. Kardos, I. Turcsányi, B. Béri, e A. Szabó. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *Int. J. Food Microbiol.* 118:186–193.

- Pereira, G. I. 2006. Dinâmica populacional de *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina A inoculado em Queijo Prato. Tese de Mestrado. Univ. Federal de Lavras, Brasil.
- Pereira, C. I., J. A. Graça, N. S. Ogando, A. M. Gomes, e F. X. Malcata. 2009. Bacterial dynamics in model cheese systems, aiming at safety and quality of Portuguese-style traditional ewe's cheeses. *J. Food Prot.* 72(11):2243-51. (Abstr.)
- Persson, K., C. H. Sandgren, e H. Rodriguez-Martinez. 1992. Studies of endotoxin-induced neutrophil migration in bovine teat tissues, using indium-111-labeled neutrophils and biopsies. *Am. J. Vet. Res.* 53(12):2235-2240.
- Peterson, P. K., J. Verhoef, L. D. Sabath, e P. G. Quie. 1977. Effect of Protein A on Staphylococcal Opsonization. *Infect. Immun.* 15(3):760-764.
- Petersson-Wolfe, C. S., I. K. Mullarky, e G. M. Jones. 2010. *Staphylococcus aureus* Mastitis: Cause, Detection, and Control. Virginia Cooperative Extension. Publication 404-229.
- Pflanzer, S. B., A. G. Cruz, C. L. Hatanaka, M. L. Gigante, L. M. Spadoti, e M. Cristianini. 2008. Revisão: Efeito do processamento por alta pressão hidrostática nas características físico-químicas, microbiológicas e nutricionais do leite. *Braz. J. Food Technol.* 11(4):241-251.
- Phuektes, P., P. D. Mansell, e G. F. Browning. 2001. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and Streptococcal causes of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 84:1140–1148.
- Prescott, L. M., D. A. Klein, e J. P. Harley. 2002. Microbiology. 5th ed. The McGraw–Hill Companies, New York.
- Pyörälä, S. 2003. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. Review article. *Vet. Res.* 34:565–578.
- Raubertas, R. F., e G. E. Shook. 1982. Relationship between lactation measures of somatic cell concentration and milk yield. *J. Dairy Sci.* 65:419-425.
- Rebelo, E. L. *Notas Açoreanas*, Vol. IV, in Arquivo dos Açores, Ponta Delgada.
- Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal.
- Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios.
- Reneau, J. 1985. Using DHI Somatic Cell Counts. *Proc. Ann. Mtg. Natl. Mastitis Counc.* 24:73-85.
- Roberts, D., e M. Greenwood. 2003. *Practical Food Microbiology*. 3th ed. Blackwell Publishing, USA.
- Sá, M. E., M. L. Cunha, A. O. Elias, C. Victória, e H. Langoni. 2004. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41:320-326.
- Scherrer, D., S. Corti, J. E. Muehlherr, C. Zweifel, e R. Stephan. 2004. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Vet. Microbiol.* 101:101–107.

