

MANUELA FIGUEIROA LYRA DE FREITAS

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE QUEIJOS DE COALHO E
LEITE DE VACAS COM MASTITE NO ESTADO DE PERNAMBUCO,
BRASIL**

RECIFE – 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
***STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADOS DE QUEIJOS DE COALHO E**
LEITE DE VACAS COM MASTITE NO ESTADO DE PERNAMBUCO,
BRASIL

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Nutrição do Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito para a
obtenção do título de Doutor em
Nutrição.

RECIFE - 2006

Freitas, Manuela Figueiroa Lyra de
Caracterização fenotípica e genotípica de
Staphylococcus spp. isolados de queijo de coalho e
leite de vacas com mastite no Estado de
Pernambuco, Brasil / Manuela Figueiroa Lyra de
Freitas. – Recife : O Autor, 2006.
ix, 209 folhas ; il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Nutrição, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Ciência dos alimentos – Microbiologia. 2.
Staphylococcus spp. – Caracterização fenotípica e
genotípica – Isolados de queijo coalho e leite de
vacas com mastite. 3. Toxinas estafilocócicas –
Utilização da técnica de PCR (Reação em Cadeia da
Polimerase). 4. Estafilococos e antibióticos –
Resistência microbiana. 5. Mastite bovina –
Staphylococcus aureus – Biologia molecular. I.
Título.

612.39
612.3

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2006-117

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE QUEIJOS DE COALHO E
LEITE DE VACAS COM MASTITE NO ESTADO DE PERNAMBUCO,
BRASIL**

Doutoranda: Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Orientadora: Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford

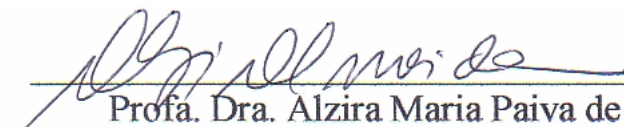
Co-Orientadora: Dra. Tereza Cristina Leal Balbino

Recife - 2006

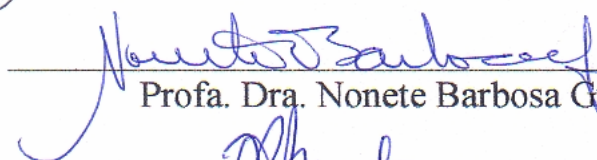
**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
STAPHYLOCOCCUS SPP. ISOLADOS DE QUEIJOS DE COALHO E
LEITE DE VACAS COM MASTITE NO ESTADO DE PERNAMBUCO,
BRASIL**

MANUELA FIGUEIROA LYRA DE FREITAS

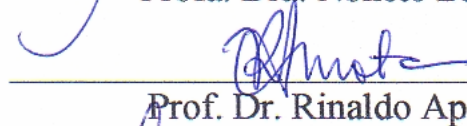
Examinadores:



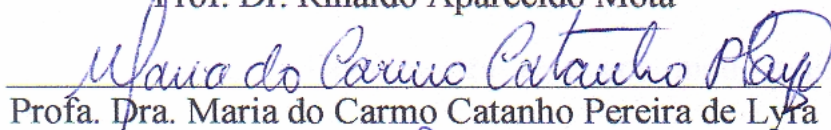
Prof. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida



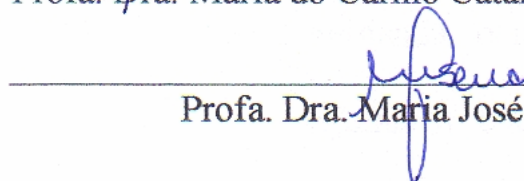
Prof. Dra. Nonete Barbosa Guerra



Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota



Prof. Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra



Prof. Dra. Maria José de Sena

Dedico esta tese aos meus pais Eluzino e
Fernanda, o início de tudo. Ao meu marido
Djalma Jr. e ao nosso filho Daniel, bem como
aos meus sogros Djalma e Edileusa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, ser supremo, que sempre está do nosso lado, nos abençoando;

Aos meus pais que nunca me deixaram faltar nada principalmente com relação ao amor e a educação;

Ao meu marido Djalma Alves de Freitas Júnior que sempre esteve ao meu lado me apoiando e incentivando nos momentos mais difíceis;

Aos meus sogros que também são como pais para mim, pelo apoio e admiração;

À professora Tânia Lúcia Montenegro Stamford por ter me recebido como aluna de doutorado e pelo convívio e aprendizagem;

À pesquisadora Tereza Cristina Leal Balbino pelo apoio, palavras de conforto e pelos ensinamentos de vida e de biologia molecular;

Ao professor Rinaldo Aparecido Mota, meu grande e admirável amigo, obrigada por tudo;

À professora Maria José de Sena pelo apoio e confiança;

Aos alunos de Iniciação Científica José Wilton Pinheiro Júnior e Isabelle da Silva Luz, que tanto me ajudaram na realização dos experimentos, agradeço demais a vocês;

Aos meus amigos Dalila, Aldemir e Ana Mércia do laboratório de microbiologia do Ministério de Agricultura, pela amizade, apoio e por ter cedido gentilmente as cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos coalho;

A Sineide, Silvana Suely, Leonildo, Sérgio, Davi, Paulo César, Soraide, Andréa Paiva do Laboratório de Bacteriose da UFRPE;

Aos meus colegas de doutorado, em especial, Karla, Celiane, Sâmara e Erilane;

À Professora Nara Suzy e Maria de Carmo pela receptividade no Laboratório do Projeto Genoma da UFRPE;

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Nutrição;

A Fabiana (o máximo) por receber a todos os novos estagiários de forma cordial, simpática e prestativa;

A Joseane, Thiers, Carina, Franklin Bispo, Wellington, Gerlane, Pollyanna, Mariana Marques, Eden, Cariri, Wagner pela amizade e apoio;

A Rodrigo Menezes, Tamara e Vladimir pela ajuda com os programas para as enzimas de restrição;

A Betânia, Mirele, Danielle, Tamara, Franklin Magalhães e Christiam pela amizade e ajuda nas etapas de purificação e seqüenciamento;

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do CPqAM, em especial, Silvana, Yara, Isaac e Lucas que sempre estão prontos para ajudar;

Aos funcionários da esterilização do CPqAM: Edson, Nelson e Rita;

A Duschinka, Marcelo e Plínio do Departamento de Entomologia do CPqAM;

A Dr. Valdir pela análise das seqüências;

A Dra. Nilma, Dr. Oswaldo, Dra. Alzira e Dra. Marise pelo apoio;

A Fernanda, secretária do Departamento de Microbiologia do CPqAM;

A Neci Maria Santos do Nascimento, secretária da Pós-Graduação em Nutrição, por sua dedicação e por sempre nos receber com sua alegria e boa vontade;

Aos bibliotecários do CPqAM, UFRPE e da UFPE;

À Coordenação de Pós-Graduação em Nutrição;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães CPqAM/ FIOCRUZ-PE, pela realização dos experimentos em suas instalações;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento CNPq pela bolsa de doutorado concedida;

Ao Banco do Nordeste do Brasil pelo financiamento do projeto;

Ao Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG) e ao Dr. Luiz Simeão do Carmo por ter cedido as cepas padrões FRI (Food Research Institute Madison, Wisconsin, EUA);

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao acordar contemple a vida de forma melhor. Olhe para o sol e deixe o mesmo iluminar o seu coração e aquecer sua alma. Olhe para as flores e sinta o seu perfume, deixe este perfume inebriar você e lhe trazer calma. Olhe para os pássaros que por aí voam leves e soltos e escute os seus cantos. Deixe esta melodia lhe alegrar o espírito e a simplicidade e a liberdade lhe alcançarem. E ao chegar a noite não deixe de contemplar a lua e as estrelas que a escuridão vieram clarear. Ilumine as idéias e pensamentos, reflita sobre o que fez e o que passou, não guarde rancores, nem desamores, pois a lua e as estrelas estão no céu. No céu de sua vida e para fazerem você brilhar.

Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	03
LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. LEITE	18
2.2. QUEIJO DE COALHO	21
2.3. MASTITE BOVINA	23
2.3.1. Conceito e Classificação	23
2.3.2. Etiologia	27
2.3.3. Diagnóstico	28
2.3.4. Perdas Econômicas	29
2.4. USO DE ANTIMICROBIANOS	30
2.5. EXOTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS	33
2.6. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	62
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
4. OBJETIVOS	90
4.1. OBJETIVO GERAL	90

	Página
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	90
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
5.1. ARTIGO CIENTÍFICO 1: PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> COAGULASE POSITIVOS ISOLADOS DE LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA NO AGRESTE DO ESTADO DE PERNAMBUCO	92
5.2. ARTIGO CIENTÍFICO 2: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ASSOCIADOS À MASTITE BOVINA PROVENIENTES DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL	113
5.3. ARTIGO CIENTÍFICO 3: INVESTIGAÇÃO DOS GENES PARA AS TOXINAS ESTAFILOCÓCICAS EM ISOLADOS DE LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA NA REGIÃO AGRESTE DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL	135
5.4. ARTIGO CIENTÍFICO 4: PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DETECÇÃO DE GENES TOXIGÊNICOS EM CEPAS DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. ISOLADAS DE AMOSTRAS DE QUEIJOS DE COALHO NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL	163
6. CONCLUSÕES	192
7. ANEXOS	194

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SEs	Staphylococcal Enterotoxins
SEA	Staphylococcal Enterotoxin A
SEB	Staphylococcal Enterotoxin B
SEC	Staphylococcal Enterotoxin C
SED	Staphylococcal Enterotoxin D
SEE	Staphylococcal Enterotoxin E
SEF	Staphylococcal Enterotoxin F
SEG	Staphylococcal Enterotoxin G
SEH	Staphylococcal Enterotoxin H
SEI	Staphylococcal Enterotoxin I
SEJ	Staphylococcal Enterotoxin J
SEL	Staphylococcal Enterotoxin L
SEM	Staphylococcal Enterotoxin M
SEN	Staphylococcal Enterotoxin N
SEO	Staphylococcal Enterotoxin O
SEP	Staphylococcal Enterotoxin P
SEQ	Staphylococcal Enterotoxin Q
SER	Staphylococcal Enterotoxin R
SEU	Staphylococcal Enterotoxin U
PCR	Polimerase Chain Reaction
<i>coa</i>	Gene da coagulase
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

mL	Mililitros
Kg	Quilo
CCS	Contagem de Células Somáticas
CMT	California Mastitis Test
CECS	Contagem Eletrônica de Células Somáticas
ET	Exfoliative Toxin
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin 1
RIA	Radioimunoensaio
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
PT	Toxinas Pirogênicas
SPE	Exotoxinas Pirogênicas Estreptocócicas
SSSS	Staphylococcal Scalded Skin Syndrome
ETA	Toxina Esfoliativa A
ETB	Toxina Esfoliativa B
ETC	Toxina Esfoliativa C
ETD	Toxina Esfoliativa D
Kda	Quilodalton
<i>se/ / ent</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas
<i>sea</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas A
<i>seb</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas B
<i>sec</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas C
<i>sed</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas D
<i>see</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas E

<i>seg</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas G
<i>seh</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas H
<i>sei</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas I
<i>sej</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas J
<i>sel</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas L
<i>sem</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas M
<i>sen</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas N
<i>seo</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas O
<i>sep</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas P
<i>seq</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas Q
<i>ser</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas R
<i>seu</i>	Gene para enterotoxinas estafilocócicas U
pb	Pares de bases
ng	Nanograma
Kb	quilobases
ORF	Open Reading Frame (Fase Aberta de Leitura)
<i>egc</i>	Enterotoxin gene cluster
RPLA	Reversed Passive Látex Agglutination
pH	Concentração de Hidrogênio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
dNTPs	Desorribonucleotídeos trifosfato
SCP	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa

⁰ GL	Graus Gay Lussac
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
TSI	Tríplice Sugar Iron
VM	Vermelho de Metila
SIM	Ácido sulfídrico, Indol e Motilidade
µg	Micrograma
U.I	Unidades Internacionais
mM	Milimolar
Tris-HCl	Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride
KCl	Cloreto de potássio
<i>HaeIII</i>	Enzima de restrição, extraída de <i>Arthrobacter luteus</i>
<i>AluI</i>	Enzima de restrição, extraída de <i>Haemophilus aegyptius</i>
UV	Luz Ultra Violeta
ATCC	The American Type Culture Collection
ER	Enzima de restrição
<i>RsaI</i>	Enzima de restrição, extraída de <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>
<i>DraI</i>	Enzima de restrição, extraída de <i>Deinococcus radiophilus</i>
RFLP	Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição
<i>mec</i>	Gene de resistência para a meticilina
<i>femB</i>	Gene de especificidade para a espécie <i>S. aureus</i>
MRSA	Methicillin Resistant <i>S. aureus</i>
FRI	Food Research Institute
PFGE	Pulsed-Field Gel Eletrophoresis

OSP

Sensibilidade Ótima em Placa

LISTA DE FIGURAS

	REVISÃO DE LITERATURA	Página
Figura 1	Infecção da glândula mamária por <i>Staphylococcus</i> spp.	24
Figura 2	Esquema demonstrando proporção entre animais de um rebanho com mastite clínica, subclínica e sadios	25
Figura 3	Reação em Cadeia da Polimerase. Preparo da reação em tubo de ensaio antes da colocação em termociclador	63
Figura 4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	65
ARTIGO 1		
Figura 1	Comparação da resistência antimicrobiana de cepas de estafilococos coagulase positivo por antibióticos e municípios estudados (A, B, C e D) no Agreste do Estado de Pernambuco, 2005	103
Figura 2	Perfil de resistência múltipla de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite nos (Municípios A, B, C e D) do Agreste do Estado de Pernambuco, 2005	105
ARTIGO 2		
Figura 1	Produtos de PCR do gene <i>coa</i> de <i>S. aureus</i> isolados do município de São Bento do Una, Pernambuco, Brasil. Marcador de peso molecular, linha M (100pb DNA ladder). Controle positivo, linha 1 (<i>S. aureus</i> ATCC 25923). Propriedade A, linhas 2 a 6 . Propriedade B, linhas 7 a 28	127
Figura 2	Produtos de PCR do gene <i>coa</i> digeridos com <i>AluI</i> de <i>S. aureus</i> isolados do município de São Bento do Una, Pernambuco, Brasil. Marcador de peso molecular, linha M (100pb DNA ladder). Controle positivo, linha 1 (<i>S. aureus</i> ATCC 25923). Propriedade A, linhas 2 a 6 . Propriedade B, linhas 7 a 28	128

		Página
Figura 3	Produtos de PCR do gene <i>coa</i> de 750pb digeridos com <i>AluI</i> e <i>HaeIII</i> de isolados de <i>S. aureus</i> do município de São Bento do Una, Pernambuco, Brasil. M (100pb DNA ladder). Linhas 2 (PCR); 2Alu (RFLP <i>AluI</i>); 2Hae (RFLP <i>HaeIII</i>); 3 (PCR); 3Alu (RFLP <i>AluI</i>); 3Hae (RFLP <i>HaeIII</i>); 5 (PCR); 5Alu (RFLP <i>AluI</i>); 5Hae (RFLP <i>HaeIII</i>); 6 (PCR); 6Alu (RFLP <i>AluI</i>); 6Hae (RFLP <i>HaeIII</i>)	129
Figura 4	Teste de sensibilidade <i>in vitro</i> (A) e perfil de multiresistência <i>in vitro</i> (B) de 27 isolados de <i>S. aureus</i> associados à mastite subclínica no município de São Bento do Una	130
ARTIGO 3		
Figura 1	Deteção dos genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>tst</i> nas cepas padrões de <i>S. aureus</i> FRI através de PCR-Multiplex	152
Figura 2	Produto de amplificação da PCR dos genes <i>sej</i> , <i>sei</i> , <i>seg</i> e <i>seh</i> (A, B, C e D, linhas: 1, 3 e 5) e seus padrões de restrição com as enzimas <i>RsaI</i> : A, B e C e <i>DraI</i> : D, linhas: 2, 4, 6	153
ARTIGO 4		
Figura 2	Produto de amplificação da PCR dos genes <i>sed</i> , <i>sej</i> , <i>sei</i> , <i>tst</i> , <i>sec</i> , <i>seh</i> e <i>seg</i> (A, linhas: 1 e 3, gene <i>sed</i> ; A, linhas: 6 e 8, gene <i>sej</i> ; B, linhas: 1 e 3, gene <i>sei</i> ; C, linhas: 1 e 3, gene <i>tst</i> ; C, linhas: 5 e 7, gene <i>sec</i> ; C, linha 9, gene <i>seh</i> e D, linhas: 1 e 3, gene <i>seg</i>) e seus padrões de restrição com as enzimas <i>RsaI</i> (A, linhas: 7 e 9, gene <i>sej</i> ; B, linhas: 2 e 4, gene <i>sei</i> ; C, linhas: 6 e 8, gene <i>sec</i> ; D, linhas: 2 e 4, gene <i>seg</i>) e <i>DraI</i> (C, linhas: 2 e 4, gene <i>tst</i> ; C, linha: 10, gene <i>seh</i>)	182

LISTA DE TABELAS

		Página
ARTIGO 1		
Tabela 1	Microrganismos isolados de leite de vacas com mastite em municípios do Agreste do Estado de Pernambuco, 2005	100
Tabela 2	Análise geral do perfil de sensibilidade antimicrobiana de 59 cepas de estafilococos coagulase positivas isoladas de amostras de leite de vacas com mastite no Agreste do Estado de Pernambuco, 2005	102
ARTIGO 2		
Tabela 1	Resultados da PCR-RFLP do gene <i>coa</i> de isolados de <i>S. aureus</i> associados à mastite bovina em duas propriedades do município de São Bento do Una, Pernambuco, Brasil	126
ARTIGO 3		
Tabela 1	<i>Primers</i> usados na análise da PCR para a detecção dos genes <i>sea-see</i> , <i>seg-sej</i> , <i>tst</i> , <i>eta</i> e <i>etb</i> em cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de amostras de leite de vacas com mastite subclínica na região Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil	149
Tabela 2	Endonucleases de restrição usadas para a confirmação da identidade dos fragmentos dos genes <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> e <i>sej</i> e padrão de restrição esperado	150
Tabela 3	Distribuição dos genes para as toxinas SEG, SEH, SEI e SEJ nas cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de leite de vacas com mastite subclínica em quatro municípios localizados na região Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil	151

ARTIGO 4

Tabela 1	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva em amostras de queijos de coalho no estado de Pernambuco, Brasil	178
Tabela 2	<i>Primers</i> usados para a detecção por PCR dos genes <i>sea-see</i> , <i>seg-sej</i> , <i>tst</i> , <i>eta</i> e <i>etb</i> em cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de amostras de queijos de coalho no Estado de Pernambuco, Brasil	179
Tabela 3	Enzimas de restrição usadas para confirmação da identidade dos fragmentos dos genes <i>seg</i> , <i>seh</i> , <i>sei</i> , <i>sej</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>tst</i> e padrão de restrição esperado	180
Tabela 4	Perfil de sensibilidade de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de amostras de queijos de coalho no Estado de Pernambuco, frente aos antibióticos testados	181