- Scott, J. E., R. A. Wilbey, e R. K. Robinson. 1998. *Cheesemaking Practice*. 3th ed. Springer, New York.
- Serieys, F. 1985. Concentration cellulaire du lait individual de vache: Influence de l'etat d'infection mammaire, du numero, du stade de lactation et de la production laitière. *Ann. Rech. Vet.* 16(3):255-261.
- Shuster, D. E., R. J. Harmon, J. A. Jackson, e R. W. Hemken. 1991a. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. *J. Dairy Sci.* 74 (11):3763-3774.
- Shuster, D. E., R. J. Harmon, J. A. Jackson, e R. W. Hemken. 1991b. Reduced lactational performance following intravenous endotoxin administration to dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74(10):3407-3411.
- Silva, E. C., M. A. Maciel, F. L. Melo, M. G. Antas, A. M. Bezerra Neto, e M. A. Rabelo. 2007. *Staphylococcus aureus*: aspectos biológicos e patogénicos. *An. Fac. Med. Univ. Fed. Pernamb. Recife.* 52(2):168-172.
- Smith, J. L., R. L. Buchanan, e S. A. Palumbo. 1983. Effects of environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. *J. Food Protec.* 46:545-555.
- Stephan, R., C. Annemüller, A. A. Hassan, C. LämmLer. 2001. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet. Microbiol.* 79:373–382.
- Sutra, L., e B. Poutrel. 1994. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 40:79-89.
- Tang, Y. W., e C. W. Stratton. 2006. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Springer, New York.
- Thiebaud, M., E. Dumay, L. Picart, J. P. Guiraud, e J. C. Cheftel. 2003. High-pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *Int. Dairy J.* 13(6):427–439.
- Todar, K., 2001. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Principles of bacterial Pathogenecity – Colonization and Invasion by Bacterial Pathogens. Data de consulta: 21 de Setembro de 2011. <http://www.textbookofbacteriology.net/colonization.html>.
- Tortora, G. J., B. R. Funke, e C. L. Case. 2010. *Microbiology: an Introduction*. 10th ed. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Trujillo, A. J., M. Capellas, J. Saldo, R. Gervilla, e B. Guamis. 2002. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: A review. *Inn. Food Sci. Emerg. Techn.* 3 (4):295–307.
- Uniqueijo, 2011. Data de consulta: 29 de Maio de 2011. <http://www.portais.ws/uniqueijo/>.
- Urech, E., Z. Puhán, e M. Schällibaum. 1998. Changes in Milk Protein Fraction as Affected by Subclinical Mastitis. *J. Dairy Sci.* 82:2402–2411.
- Viguier, C., S. Arora, N. Gilmartin, K. Welbeck, e R. O'Kennedy. 2009. Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends in Biotechnology.* 27(8):486-493.
- Ward, G. E., e L. H. Schultz. 1972. Relationship of somatic cells in quarter milk to type of bacteria and production. *J. Dairy Sci.* 55:1428-1431.

- Watts, J. L. 1988. Etiological Agents of Bovine Mastitis. *Vet. Microbiol.* 16:41-66.
- Wick, C., U. Nienaber, O. Anggraeni, T. H. Shelhammer, e P. D. Courtney. 2004. Texture, proteolysis and viable lactic acid bacteria in commercial Cheddar cheeses treated with high pressure. *J. Dairy Res.* 71:107–115.
- Winn, W. Jr., S. Allen, W. Janda, E. Koneman, G. Procop, P. Schreckenberger, e G. Woods. 2006. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Lippincott Williams e Wilkins, Philadelphia.
- Wong, A. C., e M. S. Bergdoll. 2002. Staphylococcal food poisoning. *In: Foodborne Diseases.* 2nd ed. Academic Press, Amsterdam. p.231-248.
- Zadoks, R. N. 2002. Molecular and mathematical epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis in dairy herds. PhD Diss. Utrecht Univ. Faculty of Veterinary Medicine, Netherlands.

7. Anexos

7.1. Anexo 1

Quadro 1.1. Contagem de células somáticas, *S. aureus* e mesófilos totais no leite cru da Cooperativa da Beira, ao longo de 8 semanas (dados SERCLAT).

Beira leite cru	CCS/mL	<i>S. aureus</i> ufc/mL	Mesófilos totais ufc/mL
3ª semana	190000	580	32000
5ª semana	170000	1170	24000
6ª semana	164000	650	20000
7ª semana	149000	790	128000
8ª semana	41000	1560	2228000
10ª semana	155000	1620	65000
11ª semana	108000	1950	76000
12ª semana	108000	1000	5000000

Quadro 1.2. Contagem de células somáticas, *S. aureus* e mesófilos totais no leite bactofugado da Cooperativa da Beira, ao longo de 8 semanas (dados SERCLAT).

Beira leite bactofugado	CCS/mL	<i>S. aureus</i> ufc/mL	Mesófilos totais ufc/mL
3ª semana	15000	20	10000
5ª semana	11000	10	10000
6ª semana	10000	0	10000
7ª semana	10000	10	10000
8ª semana	17000	30	10000
10ª semana	11000	40	10000
11ª semana	12000	60	10000
12ª semana	5000	0	234000

Quadro 1.3. Contagem de células somáticas, *S. aureus* e mesófilos totais no leite cru da Cooperativa dos Lourais, ao longo de 8 semanas (dados SERCLAT).

Lourais leite cru	CCS/mL	<i>S. aureus</i> ufc/mL	Mesófilos totais ufc/mL
3ª semana	59000	1440	1659000
5ª semana	45000	210	158000
6ª semana	24000	400	377000
7ª semana	21000	1170	5000000
8ª semana	156000	290	28000
10ª semana	31000	340	658000
11ª semana	31000	1050	906000
12ª semana	25000	1140	863000

7.2. Anexo 2

Quadro 2.1. Teor de gordura, proteína e SNF no leite cru da Cooperativa da Beira, ao longo de 8 semanas (dados SERCLAT).

Beira leite cru	gordura % (m/v)	proteína % (m/v)	SNF
3ª semana	3,38	3,24	8,82
5ª semana	3,45	3,27	8,94
6ª semana	3,35	3,26	8,93
7ª semana	3,23	3,23	8,94
8ª semana	3,06	3,26	8,94
9ª semana	3,31	3,19	8,82
10ª semana	3,05	3,22	8,89
11ª semana	2,96	3,21	8,91

Quadro 2.2. Teor de gordura, proteína e SNF no leite bactofugado da Cooperativa da Beira, ao longo de 8 semanas (dados SERCLAT).

Beira leite bactofugado	gordura % (m/v)	proteína % (m/v)	SNF
3ª semana	3,5	3,15	8,72
5ª semana	3,5	3,15	8,8
6ª semana	3,37	3,16	8,88
7ª semana	3,09	3,09	8,81
8ª semana	3,3	3,02	8,6
9ª semana	3,26	3,02	8,58
10ª semana	3,23	3,2	8,87
11ª semana	3,11	3,18	8,87

Quadro 2.3. Teor de gordura, proteína e SNF no leite cru da Cooperativa dos Lourais, ao longo de 8 semanas (dados SERCLAT).

Lourais leite cru	gordura % (m/v)	proteína % (m/v)	SNF
3ª semana	3,28	3,3	9
5ª semana	3,15	3,34	9,11
6ª semana	2,79	3,35	9,12
7ª semana	2,92	3,33	9,02
8ª semana	3,2	3,18	8,77
9ª semana	3,1	3,25	8,99
10ª semana	3,16	3,29	9,07
11ª semana	3,18	3,23	8,99

7.3. Anexo 3

Quadro 3.1. Contagem de *S. aureus* ao longo do fabrico de queijo na Cooperativa da Beira, em 5 momentos.

Semanas	Leite cuba (ufc/mL)	Soro fermento (ufc/mL)	Leite antes coalho (ufc/mL)	Soro (ufc/mL)	Coalhada (ufc/mL)
1	40	80	60	0	6600
2	20	160	50	0	2000
3	20	10	10	0	500
4	10	360	50	80	1700
5	10	4000	20	130	1300
6	0	10	10	0	500
7	10	0	20	0	800
8	30	0	10	20	200
9	10	0	10	0	300
10	40	0	20	0	4400
11	60	0	40	160	2200
12	0	20	20	210	300

Quadro 3.2. Contagem de *S. aureus* ao longo do fabrico de queijo na Cooperativa dos Lourais, em 5 momentos.

Semanas	Leite cuba (ufc/mL)	Soro fermento (ufc/mL)	Leite antes coalho (ufc/mL)	Soro (ufc/mL)	Coalhada (ufc/mL)
1	4000	3420	8600	2200	109000
2	1860	400	2250	2100	41000
3	1440	3000	1760	210	24800
4	300	30	270	2900	56000
5	210	70	460	620	30000
6	400	950	560	540	36000
7	1170	530	1500	1800	165000
8	290	960	200	150	24700
9	150	10	390	210	22400
10	340	40	100	0	14100
11	1050	930	440	390	40000
12	1140	50	540	540	40000

7.4. Anexo 4

Quadro 4.1. Output do teste de Mann-Whitney referente à contagem de mesófilos totais no leite cru na Cooperativa da Beira e na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 8 semanas.

Ranks

	Cooperativa	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Mesófilos Totais leite cru	Beira	8	6,81	54,50
	Lourais	8	10,19	81,50
	Total	16		

Test Statistics(b)

	Mesófilos Totais leite cru
Mann-Whitney U	18,500
Wilcoxon W	54,500
Z	-1,419
Asymp. Sig. (2-tailed)	,156
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,161(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: 1-beira 2-lourais

Quadro 4.2. Output do teste de Mann-Whitney referente à CCS no leite cru na Cooperativa da Beira e na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 8 semanas.