RESUMO

A mastite bovina, inflamação da glândula mamária, é uma das principais doenças que acomete o rebanho leiteiro em todo o mundo. O principal agente infeccioso responsável por esta enfermidade é o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), bactéria de interesse na microbiologia dos alimentos como agente causador de intoxicações alimentares. Outro importante fato que envolve este microrganismo é a resistência aos antibióticos usados na terapêutica humana e veterinária. Como o leite e derivados são amplamente consumidos e podem conter *S. aureus* enterotoxigênicos e resistentes, objetivou-se com este estudo caracterizar feno e genotipicamente *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite de vacas com mastite e queijos de coalho no Estado de Pernambuco. Para o diagnóstico da mastite bovina foram realizados os testes da caneca telada e o *California Mastitis Test*. As amostras de queijos de coalho foram submetidas ao isolamento e contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) em Ágar Baird-Parker. As cepas de *Staphylococcus* spp. obtidas tanto do leite quanto dos queijos foram caracterizadas fenotipicamente em *S. aureus*, SCP e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), através da técnica de coloração de gram, características morfo-tintoriais das colônias e produção de hemólise em Ágar sangue, além de provas bioquímicas como fermentação da glicose em anaerobiose, fermentação do manitol em aerobiose e anaerobiose, produção de termonuclease, acetoina e coagulase. A caracterização genotípica foi realizada através da utilização da técnica de PCR-RFLP do gene *coa*, PCR-Uniplex e Multiplex para investigação dos genes toxigênicos, além de clivagem e seqüenciamento para confirmação da presença dos genes *se*. Para traçar o perfil de resistência dos isolados, foi empregada a técnica de difusão em ágar, utilizando diferentes antibióticos. Foram analisados 246 animais, totalizando 984 quartos mamários, dos quais, 562 (57,1%) apresentaram mastite subclínica, sendo os microrganismos mais prevalentes *Staphylococcus* spp. (36%), *Corynebacterium* spp. (34,8%) e *S. aureus* (13,6%). O perfil de sensibilidade antimicrobiana demonstrou que das 59 cepas de SCP isoladas de leite, 28,5% foram resistentes, sendo os antibióticos menos eficazes a penicilina e a amoxicilina. A caracterização das cepas de *S. aureus* de casos de mastite bovina pela técnica de PCR-RFLP revelou a presença de dois perfis genotípicos, P1=750pb e P2=1000pb. Das 81 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de vacas com mastite, 65 (80,2%) comportavam genes toxigênicos, sendo os genes *se* encontrados (*seg*, *seh*, *sei* e *sej*). Com relação aos queijos de coalho, das 10 amostras avaliadas, 90% estavam fora dos padrões permitidos pela legislação para SCP. 18/20 das cepas de *Staphylococcus* spp. apresentaram os genes *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej*. O percentual de resistência entre as cepas isoladas de queijo foi baixo. A análise de restrição e o seqüenciamento confirmaram a presença dos genes *se* nos isolados de leite e queijo. A tipagem molecular permitiu compreender o padrão de dispersão dos *S. aureus* nas propriedades estudadas. A presença de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes a antibióticos e portadoras de genes toxigênicos isoladas de amostras de leite de vacas com mastite e queijos de coalho no Estado de Pernambuco, é preocupante para a saúde do consumidor, por tornarem estes alimentos possíveis veículos de intoxicações alimentares.

ABSTRACT

Bovine mastitis, characterized by the inflammation of the mammary gland, is one of the most important diseases affecting dairy cattle worldwide. The main infectious agent implicated in causing the disease is *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), a microorganism also widely known to cause food poisoning. Another important aspect of this pathogen is its resistance to antibiotics frequently used in veterinary and medicine practices. Since milk and its derivatives are extensively consumed and could contain both enterotoxigenic and resistant *S. aureus*, the main goal of this work is to characterize pheno- and genotypically *Staphylococcus* spp. isolated from both, mastitis-affected cow's milk, and curd cheese from Pernambuco, Brazil. To diagnose bovine mastitis two tests were used, the "dark bottom mug" test and the California Mastitis Test. The curd cheese samples were submitted to microorganism isolation and counting of Coagulase Positive Staphylococci (CPS) in Baird-Parker agar medium. The *Staphylococcus* spp. strains isolated from both milk and cheese samples were phenotypically characterized as *S. aureus*, CPS, and Coagulase Negative Staphylococci (CNS), using Gram staining techniques, colony morphology/staining characteristics and haemolysis in blood agar, additionally, biochemical tests such as anaerobic glucose fermentation, aerobic and anaerobic mannitol fermentation, and, thermonuclease, acetoin and coagulase production. The genotypic characterization was performed using a PCR-RFLP based technique of the *coa* gene. Uniplex and multiplex PCR were used to investigate the toxigenic genes, whereas cleavage and sequencing were performed to confirm the presence of *se* genes. To determine the antimicrobial resistance profile of different *Staphylococcus* strains, the agar diffusion assay was employed, testing different antibiotics. In this study, were analyzed 246 animals, in a total of 984 udders, from which 562 (57,1%) presented subclinical mastitis, with *Staphylococcus* spp. (36%), *Corynebacterium* spp. (34,8%) e *S. aureus* (13,6%) being the predominant microorganisms. The antimicrobial sensitivity profile showed that from 59 CPS strains isolated from milk, 28,5% showed resistance, and penicillin and amoxicillin were the least efficient antimicrobials amongst the ones tested. The characterization of *S. aureus* strains obtained from bovine mastitis using the PCR-RFLP technique showed two distinct genotypic profiles, P1=750pb e P2=1000pb. Amongst the 81 different strains of *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis-affected cow's milk, 65 (80,2%) presented toxigenic genes, where the *se* genes were found (*seg*, *seh*, *sei* and *sej*). From the 10 samples or curd cheese tested, 90% were out of the food safety regulatory standards considered for CPS, moreover, 18/20 *Staphylococcus* spp. strains presented genes *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* and *sej*. The antibiotic resistance profile among the strains isolated from curd cheese was considered low. The restriction analysis and the sequencing were able to confirm the presence of the *se* genes in the *Staphylococcus* spp. strains isolated from milk and cheese. In conclusion, the molecular typing allowed understanding the standard of dispersion on the *S. aureus* in the studied properties. Antibiotic resistant strains and strains presenting toxigenic genes isolated from milk obtained from mastitis-affected cows and curd cheese samples from the state of Pernambuco is considered a health-threatening situation for potential consumers, due to the strong possibility of causing foodborne intoxications.

1- INTRODUÇÃO

O leite é um alimento protéico e de grande importância para a alimentação humana, devendo ser um produto seguro e de boa qualidade. A produção leiteira em Pernambuco constitui-se numa das principais atividades econômicas, concentrando-se principalmente na Região do Agreste Pernambucano, que é responsável por grande parte da produção estadual, abastecendo as cidades locais e a Região Metropolitana do Recife.

Entre os derivados do leite destacam-se os queijos e no caso da Região Nordeste o queijo de coalho, que é obtido por coagulação do leite por meio de coalho ou de outras enzimas coagulantes, sendo comercializado com até dez dias de fabricação (BRASIL, 1996).

Para que o leite pasteurizado, esterilizado, queijos e outros produtos derivados sejam consumidos pela população sem riscos à saúde é necessário que a matéria prima, no caso, o leite cru, esteja livre de agentes nocivos para a saúde do homem. Desta forma, é importante que haja todo um controle na cadeia de produção leiteira a começar pelo rebanho bovino que deve estar livre de enfermidades que podem ser responsáveis pela veiculação de agentes infecciosos.

A mastite bovina, inflamação da glândula mamária, causa grandes perdas econômicas na criação do gado leiteiro (CREMONESI et al., 2006). O leite e derivados têm sido implicados em surtos de toxinfecções alimentares (BUYSER et al., 2001; VERAS et al., 2003) podendo estar associados a doenças dos animais de produção, como a mastite que tem como principais agentes etiológicos, bactérias, principalmente, do gênero *Staphylococcus* (FUEYO et al., 2005).

O *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), é um dos mais importantes microrganismos causadores de intoxicações alimentares, assumindo relevância para a Saúde Pública, em

virtude do risco potencial de sua veiculação ao homem através do leite e derivados, que podem conter enterotoxinas termoestáveis pré-formadas nestes alimentos (SENA, 2000).

A intoxicação alimentar estafilocócica é caracterizada por náuseas, vômito, mal-estar e debilidade geral, diarreia aquosa não sangüinolenta e dor abdominal. Pode ocorrer desidratação resultante de significativa perda de líquido, sudorese e cefaléia, mas não se observa febre elevada. Os sintomas começam a manifestar-se aproximadamente quatro horas após o consumo do alimento contaminado (MURRAY et al., 1992).

Cinco tipos antigênicos “clássicos” de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) foram relatados (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) (DINGES et al., 2000). Na década de noventa “novas” SEs (SEG, SEH, SEI e SEJ) foram descritas, bem como seus respectivos genes (REN et al., 1994; MUNSON et al., 1998; ZHANG et al., 1998). Recentemente, após a análise parcial ou total do genoma do *Staphylococcus*, o “alfabeto” das SEs aumentou com a identificação de novos genes que codificam para as enterotoxinas SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU (FITZGERALD et al., 2001; JAURRAD et al., 2001; KURODA et al., 2001; ORWIN et al., 2001, 2002, 2003; LETERTRE et al., 2003; OMOE et al., 2003).

A caracterização sorológica das enterotoxinas pode ser dificultada por causa dos baixos níveis de produção, dificuldade associada com a purificação e a falta de métodos simples e rápidos para detecção (SU e WONG, 1995). Com a disponibilidade da informações sobre a sequência de DNA das SEs (REN et al., 1994; SU e WONG, 1995, 1997; MCLAUCHLIN et al., 2000), a PCR tornou-se um método alternativo para a detecção dos genes destas toxinas (BECKER et al., 1998).

Um dos principais indicadores de enterotoxigenicidade é o teste da coagulase, porém alguns estafilococos coagulase negativa enterotoxigênicos foram encontrados (UDO

et al., 1999; RAPINI et al., 2003), sendo estes achados importantes para a Saúde Pública, já que a legislação brasileira não especifica padrões para estes microrganismos, restringindo-se apenas, a descrever valores para espécies coagulase positivas (SENA, 2000).

A produção da enzima coagulase é um dos critérios usados para identificação de *S. aureus*. Embora o teste da coagulase em tubo seja o teste padrão, várias cepas não são tipadas por essa técnica (AARESTRUP et al., 1995). Em vista disso, análises moleculares do gene da coagulase estão sendo empregadas como teste de caráter definitivo (VIEIRA-DA-MOTA et al., 2001).

A análise do gene da coagulase (*coa*) através da PCR tem sido aplicada para subdividir as amostras de *S. aureus* baseada no polimorfismo do gene *coa*, utilizando iniciadores específicos que geram fragmentos de diferentes tamanhos dependendo da amostra (VIEIRA-DA-MOTA, 2001).