Ranks

	Cooperativa	N	Mean Rank	Sum of Ranks
CCS leite cru	Beira	8	5,38	43,00
	Lourais	8	11,63	93,00
	Total	16		

Test Statistics(b)

	CCS
Mann-Whitney U	7,000
Wilcoxon W	43,000
Z	-2,629
Asymp. Sig. (2-tailed)	,009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,007(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: 1-beira 2-lourais

Quadro 4.3. Output do teste de Mann-Whitney referente à contagem de *S. aureus* no leite cru na Cooperativa da Beira e na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 8 semanas.

Ranks

	Cooperativa	N	Mean Rank	Sum of Ranks
<i>S. aureus</i> leite cru	Beira	8	10,31	82,50
	Lourais	8	6,69	53,50
	Total	16		

Test Statistics(b)

	<i>S. aureus</i> leite cru
Mann-Whitney U	17,500
Wilcoxon W	53,500
Z	-1,524
Asymp. Sig. (2-tailed)	,128
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,130(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: 1-beira 2-lourais

7.5. Anexo 5

Quadro 5.1. Correlação de Spearman entre a CCS e a contagem de mesófilos totais no leite cru na Cooperativa da Beira, ao longo de 8 semanas.

Correlations

			CCS Beira leite cru	Mesófilos Totais Beira leite cru
Spearman's rho	CCS Beira leite cru	Correlation Coefficient	1,000	-,826(*)
		Sig. (2-tailed)	.	,011
		N	8	8
	Mesófilos Totais Beira leite cru	Correlation Coefficient	-,826(*)	1,000
		Sig. (2-tailed)	,011	.
		N	8	8

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Quadro 5.2. Correlação de Spearman entre a CCS e a contagem de *S. aureus* no leite cru na Cooperativa da Beira, ao longo de 8 semanas.

Correlations

			<i>S. aureus</i> Beira leite cru	CCS Beira leite cru
Spearman's rho	<i>S. aureus</i> Beira leite cru	Correlation Coefficient	1,000	-,575
		Sig. (2-tailed)	.	,136
		N	8	8
	CCS Beira leite cru	Correlation Coefficient	-,575	1,000
		Sig. (2-tailed)	,136	.
		N	8	8

Quadro 5.3. Correlação de Spearman entre a contagem de mesófilos totais e de *S. aureus* no leite cru na Cooperativa da Beira, ao longo de 8 semanas.

Correlations

			Mesófilos Totais Beira leite cru	<i>S. aureus</i> Beira leite cru
Spearman's rho	Mesófilos Totais Beira leite cru	Correlation Coefficient	1,000	,310
		Sig. (2-tailed)	.	,456
		N	8	8
	<i>S. aureus</i> Beira leite cru	Correlation Coefficient	,310	1,000
		Sig. (2-tailed)	,456	.
		N	8	8

7.6. Anexo 6

Quadro 6.1. Correlação de Spearman entre a CCS e a contagem de mesófilos totais no leite cru na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 8 semanas.

Correlations

			CCS Lourais leite cru	Mesófilos Totais Lourais leite cru
Spearman's rho	CCS Lourais leite cru	Correlation Coefficient	1,000	-,455
		Sig. (2-tailed)	.	,257
		N	8	8
	Mesófilos Totais Lourais leite cru	Correlation Coefficient	-,455	1,000
		Sig. (2-tailed)	,257	.
		N	8	8

Quadro 6.2. Correlação de Spearman entre a CCS e a contagem de *S. aureus* no leite cru na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 8 semanas.

Correlations

			<i>S. aureus</i> Lourais leite cru	CCS Lourais leite cru
Spearman's rho	<i>S. aureus</i> Lourais leite cru	Correlation Coefficient	1,000	-,359
		Sig. (2-tailed)	.	,382
		N	8	8
	CCS Lourais leite cru	Correlation Coefficient	-,359	1,000
		Sig. (2-tailed)	,382	.
		N	8	8

Quadro 6.3. Correlação de Spearman entre a contagem de mesófilos totais e de *S. aureus* no leite cru na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 8 semanas.

Correlations

			Mesófilos Totais Lourais leite cru	<i>S. aureus</i> Lourais leite cru
Spearman's rho	Mesófilos Totais Lourais leite cru	Correlation Coefficient	1,000	,905(**)
		Sig. (2-tailed)	.	,002
		N	8	8
	<i>S. aureus</i> Lourais leite cru	Correlation Coefficient	,905(**)	1,000
		Sig. (2-tailed)	,002	.
		N	8	8

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

7.7. Anexo 7

Quadro 7.1. Output do teste de Wilcoxon referente à contagem de mesófilos totais no leite cru e bactofugado da Cooperativa da Beira, ao longo de 8 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Mesófilos Totais Beira leite bactofugado - Mesófilos Totais Beira leite cru	Negative Ranks	8(a)	4,50	36,00
	Positive Ranks	0(b)	,00	,00
	Ties	0(c)		
	Total	8		

a Mesófilos Totais Beira leite bactofugado < Mesófilos Totais Beira leite cru

b Mesófilos Totais Beira leite bactofugado > Mesófilos Totais Beira leite cru

c Mesófilos Totais Beira leite bactofugado = Mesófilos Totais Beira leite cru

Test Statistics(b)

	Mesófilos Totais Beira leite bactofugado - Mesófilos Totais Beira leite cru
Z	-2,521(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,012
Exact Sig. (2-tailed)	,008
Exact Sig. (1-tailed)	,004
Point Probability	,004

a Based on positive ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Quadro 7.2. Output do teste de Wilcoxon referente à CCS no leite cru e bactofugado da Cooperativa da Beira, ao longo de 8 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
CCS Beira leite bactofugado - CCS Beira leite cru	Negative Ranks	8(a)	4,50	36,00
	Positive Ranks	0(b)	,00	,00
	Ties	0(c)		
	Total	8		

a CCS Beira leite bactofugado < CCS Beira leite cru

b CCS Beira leite bactofugado > CCS Beira leite cru

c CCS Beira leite bactofugado = CCS Beira leite cru

Test Statistics(b)

	CCS Beira leite bactofugado - CCS Beira leite cru
Z	-2,521(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,012
Exact Sig. (2-tailed)	,008
Exact Sig. (1-tailed)	,004
Point Probability	,004

a Based on positive ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Quadro 7.3. Output do teste de Wilcoxon referente à contagem de *S. aureus* no leite cru e bactofugado da Cooperativa da Beira, ao longo de 8 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
<i>S.aureus</i> Beira leite	Negative Ranks	8(a)	4,50	36,00
bactofugado - <i>S. aureus</i>	Positive Ranks	0(b)	,00	,00
Beira leite cru	Ties	0(c)		
	Total	8		

a *S.aureus* Beira leite bactofugado < *S. aureus* Beira leite cru

b *S.aureus* Beira leite bactofugado > *S. aureus* Beira leite cru

c *S.aureus* Beira leite bactofugado = *S. aureus* Beira leite cru

Test Statistics(b)

	<i>S.aureus</i> Beira leite bactofugado - <i>S. aureus</i> Beira leite cru
Z	-2,521(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,012
Exact Sig. (2-tailed)	,008
Exact Sig. (1-tailed)	,004
Point Probability	,004

a Based on positive ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

7.8. Anexo 8

Quadro 8.1. Output do teste de Mann-Whitney referente ao teor de SNF no leite cru na Cooperativa da Beira e na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 8 semanas.

Ranks

Cooperativa		N	Mean Rank	Sum of Ranks
SNF leite cru	Beira	8	5,50	44,00
	Lourais	8	11,50	92,00
Total		16		

Test Statistics(b)

	SNF leite cru
Mann-Whitney U	8,000
Wilcoxon W	44,000
Z	-2,532
Asymp. Sig. (2-tailed)	,011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,010(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: 1-beira 2-lourais

Quadro 8.2. Output do teste de Mann-Whitney referente ao teor de gordura no leite cru na Cooperativa da Beira e na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 8 semanas.

Ranks

Cooperativa		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Gordura leite cru	Beira	8	10,13	81,00
	Lourais	8	6,88	55,00
Total		16		

Test Statistics(b)

	Gordura leite cru
Mann-Whitney U	19,000
Wilcoxon W	55,000
Z	-1,365
Asymp. Sig. (2-tailed)	,172
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,195(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: 1-beira 2-lourais

Quadro 8.3. Output do teste de Mann-Whitney referente ao teor de proteína no leite cru na Cooperativa da Beira e na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 8 semanas.