Outro aspecto importante é a presença de resíduos de antibióticos que pode interferir diretamente na qualidade do leite e nos processos industriais, inibindo culturas sensíveis, utilizadas na fabricação de iogurtes. Além disso, pode constituir um problema de saúde pública, levando ao aumento de bactérias resistentes a tratamentos por antibióticos.

A contaminação é decorrente do tratamento de vacas em lactação acometidas por mastite, metrite ou outra doença infecciosa (CARRARO et al., 2003). Além de haver evidências de que o tratamento indiscriminado de animais com antibióticos torne seus produtos e derivados, fontes para resistência aos antibióticos na espécie humana (OLIVEIRA et al., 2002).

Desta forma, este estudo teve como finalidade verificar a qualidade do leite de vacas com mastite subclínica e de queijos de coalho produzidos no Estado de Pernambuco, quanto à presença de *Staphylococcus* spp. portadores de genes toxigênicos e resistentes a antibióticos.

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEITE

Segundo o regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal-RIISPOA, artigo 475, “entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas” (BRASIL, 1997).

É importante assinalar que o leite de vaca, depois do leite materno, é o alimento mais equilibrado e completo de que dispõe o ser humano (BLANC, 1974).

Basicamente, o leite, para ser caracterizado como de boa qualidade deve apresentar algumas características organolépticas, nutricionais, físico-químicas e microbiológicas como: sabor agradável, alto valor nutritivo, ausência de agentes patogênicos e contaminantes (antibióticos, pesticidas, adição de água e sujidades), reduzida contagem de células somáticas e baixa carga microbiana (FONSECA e SANTOS, 2001).

O leite apresenta um grande valor econômico e um valor alimentar inestimável na nutrição humana (FERREIRO et al., 1980). Está presente na alimentação de indivíduos de todas as idades e classes sociais destacando-se, principalmente, na dieta de crianças e idosos (FRANCO et al., 2000).

Devido a sua constituição, o leite torna-se um excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (CHEN e HOTCHKES, 1993). Estes microrganismos podem contaminar o leite durante ou após a ordenha e conseqüentemente os derivados de leite, os quais podem ainda sofrer contaminação durante processamento e estocagem, principalmente nos casos em que há grande manipulação do produto (NOUT, 1994).

O leite ao ser secretado no interior da glândula mamária é praticamente estéril, porém, contamina-se durante seu percurso em direção ao exterior do úbere com microrganismos saprófitas componentes da microbiota normal do animal (LERCHE, 1969). Podendo apresentar uma variedade de microrganismos patogênicos em decorrência de processos inflamatórios do úbere ou de enfermidades no rebanho.

Os microrganismos contaminantes do leite após a ordenha, provenientes de equipamentos e utensílios, do meio ambiente e mesmo do pessoal responsável pela obtenção e manipulação do leite, são os mais importantes sob o ponto de vista tecnológico, pois podem causar alterações indesejáveis, comprometendo sua qualidade e de seus derivados, podendo, inclusive chegar a torná-los inaproveitáveis para o consumo humano (OLIVEIRA, 1986).

Entre os microrganismos que podem contaminar o leite e seus derivados, o *Staphylococcus* spp. tem sido considerado um dos mais freqüentemente envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, juntamente com *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (DAVIS e WILBEY, 1990; BUYSER et al., 2001). É considerada uma das mais importantes bactérias causadoras de doenças de origem alimentar (GENIGEORGIS, 1989; VERAS et al., 2003).

O leite e seus derivados são amplamente consumidos no Brasil. Podem causar doenças de origem alimentar quando contaminados por amostras enterotoxigênicas de *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase positiva (CARMO et al., 1995, 1996) ou *Staphylococcus* coagulase negativa (SENA, 2000; VERAS et al., 2003).

Surtos de intoxicação estafilocócicas associados ao leite e produtos lácteos têm sido relatados tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. No Brasil, no Estado de Minas Gerais, no período de 1997 a 2002 leite e derivados foram envolvidos

em surtos de toxinfecção alimentar sendo *Staphylococcus* o principal agente envolvido (VERAS et al., 2003). No Reino Unido, Wieneke et al. (1993) relataram a ocorrência de 359 casos de intoxicação alimentar devido a enterotoxina estafilocócica no período de 1969 a 1990. Do total de casos, 8% ocorreram devido à ingestão de leite e derivados contaminados.

Alguns estudos realizados no Brasil têm demonstrado alta contaminação de leite e derivados por *S. aureus* (CARMO et al., 1994; CERQUEIRA et al., 1994; SANTOS et al., 1995; SENA et al., 1998; SENA, 2000). Araújo (1984) ao analisar 100 amostras de leite cru no município de Niterói, verificou que 50% apresentaram-se positivas para *S. aureus*, sendo que 48% das amostras positivas apresentaram contagens variando de 10^3 a valores superiores a 10^5 UFC/mL. Santos et al. (1981) ao analisarem 78 amostras de leite cru em Minas Gerais, observaram que 46,9% estavam contaminados por este agente em contagens variando de $3,0 \times 10^3$ a $9,8 \times 10^5$ UFC/mL e em Goiânia, Mesquita (1988) detectou este microrganismo em 71,4% das amostras de leite cru examinadas.

A contaminação do leite inicia-se nas fazendas, durante ou após a ordenha, sendo resultado de deficiências da higienização do meio ambiente e dos utensílios, doenças do rebanho e do homem. As dificuldades de transporte e as falhas durante os processos de beneficiamento e estocagem do leite também podem interferir na sua qualidade (BORGES et al., 1978). O controle deficiente em qualquer uma destas etapas pode causar sérios problemas.

A garantia da qualidade do leite, principalmente para evitar veiculação de agentes infecciosos ao homem, se inicia com o atestado sanitário da vaca, do ordenhador, das condições sanitárias do ambiente em que as vacas são ordenhadas, do equipamento usado na coleta e transporte do leite. Depende ainda, das condições higiênico-sanitárias durante a

produção, do tratamento térmico, da temperatura de armazenamento do leite na propriedade, durante o transporte até a indústria, assim como os cuidados na rede de distribuição e no consumo (SANTOS et al., 1981).

2.2 QUEIJO DE COALHO

A qualidade do leite é de fundamental importância para a produção de queijos e os processos de fabricação compreendem métodos que transformam grande parte dos componentes do leite num produto de fácil conservação, com menor quantidade de água, grande valor nutritivo, sabor agradável e de fácil digestão (AQUINO, 1983; CABRAL, 1993).

A produção de queijo de coalho no Brasil, acontece principalmente na região Nordeste, nos estados da Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco, onde o produto é tradicional e portanto bastante consumido (LEITE JÚNIOR et al., 2000). Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade deste produto, seu processamento consiste na coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementadas ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas (BRASIL, 2001). No entanto, este produto por vezes é processado de modo artesanal, não possuindo padrão (PINHEIRO et al., 2004).

O queijo de coalho produzido em Pernambuco artesanalmente, de acordo com Moraes (1995), tem como processamento a recepção do leite integral cru, filtração, adição do coalho, coagulação, quebra da coalhada, dessoragem parcial, enformagem, prensagem manual, prensagem mecânica, salga seca, desenformagem, lavagem do produto e consumo.

Produzido a partir de leite cru integral, o queijo de coalho tipo B, é obtido de vacas sãs, ordenhadas em local próximo da fabricação, de produção leiteira do próprio

estabelecimento, com produção diária inferior a 10kg, não devendo ser transportado a distâncias superiores a 500 metros. O queijo de coalho tipo A, é definido como aquele produzido com leite integral ou desnatado, pasteurizado, massa crua prensada, suficientemente dessorada, salgada e maturada (PERNAMBUCO, 1992).

O segmento de laticínios tem grande relevância para a economia do país porque contribui com cerca de 10% do faturamento global da indústria brasileira de alimentos. Entretanto, toda esta grandeza é fortemente ameaçada pelo mercado informal ou clandestino que não passa por fiscalização oficial e é hoje sustentado por quase a metade dos 21 bilhões de litros/ano produzidos em nosso país (MORENO et al., 2004).

O queijo de coalho, por ser elaborado, em quantidade considerável, a partir de leite cru e sem os devidos cuidados de higiene, em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias que não adotam as Boas Práticas de Fabricação, não apresenta segurança microbiológica e padronização da qualidade (FEITOSA et al., 2003), podendo causar intoxicações alimentares (RITTER et al., 2001).

A pasteurização do leite tanto para consumo *in natura* como para a produção de creme e queijos reduz os riscos de toxinfecções alimentares, entretanto, falhas durante o processamento e comercialização do queijo podem favorecer a incorporação de matérias estranhas (sujidades) de origem biológica ou não. A contaminação microbiana de queijos assume destacada relevância em Saúde Pública ao se considerar que bactérias enterotoxigênicas e patogênicas como *S. aureus* e *Salmonella* são comumente encontradas em derivados lácteos (PERESI et al., 2001).

Alguns estudos realizados (SANTOS et al., 1995; PAIVA e CARDONHA, 1999; NASSU et al., 2000) sobre a qualidade microbiológica do queijo de coalho relataram ocorrência de microrganismos patogênicos e contagens de microrganismos deteriorantes

em números que excedem, às vezes, os limites estabelecidos pela legislação (BRASIL, 1996; BRASIL, 2001) e as bactérias patogênicas detectadas com maior frequência eram *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*.

2.3 MASTITE BOVINA

2.3.1 Conceito e Classificação

A inflamação da glândula mamária recebe a denominação de mastite (do latim *Mamma* = mama) ou de mastite (do grego *Mástos* = mama) (SANTOS, 1986). Foi descrita pela primeira vez por Baby du Brassac em 1814 (COSTA, 1991). É uma doença complexa havendo diferentes causas e graus de intensidade (SCHALM et al., 1971).

A mastite pode ser de etiologia traumática, tóxica, alérgica, metabólica e infecciosa (COSTA, 1991), sendo as inflamações infecciosas as principais, dentre as quais destacam-se as de origem bacteriana (SANTOS, 1986), como as causadas por estafilococos que podem atravessar o canal do teto, colonizar o sistema de ductos, os alvéolos e causar uma resposta inflamatória (OTERO e CRUZ, 1992; RAINARD, 2005) (Figura 1).