Ranks

Cooperativa		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Proteína leite cru	Beira	8	6,44	51,50
	Lourais	8	10,56	84,50
	Total	16		

Test Statistics(b)

	Proteína leite cru
Mann-Whitney U	15,500
Wilcoxon W	51,500
Z	-1,735
Asymp. Sig. (2-tailed)	,083
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,083(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: 1-beira 2-lourais

7.9. Anexo 9

Quadro 9.1. Output do teste de Wilcoxon referente ao teor de SNF no leite cru e bactofugado da Cooperativa da Beira, ao longo de 8 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
SNF Beira leite	Negative Ranks	8(a)	4,50	36,00
bactofugado - SNF	Positive Ranks	0(b)	,00	,00
Beira leite cru	Ties	0(c)		
	Total	8		

a SNF Beira leite bactofugado < SNF Beira leite cru

b SNF Beira leite bactofugado > SNF Beira leite cru

c SNF Beira leite bactofugado = SNF Beira leite cru

Test Statistics(b)

	SNF Beira leite bactofugado - SNF Beira leite cru
Z	-2,521(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,012
Exact Sig. (2-tailed)	,008
Exact Sig. (1-tailed)	,004
Point Probability	,004

a Based on positive ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Quadro 9.2. Output do teste de Wilcoxon referente ao teor de gordura no leite cru e bactofugado da Cooperativa da Beira, ao longo de 8 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Gordura Beira leite	Negative Ranks	2(a)	3,75	7,50
bactofugado - Gordura	Positive Ranks	6(b)	4,75	28,50
Beira leite cru	Ties	0(c)		
	Total	8		

a Gordura Beira leite bactofugado < Gordura Beira leite cru

b Gordura Beira leite bactofugado > Gordura Beira leite cru

c Gordura Beira leite bactofugado = Gordura Beira leite cru

Test Statistics(b)

	Gordura Beira leite bactofugado - Gordura Beira leite cru
Z	-1,472(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,141
Exact Sig. (2-tailed)	,164
Exact Sig. (1-tailed)	,082
Point Probability	,016

a Based on negative ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Quadro 9.3. Output do teste de Wilcoxon referente ao teor de proteína no leite cru e bactofugado da Cooperativa da Beira, ao longo de 8 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Proteína Beira leite bactofugado - Proteína Beira leite cru	Negative Ranks	8(a)	4,50	36,00
	Positive Ranks	0(b)	,00	,00
	Ties	0(c)		
	Total	8		

a Proteína Beira leite bactofugado < Proteína Beira leite cru

b Proteína Beira leite bactofugado > Proteína Beira leite cru

c Proteína Beira leite bactofugado = Proteína Beira leite cru

Test Statistics(b)

	Proteína Beira leite bactofugado - Proteína Beira leite cru
Z	-2,521(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,012
Exact Sig. (2-tailed)	,008
Exact Sig. (1-tailed)	,004
Point Probability	,004

a Based on positive ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

7.10. Anexo 10

Quadro 10.1. Output do teste de Wilcoxon referente à contagem de *S. aureus* entre o leite cru na cuba e leite antes do coalho na Cooperativa da Beira, ao longo de 12 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
<i>S.aureus</i> Beira leite antes coalho - <i>S.aureus</i> Beira leite cuba	Negative Ranks	4(a)	5,88	23,50
	Positive Ranks	7(b)	6,07	42,50
Ties		1(c)		
Total		12		

a *S.aureus* Beira leite antes coalho < *S.aureus* Beira leite cuba

b *S.aureus* Beira leite antes coalho > *S.aureus* Beira leite cuba

c *S.aureus* Beira leite antes coalho = *S.aureus* Beira leite cuba

Test Statistics(b)

	<i>S.aureus</i> Beira leite antes coalho - <i>S.aureus</i> Beira leite cuba
Z	-,857(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,391
Exact Sig. (2-tailed)	,433
Exact Sig. (1-tailed)	,216
Point Probability	,021

a Based on negative ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Quadro 10.2. Output do teste de Wilcoxon referente à contagem de *S. aureus* entre o leite cru na cuba e o soro na Cooperativa da Beira, ao longo de 12 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
<i>S.aureus</i> Beira soro - <i>S.aureus</i> Beira leite cuba	Negative Ranks	7(a)	4,00	28,00
	Positive Ranks	4(b)	9,50	38,00
Ties		1(c)		
Total		12		

a *S.aureus* Beira soro < *S.aureus* Beira leite cuba

b *S.aureus* Beira soro > *S.aureus* Beira leite cuba

c *S.aureus* Beira soro = *S.aureus* Beira leite cuba

Test Statistics(b)

	<i>S.aureus</i> Beira soro - <i>S.aureus</i> Beira leite cuba
Z	-,446(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,656
Exact Sig. (2-tailed)	,683
Exact Sig. (1-tailed)	,341
Point Probability	,009

a Based on negative ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Quadro 10.3. Output do teste de Wilcoxon referente à contagem de *S. aureus* entre o soro e leite antes do coalho na Cooperativa da Beira, ao longo de 12 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
<i>S.aureus</i> Beira soro - <i>S.aureus</i> Beira leite antes coalho	Negative Ranks	7(a)	5,07	35,50
	Positive Ranks	5(b)	8,50	42,50
	Ties	0(c)		
	Total	12		

- a *S.aureus* Beira soro < *S.aureus* Beira leite antes coalho
b *S.aureus* Beira soro > *S.aureus* Beira leite antes coalho
c *S.aureus* Beira soro = *S.aureus* Beira leite antes coalho

Test Statistics(b)

	<i>S.aureus</i> Beira soro - <i>S.aureus</i> Beira leite antes coalho
Z	-,276(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,783
Exact Sig. (2-tailed)	,804
Exact Sig. (1-tailed)	,402
Point Probability	,012

- a Based on negative ranks.
b Wilcoxon Signed Ranks Test

Quadro 10.4. Output do teste de Wilcoxon referente à contagem de *S. aureus* entre o leite cru na cuba e na coalhada na Cooperativa da Beira, ao longo de 12 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
<i>S.aureus</i> Beira coalhada - <i>S.aureus</i> Beira leite cuba	Negative Ranks	0(a)	,00	,00
	Positive Ranks	12(b)	6,50	78,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		

- a *S.aureus* Beira coalhada < *S.aureus* Beira leite cuba
b *S.aureus* Beira coalhada > *S.aureus* Beira leite cuba
c *S.aureus* Beira coalhada = *S.aureus* Beira leite cuba

Test Statistics(b)

	<i>S.aureus</i> Beira coalhada - <i>S.aureus</i> Beira leite cuba
Z	-3,059(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

- a Based on negative ranks.
b Wilcoxon Signed Ranks Test

Quadro 10.5. Output do teste de Wilcoxon referente à contagem de *S. aureus* entre o soro e a coalhada na Cooperativa da Beira, ao longo de 12 semanas.

Ranks

	N	Mean Rank	Sum of Ranks
<i>S.aureus</i> Beira coalhada - Negative Ranks	0(a)	,00	,00
<i>S.aureus</i> Beira soro Positive Ranks	12(b)	6,50	78,00
Ties	0(c)		
Total	12		

a *S.aureus* Beira coalhada < *S.aureus* Beira soro

b *S.aureus* Beira coalhada > *S.aureus* Beira soro

c *S.aureus* Beira coalhada = *S.aureus* Beira soro

Test Statistics(b)

	<i>S.aureus</i> Beira coalhada - <i>S.aureus</i> Beira soro
Z	-3,061(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Based on negative ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

7.11. Anexo 11

Quadro 11.1. Output do teste de Wilcoxon referente à contagem de *S. aureus* entre o leite cru na cuba e o leite antes do coalho na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 12 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
<i>S.aureus</i> Lourais leite antes coalho - <i>S.aureus</i> Lourais leite cuba	Negative Ranks	5(a)	5,70	28,50
	Positive Ranks	7(b)	7,07	49,50
	Ties	0(c)		
	Total	12		

a *S.aureus* Lourais leite antes coalho < *S.aureus* Lourais leite cuba

b *S.aureus* Lourais leite antes coalho > *S.aureus* Lourais leite cuba

c *S.aureus* Lourais leite antes coalho = *S.aureus* Lourais leite cuba

Test Statistics(b)

	<i>S.aureus</i> Lourais leite antes coalho - <i>S.aureus</i> Lourais leite cuba
Z	-,824(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,410
Exact Sig. (2-tailed)	,435
Exact Sig. (1-tailed)	,217
Point Probability	,011

a Based on negative ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Quadro 11.2. Output do teste de Wilcoxon referente à contagem de *S. aureus* entre o leite cru na cuba e o soro na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 12 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
<i>S.aureus</i> Lourais soro - <i>S.aureus</i> Lourais leite cuba	Negative Ranks	6(a)	7,42	44,50
	Positive Ranks	6(b)	5,58	33,50
	Ties	0(c)		
	Total	12		

a *S.aureus* Lourais soro < *S.aureus* Lourais leite cuba

b *S.aureus* Lourais soro > *S.aureus* Lourais leite cuba

c *S.aureus* Lourais soro = *S.aureus* Lourais leite cuba

Test Statistics(b)