A mastite se constitui num processo inflamatório da glândula mamária, de evolução aguda ou crônica. Pode se apresentar na forma clínica ou subclínica, conforme se evidencie ou não sinais de inflamação (CENTORBI et al., 1992).

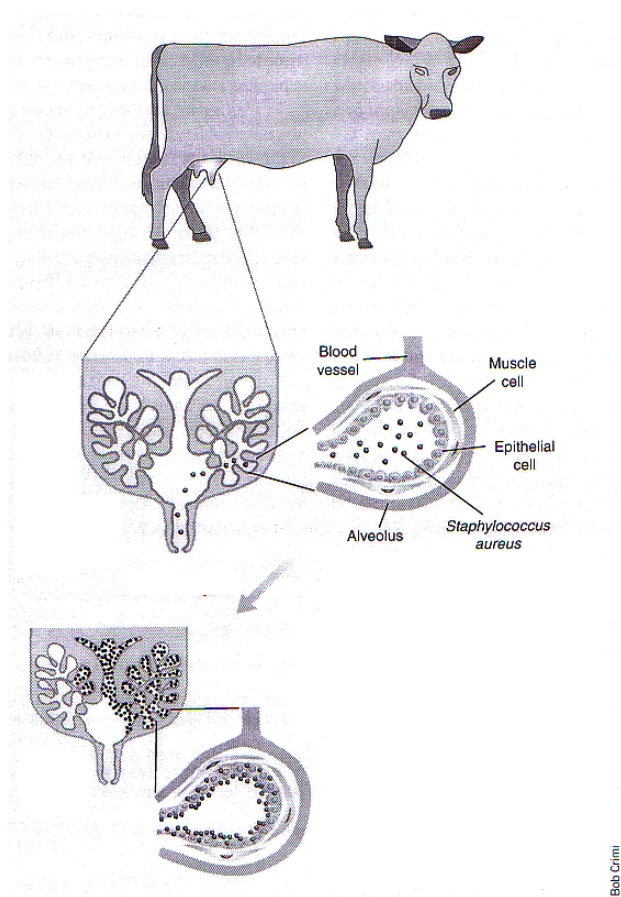


Figura 1- Infecção da glândula mamária por *Staphylococcus* spp. Fonte: Rainard, 2005.

A mastite pode ser dividida em dois grupos, quanto a sua forma de manifestação. Denomina-se mastite clínica, os casos da doença em que existem sinais clínicos evidentes como: edema, aumento da temperatura, endurecimento e dor na glândula mamária e ou aparecimento de grumos, pus ou qualquer outra alteração das características do leite. Outra forma de manifestação da doença é chamada mastite subclínica, que se caracteriza por alterações na composição do leite, tais como aumento na Contagem de Células Somáticas (CCS), aumento nos teores de Cl, Na⁺ e proteínas séricas, e diminuição nos teores de caseína, lactose e gordura do leite. É importante frisar que, nesse tipo de mastite, não existem sinais clínicos evidentes da doença, portanto, não é possível diagnosticá-la sem a

utilização de testes auxiliares. Dessa forma, o sinal clássico da mastite subclínica é a elevação da CCS, que pode ser detectado com o auxílio de testes de diagnóstico como o *California Mastitis Test* (CMT) e a Contagem Eletrônica de Células somáticas (CECS) (FONSECA e SANTOS, 2001).

Ressalta-se que a mastite subclínica apresenta prevalência muito maior que a clínica (Figura 2) e que no Brasil, a maioria dos casos de mastite que afetam quartos mamários dos bovinos leiteiros são da forma subclínica (BRABES et al., 1999; SANTOS et al., 2003; FREITAS et al., 2005).

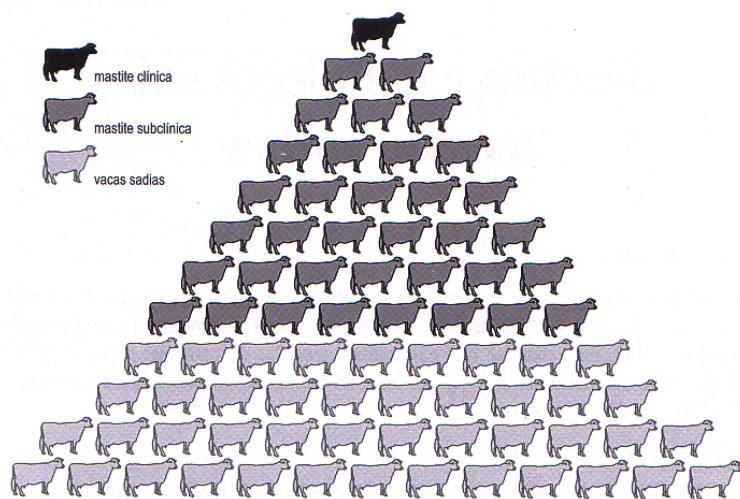


FIGURA 1
Representação esquemática da distribuição de mastite clínica e subclínica em um rebanho

Figura 2- Esquema demonstrando proporção entre animais de um rebanho com mastite clínica, subclínica e sadios. Fonte: Fonseca e Santos (2001)

A forma subclínica apresenta uma maior importância epidemiológica, pois pode disseminar-se silenciosamente pelo rebanho sem que sejam percebidas alterações macroscópicas à inspeção do úbere ou do leite (BLOOD e RADOSTITIS, 1991). Tem grande importância devido à ação prejudicial sobre a quantidade e qualidade do leite

produzido pelos quartos infectados, além da dificuldade na sua detecção (VIANNI et al., 1992).

Existe uma outra grande divisão conceitual da mastite. Esta se refere ao tipo de agente causador, que pode ser ambiental ou contagioso. Dessa forma, a mastite pode ser contagiosa e ambiental (RADOSTITS et al., 2002).

A mastite contagiosa caracteriza-se por apresentar baixa incidência de casos clínicos e alta incidência de casos subclínicos, geralmente de longa duração ou crônicos e apresentando alta contagem de células somáticas (CCS). Esse tipo de mastite é causada por patógenos cujo *habitat* preferencial é o interior da glândula mamária e a superfície da pele dos tetos e é transmitida principalmente durante a ordenha. A mastite ambiental é causada por agentes que vivem preferencialmente no *habitat* da vaca, em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas. A mastite ambiental caracteriza-se por alta incidência de casos clínicos, geralmente de curta duração (FONSECA e SANTOS, 2001).

A mastite contagiosa é transmitida quase exclusivamente durante a ordenha e para que haja a transmissão é necessário que exista um elemento de ligação entre um quarto infectado e um sadio. Segundo Amaral et al. (2004) a ordenhadeira mecânica, a mão do ordenhador, práticas de higiene e lesões nos tetos são fatores importantes que expõem a superfície dos tetos aos microrganismos patogênicos contagiosos sendo esses microrganismos transmitidos de animais infectados para não infectados durante o processo de ordenha.

A forma subclínica é importante devido a uma maior prevalência nos rebanhos, ocorrendo 15 a 40 vezes mais que a forma clínica, é de difícil detecção e longa duração, tornando-se os animais reservatórios de microrganismos para o rebanho (DE SÁ et al., 2000).

A mastite causada por patógenos ambientais, apesar de menor ocorrência, é muito importante por ser de difícil tratamento podendo ocorrer morte do animal, como resultado de septicemia ou toxemia (BARTLETT et al., 1992). O reservatório primário destes patógenos ambientais é o ambiente da vaca leiteira, enquanto o reservatório primário dos patógenos contagiosos é a glândula mamária infectada (GARINO JÚNIOR et al., 2000).

2.3.2 Etiologia

Diversos microrganismos podem estar envolvidos como bactérias, vírus, fungos filamentosos, leveduras e algas. Dentre os agentes etiológicos, as bactérias têm maior incidência, constituindo cerca de 80% a 90% dos casos, dentre as quais as mais comuns são: *S. aureus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli*, *Nocardia* spp. entre outras (BRABES et al., 1999).

Brito et al. (1997), relataram que 135 diferentes espécies, subespécies e sorotipos de microrganismos podem ser isolados do leite de vacas com mastite, sendo que a maioria das infecções é de origem bacteriana e cerca de 90% de todos os casos ocorrem devido a um reduzido número de espécies, destacando-se aquelas dos gêneros *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. (FONSECA e SANTOS, 2001).

A plurietiologia da mastite é um fator complicador para o seu controle e tratamento (LANGONI et al., 1998). Os agentes mais envolvidos na gênese desta doença, tanto no Brasil como em outros países, são os estafilococos e estreptococos (DA SILVA et al., 1983; LANGENEGGER et al., 1986; LANGONI et al., 1991; QUIN et al., 1994; FREITAS et al., 2005).

Microrganismos que causam mastite são geralmente classificados como contagiosos e ambientais baseados em seus reservatórios primários e modo de transmissão. *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae* são patógenos contagiosos e são comumente transmitidos entre as vacas por contato com leite infectado. Os patógenos ambientais incluem dois grandes grupos de bactérias: os coliformes, onde as principais espécies são *Escherichia coli* e *Klebsiella* e o grupo dos estreptococos, exceto a espécie *S. agalactiae*. Estas bactérias ambientais provêm do ambiente onde a vaca vive, alcançando o úbere entre as ordenhas, quando os tetos são expostos à lama, esterco e outros materiais contaminados (CREMONESI et al., 2006).

Entre os patógenos que causam mastite, o *S.aureus* é um dos três principais microrganismos, sendo responsável por casos de difícil tratamento através da utilização de antibióticos (RAINARD, 2005).

2.3.3 Diagnóstico

O exame físico do úbere deve ser feito por palpação da glândula mamária, e o momento mais adequado para esse procedimento é imediatamente após a ordenha, com o úbere vazio (FONSECA e SANTOS, 2001).

A avaliação das características físicas do leite deve ser realizada imediatamente antes da ordenha, sendo vulgarmente conhecido como teste da caneca de fundo preto. Esse teste consiste na retirada dos 3 a 4 primeiros jatos de leite, contrastando-os com uma superfície de fundo preto, com a finalidade de observar a presença de alterações no leite, tais como grumos ou coágulos, pus, sangue ou leite aquoso, servindo para o diagnóstico da mastite clínica (FONSECA e SANTOS, 2001).

Para o diagnóstico da mastite subclínica o *California Mastitis Test* (CMT), desenvolvido por Schalm e Noorlander (1957) é um dos testes mais populares e práticos. Seu princípio baseia-se na estimativa da contagem de células somáticas no leite. Para tal, utiliza-se um detergente aniônico neutro que atua rompendo a membrana das células presentes na amostra de leite e liberando o material nucléico (DNA), o qual apresenta viscosidade. Desta forma, o resultado do teste é avaliado em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura de partes iguais leite e reagente, sendo o teste realizado em bandeja apropriada.

A análise microbiológica do leite permite um diagnóstico preciso das mastites. Não é praticado rotineiramente por ser oneroso, porém, é o único método que revela o agente etiológico específico, permitindo escolher a terapêutica e profilaxia adequada após testes de sensibilidade antimicrobiana (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

2.3.4 Perdas Econômicas

A mastite é considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no mundo. Estima-se que as perdas anuais sejam de cerca de US\$ 184, por vaca (CREMONESI et al., 2006). Já no Brasil, pode-se deduzir que, em função da alta prevalência de mastites nos rebanhos, possa ocorrer perda de produção entre 12% e 15%, o que significa um total de 2,8 bilhões de litros/ano em relação à produção anual de 21 bilhões de litros. Desse total, 70% são atribuídos à mastite subclínica, enquanto os 30% restantes são relativos à mastite clínica. Nesse total, estão incluídas as perdas devido à diminuição na produção de leite, que é responsável por 66% do total das perdas, visto que há uma diminuição da ordem de 15% na produção de leite das vacas infectadas, gastos com

medicamentos, leite descartado, serviços veterinários, descarte prematuro de animais e diminuição no valor comercial destes (FONSECA e SANTOS, 2001).

Esta afecção reduz a quantidade e a qualidade do leite, diminuindo os teores de lactose, cálcio, fósforo, caseína, gordura e sólidos, enquanto aumenta proteínas plasmáticas, cloretos, sódio, ácidos graxos livres e células somáticas. Além disso, a mastite clínica, principalmente, aumenta o risco de resíduos de antimicrobianos no leite, pela necessidade de estabelecer-se tratamento imediato, mesmo dos animais em lactação. Portanto, além do prejuízo diretamente relacionado ao processo inflamatório, acrescentam-se o custo com medicamentos, aumento do labor da mão-de-obra e tempo de descarte do leite após tratamento, até a total eliminação dos resíduos de antibióticos utilizados (COSTA, 1999).

2.4 USO DE ANTIMICROBIANOS

A resistência a antibióticos e outras drogas antimicrobianas continua a ser um dos grandes problemas da medicina atual. Hoje, o desenvolvimento de resistência por certas bactérias patogênicas é mais rápido que a capacidade da indústria para produzir novas drogas. Entre as bactérias que voltam a se tornar perigosas destaca-se o *Staphylococcus aureus*, um poderoso agente de infecção hospitalar (SOUZA, 1998).

O uso de antimicrobianos na prática veterinária para tratamento e profilaxia de agentes infecciosos em adição ao uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, influenciam grandemente a prevalência de bactérias resistentes em animais contribuindo para o risco da emergência de resistência em patógenos humanos (SHAH et al., 1993; BARBER, 2001; MCDERMOTT et al., 2002).

Evidências diretas indicam que o uso de antimicrobianos em animais seleciona bactérias resistentes que podem ser transferidas para humanos através dos alimentos ou contato direto com os animais (AARESTRUP, 1999). Segundo Rajala-Schultz et al. (2004) as bactérias resistentes que são encontradas em animais produtores de alimentos, podem contaminar os produtos alimentícios e serem transferidas para humanos através da cadeia alimentar.

O *S. aureus* além de ser considerado um poderoso agente de infecção hospitalar vem apresentando resistência a vários antibióticos, por isso, é importante a realização de testes de sensibilidade antimicrobiana para cepas isoladas de leite de vaca, pois de acordo Sena (2000) na bovinocultura de leite a utilização de medicamentos, principalmente no tratamento de doenças como a mastite está muito difundida.

No Brasil, é comum o uso indiscriminado de medicamentos sem a realização de testes preliminares de sensibilidade *in vitro* e às vezes, até subdosagens, sujeitando-se a glândula mamária a tratamentos inadequados que podem ocasionar agravamento do processo, perdas econômicas e propiciar o desenvolvimento de resistência microbiana (CULLOR, 1993).

A produção leiteira vem baseando-se principalmente na terapêutica alopática, e o aumento do uso de antibióticos ocorre em função da persistência de certos microrganismos resistentes. Dentre eles o *S. aureus* é um dos mais patogênicos e causa uma infecção geralmente crônica diminuindo gradativamente a produção leiteira, sendo de difícil controle uma vez que apresenta geralmente resistência à penicilina e outros antibióticos (LANGENEGGER et al., 1981; COSTA et al., 2000; BENITES et al., 2002).

A utilização de antimicrobianos para o tratamento da mastite clínica ou da mastite subclínica no início do período seco é um componente importante dos programas de controle (BRAMLEY et al., 1996). A seleção do antimicrobiano apropriado é essencial, tanto do ponto de vista da saúde do animal, quanto da produtividade da glândula mamária. Os resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana ajudam o veterinário clínico na escolha do medicamento apropriado (FRANCIS, 1989; SUMANO e OCAMPO, 1992; FREITAS et al., 2005), além de reduzir os riscos do aparecimento de bactérias resistentes.

2.5 EXOTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

Artigo publicado na revista Ciência Veterinária nos Trópicos, Recife-PE, v.7, n. 2 e 3, p. 63-74, maio/dezembro de 2004

RESUMO

Staphylococcus aureus produz uma grande variedade de exotoxinas: as Enterototoxinas Estafilocócicas (SEs) que causam intoxicação alimentar estafilocócica, resultante do consumo de alimentos contendo SEs pré-formadas, Toxina Esfoliativa (ET) causadora da síndrome da pele escaldada, principalmente em crianças, e a Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), caracterizada por febre, hipotensão, envolvimento multiorgânico e descamação da pele. Devido à importância desta bactéria para a saúde pública objetivou-se com este trabalho revisar os principais aspectos das exotoxinas estafilocócicas, dando ênfase à caracterização bioquímica, genética e aos métodos de detecção destas toxinas.

Termos de Indexação: *Staphylococcus aureus*; Exotoxinas; Saúde Pública

STAPHYLOCOCCAL EXOTOXINS

ABSTRACT

Staphylococcus aureus produces a large variety of exotoxins: staphylococcal enterotoxins (SEs) which cause staphylococcal food poisoning, resulting from the consumption of food containing preformed SEs, Exfoliative Toxin (ET) responsible for the staphylococcal scalded-skin syndrome, mainly in children, and the Toxic Shock Syndrome Toxin 1 (TSST-1) characterized by high fever, hypotension, multiorgan involvement and desquamation of the skin. Because of the importance of this microorganism for the public health, the aim of this study was to review the mainly aspects about staphylococcal exotoxins, including biochemical, genetics and diagnostic characterization.

Index Terms: *Staphylococcus aureus*; Exotoxins; Public Health

INTRODUÇÃO

Na medicina humana e medicina veterinária o *Staphylococcus aureus* é responsável por várias afecções que acometem desde tecido cutâneo até infecções sistêmicas, com destaque nos animais para a infecção da glândula mamária. Assume grande importância na microbiologia de alimentos como agente de intoxicações alimentares devido à produção de enterotoxinas termoestáveis, servindo como indicador higiênico-sanitário na indústria alimentícia, visto que o manipulador de alimentos é a principal fonte e veículo deste microrganismo.

Toxinas são comumente substâncias de origem protéica produzidas por alguns microrganismos e que contribuem para sua patogenicidade. São classificadas em exo e

endotoxinas (KONEMAN et al., 2001). As exotoxinas são proteínas ou enzimas produzidas no interior de algumas bactérias Gram-positivas, decorrentes da multiplicação e metabolismo, dos microrganismos. Classicamente são agrupadas em três tipos, de acordo com seu modo de ação: citotoxinas, que destroem as células do hospedeiro ou afetam suas funções; neurotoxinas, que interferem com a transmissão normal de impulsos nervosos; e enterotoxinas, que afetam as células que revestem o trato gastrointestinal. As endotoxinas correspondem a porção externa da parede celular (lipopolissacarídeos) das bactérias Gram-negativas, que são liberadas após a morte bacteriana ou mesmo a lise da parede celular (TORTORA et al., 2002).

As principais exotoxinas produzidas pelos estafilococos são: as enterotoxinas, sorologicamente identificadas como SEA, SEB, SEC1-3, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ (CARMO et al., 2002), SEK (ORWIN et al., 2001) e, recentemente SEL (ORWIN et al., 2003), SEM, SEN, SEO (LOIR et al., 2003) e SEU (LETERTRE et al., 2003); a Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (BERGDOLL et al., 1981) e a Toxina Esfoliativa dos tipos A, B (LEE et al., 1987) C (SATO et al., 1994) e D (YAMAGUCHI et al., 2002).

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) podem ser detectadas *in vitro* ou pelas suas atividades biológicas *in vivo*. No entanto, por motivos práticos, a detecção de rotina é realizada por métodos imunológicos como imunodifusão, radioimunoensaio (RIA), aglutinação em látex, *immunoblotting* e ensaios imunoenzimáticos (ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Um método alternativo para verificar a capacidade enterotoxigênica de linhagens de estafilococos é a detecção específica de genes de toxinas através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction). Porém, segundo Mclauchlin et al. (2000), apenas a presença desses genes não indica,

necessariamente, a capacidade do microrganismo de produzir toxina biologicamente ativa suficiente para induzir manifestações clínicas de doença.

O GÊNERO *Staphylococcus*

De acordo com *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1986) a família Micrococaceae inclui quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*. Na atualidade, segundo Koneman et al. (2001), o gênero *Staphylococcus* é composto por 33 espécies.