	<i>S.aureus</i> Lourais soro - <i>S.aureus</i> Lourais leite cuba
Z	-,432(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,666
Exact Sig. (2-tailed)	,691
Exact Sig. (1-tailed)	,346
Point Probability	,014

a Based on positive ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Quadro 11.3. Output do teste de Wilcoxon referente à contagem de *S. aureus* entre o leite antes do coalho e o soro na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 12 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
<i>S.aureus</i> Lourais soro - <i>S.aureus</i> Lourais leite antes coalho	Negative Ranks	8(a)	5,25	42,00
	Positive Ranks	3(b)	8,00	24,00
	Ties	1(c)		
	Total	12		

a *S.aureus* Lourais soro < *S.aureus* Lourais leite antes coalho

b *S.aureus* Lourais soro > *S.aureus* Lourais leite antes coalho

c *S.aureus* Lourais soro = *S.aureus* Lourais leite antes coalho

Test Statistics(b)

	<i>S.aureus</i> Lourais soro - <i>S.aureus</i> Lourais leite antes coalho
Z	-,801(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,423
Exact Sig. (2-tailed)	,451
Exact Sig. (1-tailed)	,226
Point Probability	,013

a Based on positive ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Quadro 11.4. Output do teste de Wilcoxon referente à contagem de *S. aureus* entre o leite cru na cuba e a coalhada na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 12 semanas.

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
<i>S.aureus</i> Lourais coalhada - <i>S.aureus</i> Lourais leite cuba	Negative Ranks	0(a)	,00	,00
	Positive Ranks	12(b)	6,50	78,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		

a *S.aureus* Lourais coalhada < *S.aureus* Lourais leite cuba

b *S.aureus* Lourais coalhada > *S.aureus* Lourais leite cuba

c *S.aureus* Lourais coalhada = *S.aureus* Lourais leite cuba

Test Statistics(b)

	<i>S.aureus</i> Lourais coalhada - <i>S.aureus</i> Lourais leite cuba
Z	-3,059(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Based on negative ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

Quadro 11.5. Output do teste de Wilcoxon referente à contagem de *S. aureus* entre o soro e a coalhada na Cooperativa dos Lourais, ao longo de 12 semanas.

		Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
<i>S.aureus</i> Lourais coalhada - <i>S.aureus</i> Lourais soro	Negative Ranks	0(a)	,00	,00
	Positive Ranks	12(b)	6,50	78,00
	Ties	0(c)		
	Total	12		

a *S.aureus* Lourais coalhada < *S.aureus* Lourais soro

b *S.aureus* Lourais coalhada > *S.aureus* Lourais soro

c *S.aureus* Lourais coalhada = *S.aureus* Lourais soro

Test Statistics(b)	
	<i>S.aureus</i> Lourais coalhada - <i>S.aureus</i> Lourais soro
Z	-3,059(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,002
Exact Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. (1-tailed)	,000
Point Probability	,000

a Based on negative ranks.

b Wilcoxon Signed Ranks Test

7.12. Anexo 12

Quadro 12.1. Distribuição dos 167 biótipos de isolados de *S. aureus* em biótipos pela Cooperativa dos Lourais e pela Cooperativa da Beira.

Biótipo	Lourais n° de biótipos (%)	Beira n° de biótipos (%)
- humano	18 (18,8)	2 (2,8)
- aves	23 (24,0)	8 (11,3)
- bovino	14 (14,6)	24 (33,8)
- ovino	1 (1,0)	4 (5,6)
K ⁺ β ⁺ A	0	0
K ⁻ β ⁺ C	7 (7,3)	5 (7,0)
K ⁻ β ⁺ A	20 (20,8)	19 (26,8)
K ⁺ β ⁻ A	12 (12,5)	5 (7,0)
K ⁻ β ⁻ C	1 (1,0)	4 (5,6)
Total	98 (100%)	71 (100%)

Quadro 12.2. Presença da reacção da lecitinase e lipase e apenas lipase nos isolados de *S. aureus* biotipificados como humanos e bovinos.

Reacção	Biótipo humano	Biótipo Bovino
lipase e lecitinase	17	8
lipase	3	30