No homem, a espécie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é causadora de infecções cutâneas como furunculoses, impetigo e abscessos (MURRAY et al., 1992), infecções orgânicas incluindo osteomielite, endocardite e artrites (SPICER, 2002), intoxicações alimentares (VERAS et al., 2003), síndrome da pele escaldada (LADHANI et al., 1999) e síndrome do choque tóxico (DINGES et al., 2000).

Os estafilococos também secretam um grupo de enzimas e citotoxinas que incluem quatro hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, proteases, lipases, hialuronidase e colagenase (DINGES et al., 2000), além de outras enzimas como catalase, fibrinolisinase, coagulase e beta-lactamase (SPICER, 2002). A produção destas enzimas e citotoxinas é regulada por elementos genéticos como plasmídios, transposons e profagos, considerados importantes fatores de virulência nas infecções estafilocócicas no homem e nos animais (NOVICK et al., 2001).

INTOXICAÇÃO ALIMENTAR ESTAFILOCÓCICA

As enterotoxinas produzidas e liberadas pelos estafilococos durante sua multiplicação nos alimentos são termoestáveis (SILVA JÚNIOR, 1997), o que indica que a

temperatura de cozimento dos alimentos não interfere na atividade biológica das SEs, possibilitando a instalação de quadros de intoxicação alimentar no homem. Giletto e Fyffe (1998) assinalam que as intoxicações estafilocócicas afetam 1,2 milhões de pessoas anualmente, resultando numa perda econômica de 1,5 bilhões de dólares.

A intoxicação alimentar estafilocócica é caracterizada clinicamente por náuseas, vômito, mal-estar, debilidade geral, diarreia aquosa não sanguinolenta e dor abdominal. Pode resultar em desidratação decorrente da perda significativa de líquido, sudorese e cefaléia, geralmente não acompanhada de estado febril. Os sintomas começam a manifestar-se aproximadamente quatro horas após o consumo do alimento contaminado (MURRAY et al., 1992). A pele e a mucosa do homem atuam como reservatórios de estafilococos, resultando em importante fonte de veiculação destes microrganismos para os alimentos (RAPINI et al., 2004). Nos animais domésticos, *S. aureus* é considerado o principal agente das infecções em glândula mamária (LIM et al., 2004).

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos contendo uma ou mais enterotoxinas. Estima-se que de 100ng a 1µg são eficientes para produzir a doença em indivíduos susceptíveis (BERGDOLL, 1990). Para que ocorra a produção mínima de enterotoxina estafilocócica no alimento é necessário que haja condições adequadas de temperatura e pH para a multiplicação dos estafilococos, até contagens de 10^5 UFC/g de alimento (MOSSEL e GARCIA, 1975). No entanto, Carmo e Bergdoll (1990) e Cunha Neto et al. (1999) detectaram enterotoxinas estafilocócicas em alimentos com níveis de contaminação estafilocócica entre 10^4 a 10^8 UFC/g e 10^2 a 10^4 UFC/g, respectivamente.

Em surtos de Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETAs) investigados pelos laboratórios de saúde pública do Estado de São Paulo, entre 1994 e 1998, Gelli et al. (1999) verificaram que das amostras analisadas em 776 surtos o agente causal foi identificado em

400 deles, dos quais *S. aureus* foi o mais prevalente (43,7%), demonstrando sua importância para a saúde pública.

Estudos epidemiológicos sobre toxinfecções alimentares envolvendo leite e derivados no Estado de Minas Gerais, no período entre 1997 e 2002, revelaram que dentre os produtos lácteos envolvidos nos surtos, o queijo ocupava lugar de destaque e *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. cohi*, *S. sciuri* e *S. lugdunensis* foram as espécies de *Staphylococcus* mais prevalentes, das quais foram detectadas as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e TSST-1 (VERAS et al., 2003).

Um dos principais indicadores de enterotoxigenicidade de estafilococos é o teste da coagulase. Contudo, alguns autores isolaram estafilococos coagulase negativa enterotoxigênicos das mãos de manipuladores de alimentos, leite e derivados (UDO et al., 1999; SENA, 2000). Estes resultados trazem reflexos importantes para a saúde pública, visto que a legislação brasileira não especifica padrões para estes microrganismos, restringindo-se apenas, a descrever valores para espécies coagulase positivas (SENA, 2000).

ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS (SEs)

As enterotoxinas são produzidas predominantemente por *S. aureus*. No entanto, outras espécies coagulase-positivas, incluindo *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus*, têm sido apontadas como enterotoxigênicas (SENA, 2000), bem como espécies coagulase negativas (RAPINI et al., 2003). Estas toxinas são resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais. A termo-estabilidade é observada pela viabilidade após aquecimento à 100⁰C durante 30 minutos (MURRAY et al., 1992) e as temperaturas de pasteurização lenta e rápida (FRANCO e LANDGRAFF, 2000). Isto

pressupõe que as atividades biológicas das enterotoxinas estafilocócicas permanecem inalteradas, mesmo após o processamento térmico usual dos alimentos (HOLECKOVÁ et al., 2002).

As enterotoxinas estafilocócicas pertencem à família denominada de toxinas pirogênicas (PT), originada de espécies de estafilococos e estreptococos. Nesta família também são incluídas a TSST-1, a toxina esfoliativa tipos (A e B) e as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (SPE) que apresentam determinadas estruturas, funções e seqüências de nucleotídeos similares (BALABAN e RASOOLY, 2000). Causam imunossupressão e a proliferação inespecífica de células T que são atividades atribuídas aos superantígenos (LOIR et al., 2003). Porém, entre estes, apenas SEs têm atividade emética (DINGES et al., 2000).

As enterotoxinas têm sido classificadas em cinco tipos sorológicos SEA, SEB, SEC, SED e SEE. Porém novas enterotoxinas já foram descritas na literatura, incluindo SEG, SEH, SEI, SEJ, SEL, SEM, SEN, SEO, SEU (REN et al., 1994; SU e WONG, 1995; MUNSON et al., 1998; ZHANG et al., 1998; JAURRAD et al., 2001; ORWIN et al., 2001, 2003; LETERTRE et al., 2003). A relação entre essas novas enterotoxinas e intoxicações alimentares ainda não está totalmente esclarecida (OMOE et al., 2002), exceto para SEG, SEH e SEI (MCLAUCHLIN et al., 2000).

SÍNDROME ESTAFILOCÓCICA DA PELE ESCALDADA

A síndrome estafilocócica da pele escaldada (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome - SSSS) é o termo utilizado para uma coleção de doenças bolhosas da pele, induzida por toxinas esfoliativas (ETs) de *S. aureus*. Primariamente, afeta neonatos e

crianças, embora adultos com infecções latentes também sejam susceptíveis (LADHANI et al., 2001).

Clinicamente apresenta-se de forma abrupta, com febre, sensibilidade da pele, eritema e descamação da epiderme (YAMAGUCHI et al., 2002), revelando uma superfície úmida e brilhante com aparência semelhante à pele escaldada (ARBUTHNOTT et al., 1990).

Sorologicamente, dois tipos da toxina denominadas ETA e ETB eram reconhecidas (JOHNSON et al., 1991). A toxina ETA codificada por gene cromossomal e ETB por gene plasmidial (LEE et al., 1987). Posteriormente, Sato et al. (1994) verificaram um novo tipo de toxina esfoliativa, denominada ETC, a partir de estirpes de *S. aureus* isolados de cavalo com infecções cutâneas. Recentemente, Yamaguchi et al. (2002) identificaram numa ilha de patogenicidade em isolados clínicos de *S. aureus* a sequência do gene de uma nova toxina esfoliativa, a ETD.

As toxinas esfoliativas apresentam os seguintes pesos moleculares: ETA 26,9 KDa, ETB 27,2 KDa (LEE et al., 1987; SATO et al., 1994), ETC 27,0 KDa (SATO et al., 1994) e ETD 27,2 KDa (YAMAGUCHI et al., 2002). A atividade da ETA é estável, mesmo após aquecimento a 100°C por 20 minutos, ao contrário da ETB e ETC, que são sensíveis ao aquecimento de 60°C por 15 a 30 minutos (SATO et al., 1994). A elevada termo-resistência da ETA gera reflexos em saúde pública, visto que esta toxina poderia induzir afecções cutâneas no homem, mesmo após tratamento convencionais dos alimentos.

Além da toxina esfoliativa estar relacionada a lesões na pele, e sua produção ser legada a linhagens de *S. aureus* isoladas de humanos clinicamente acometidos (MEHROTRA et al., 2000), sua presença em amostras de leite já foi demonstrada por Endo

et al. (2003) que detectaram o gene *eta* e a toxina ETA de isolados de leite de vacas com mastite.

SÍNDROME DO CHOQUE TÓXICO ESTAFILOCÓCICO

A síndrome do Choque Tóxico (TSS) é uma doença aguda mediada por toxinas (HERZER et al., 2001). Clinicamente é caracterizada por febre, rachaduras cutâneas, descamação particularmente dos pés e palmas das mãos, hipotensão e envolvimento multiorgânico (DINGES et al., 2000). A maior ocorrência da doença está relacionada a mulheres jovens em período menstrual. Porém, quando começaram a surgir casos em mulheres não menstruadas e homens, tornou-se evidente que esta síndrome poderia atingir qualquer grupo da população. Para que ocorra TSS é necessário que o paciente esteja infectado por *S. aureus* e que esta linhagem produza TSST-1 e consiga atingir a circulação (HERZER et al., 2001).

A proteína TSST-1 foi estudada por Bergdoll et al. (1981) como uma enterotoxina (denominada inicialmente de SEF), considerada originalmente como um problema em alimentos. No entanto, Thompson et al. (1986) relataram que não havia evidências para fundamentar esta possibilidade. Posteriormente, outros autores observaram a presença de TSST-1 em alimentos e isolados de leite de animais com mastite geralmente associada a SEs, principalmente SEA, SEC e SED (HO et al., 1989; CARDOSO et al., 2000).

TOXINAS ESTAFILOCÓCICAS E A GLÂNDULA MAMÁRIA

Nos animais domésticos, o *S. aureus* é considerado o principal agente de infecções da glândula mamária (LIM et al., 2004). No Brasil, Silva et al. (2005) analisando 36 estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite caprina e 64 de mastite bovina

verificaram a presença de genes das SEs em 37 (37%) dos isolados, dos quais seis eram de origem bovina e 31 de origem caprina, concluindo que os isolados de mastite caprina têm maior poder de enterotoxigenicidade e que a presença do gene *sec* na maioria dos isolados sugere um possível envolvimento da SEC na patogênese das mastites caprinas.

Entre as enterotoxinas clássicas SEA-SEE e a TSST-1, tem relevância nos casos de mastite bovina as linhagens de *S. aureus* que apresentam os genes para as toxinas SEC e TSST-1, pois estas são as estirpes associadas com severos casos de mastite clínica ou casos que não respondem à terapia com antibióticos (ZSCHÖCK et al., 2004).

A associação dos genes *sec* e *tst* em linhagens de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina também foi observada por Salasia et al. (2004) na Alemanha havendo, segundo estes autores, uma variação geográfica de linhagens de *S. aureus* enterotoxigênicos.

Em amostras de leite de vacas com mastite o genótipo mais freqüente é aquele portador dos genes *seg* e *sei* (OMOE et al., 2002; LONCAREVICK et al., 2005).

Cabral et al. (2004) pesquisaram a presença de genes para as SEs em 87 linhagens de *S. aureus* provenientes do Brasil e obtidas de leite de vacas com mastite, porém não encontraram os genes para as toxinas clássicas SEA-SEE, detectando apenas a presença dos genes para as toxinas SEG, SEH e SEI que são mais recentes. Segundo os mesmos autores, a presença de genes para estas novas toxinas não é importante no estabelecimento e disseminação das mastites. No entanto, segundo Katsuda et al. (2005), o papel dessas novas toxinas na patogenicidade dos isolados de *S. aureus* em afetar a glândula mamária não está elucidada. Porém, o predomínio destas estirpes portadoras de genes para novas SEs fortalece a teoria de que essas toxinas superantigênicas são importantes nas afecções da glândula mamária.

ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS: ASPECTOS GENÉTICOS E DETECÇÃO

Diferentes genes codificadores de enterotoxinas já foram estudados e suas denominações iniciam com as letras *se* (de enterotoxina estafilocócica) ou *ent* (de enterotoxina), das quais a primeira forma é a mais utilizada na atualidade. Estes genes são carregados por plasmídeos - *sed* e *sej* (BAYLES e IANDOLO, 1989; ZHANG et al., 1998), por fagos - *sea* e *see* (BETLEY e MEKALANOS, 1985), ou por cromossomos - *seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep* e *seq* (LETERTRE et al., 2003).

A SEA é expressa na metade da fase exponencial da multiplicação dos estafilococos (TREMAINE et al., 1993). A detecção do gene *sea* em linhagens de *S. aureus* é importante visto que a SEA é tóxica em baixas concentrações (EVENSON et al., 1988). O gene *sea* é composto por 771 pb e codifica proteína precursora da SEA com 257 resíduos de aminoácidos e peso molecular de 27,1 KDa (BETLEY e MEKALANOS, 1988).

De acordo com Holecková et al. (2002), SEB foi a principal enterotoxina produzida por *Staphylococcus* sp isolados de queijos fabricados com leite de ovelha. O gene (*seb*) consiste de 798 nucleotídeos que codifica uma proteína com 266 aminoácidos e peso molecular de 31,4 KDa (JOHNS e KHAN, 1988).

De um total de 39 SECs produzidas por estirpes de *S. aureus* responsáveis por 20 surtos de intoxicação alimentar no centro de Taiwan, 12 SECs pertenciam ao subtipo SEC2 e 13 ao subtipo SEC3. Apenas uma linhagem pertencia ao subtipo SEC1 e 13 a outros subtipos de SECs. Isso demonstra que SEC2 e SEC3 são os subtipos de SECs mais freqüentes em surtos de intoxicação alimentar (CHEN et al., 2001).

Estudando 100 estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite nos estados do Ceará e Rio de Janeiro, das quais 36 de origem bovina e 64 de origem caprina, Silva et al. (2005)

observaram a presença do gene *sec* em 2 (3,1%) dos isolados bovinos e em 31 (86%) dos isolados caprinos. Segundo Wilson et al. (1991), as SECs estão comumente associadas ao leite e produtos derivados provenientes de bovinos, ovinos e caprinos.

O gene *sec1* contém 801 pb e codifica uma proteína madura com 239 aminoácidos e 27,4 KDa (BOHACH e SCHLIEVERT, 1987). O gene *sec2* contém 801 pb e codifica proteína madura com 239 aminoácidos e 26,0 KDa (BOHACH e SCHLIEVERT, 1989). O gene *sec3* contém 798 bp e codifica uma proteína madura com 238 aa e 27,4 KDa (COUCH e BETLEY, 1989).

De acordo com Casman et al. (1967), SED é comumente produzida por estirpes de *Staphylococcus* isoladas de leite e alimentos congelados, enquadrando-se como a segunda SEs mais encontrada, depois de SEA, em intoxicações alimentares. A baixa produção de SED é significativa, pois pouca quantidade de enterotoxina (100 a 200 ng) é necessária para causar doença, especialmente em crianças e idosos (KOKAN e BERGDOLL, 1987). O gene *sed* foi localizado no plasmídio da penicilinase de 27,6 kb e codifica uma proteína madura com 228 aminoácidos, com peso molecular de 26,3 KDa (BAYLES e IANDOLO, 1989).

O gene para SEE (*see*) codifica uma proteína de 29 KDa (COUCH et al., 1988) que apresenta homologia com SEA e SED (BALABAN e RASOOLY, 2000).

Dois novos genes de enterotoxinas estafilocócicas foram identificados e designados *seg* e *sei*, codificando proteínas precursoras de 258 aminoácidos (SEG) e 242 aminoácidos (SEI) e proteínas maduras de 27,0 KDa (SEG) e 24,9 KDa (SEI), ambas com a propriedade de proliferação de células T e ação emética (MUNSON et al., 1998). Os genes *seg* e *sei* estão presentes em *S. aureus* em um mesmo fragmento de DNA com 3,2 Kb, orientados em *tandem* (JAURRAD et al., 1999). No mesmo estudo foi verificado que em 12 linhagens de

S. aureus isoladas de pacientes com TSS e SSSS, não foram observadas a produção de TSST-1, SEA-SEE, ETA ou ETB. Porém, utilizando *primers* específicos para *seg* e *sei*, ambos os genes foram detectados em todas as amostras, demonstrando que SEG e SEI estão associadas com as síndromes do choque tóxico e a da pele escaldada.

Omoe et al. (2002) pesquisaram a presença de genes das enterotoxinas estafilocócicas (*sea* a *sei*) em 146 estirpes de *S. aureus*, 71 destas provenientes de humanos envolvidos em 25 surtos de intoxicações alimentares, 18 de humanos sadios, 21 de vacas com mastite e 36 de leite de vaca. Verificaram também que 113 (77,4%) dos isolados foram positivos para um ou mais genes de SEs, e 35 linhagens portavam *seg* e 32 *sei*.

Ren et al. (1994) purificaram SEH de uma estirpe clínica de *S. aureus* de um paciente com TSS não associada ao período menstrual que foi negativa para TSST-1. Su e Wong (1996) desenvolveram um ELISA para SEH e observaram que uma amostra envolvida em intoxicação alimentar produziu SEH, demonstrando que esta toxina é capaz de causar intoxicação alimentar e sintomas de TSS. Seu peso molecular é de 27,3 KDa e seu ponto isoelétrico de 5,7 que é considerado ácido, diferentemente das demais SEs conhecidas que possuem pH neutro ou básico com pontos isoelétricos variando de 7,0 a 8,6 (SU e WONG, 1995).

A caracterização do plasmídio portando o gene responsável pela codificação da enterotoxina D revelou a presença de uma ORF (Open Reading Frame – sequência aberta de leitura) a qual codifica uma enterotoxina com 268 aminoácidos e 31,2 KDa previamente não identificada, designada enterotoxina estafilocócica J (SEJ). As ORF de *sed* e *sej* são orientadas em direções opostas no plasmídio (pBI485) e são separadas por 895 nucleotídeos (ZHANG et al., 1998).

A SEK tem um peso molecular de 26,0 KDa e é codificada pelo gene *sek* contido em uma ilha de patogenicidade estafilocócica (SaPI), que também contém o gene *seb* para a SEB (ORWIN et al., 2001).

O gene responsável pelas SEM, SEN e SEO pode ser carregado pelos isolados de *S. aureus* portando os genes *seg* e *sei*. No entanto, SEL, SEM, SEN e SEO não têm demonstrado atividades eméticas em modelos animais, mas em caso de elevada produção de SEG e SEI poderiam causar intoxicações (OMOE et al., 2002).

A presença do gene *seu* codificador da enterotoxina estafilocócica denominada SEU foi descrita por LETERTRE et al. (2003) em um *cluster egc* de *Staphylococcus aureus*.

O desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e eficazes para a detecção de patógenos de origem alimentar tem recebido maior atenção nos últimos anos devido a preocupação com a saúde pública e maior conscientização dos riscos de contaminação microbiológica de alimentos (RAMESH et al. 2002).

A caracterização das SEs tem sido dificultada por fatores como baixos níveis de produção da toxina, dificuldades associadas com a purificação e a falta de métodos simples e rápidos para suas detecções (SU e WONG, 1995).

Devido às informações sobre a sequência de DNA das SEs (REN et al., 1994; SU e WONG, 1995, 1997; MCLAUCHLIN et al., 2000), a PCR torna-se um método alternativo para a detecção dos genes destas toxinas (BECKER et al., 1998), mostrando-se uma técnica simples e reprodutível, funcionando como uma ferramenta genética para estudos epidemiológicos.

De um total de 176 estirpes de *Staphylococcus* isoladas de alimentos em Taiwan, 64 foram positivas para enterotoxinas através do Kit SET-RPLA e 72 pela PCR (TSEN et al., 1995), demonstrando a alta eficiência da técnica molecular. No mesmo estudo foi

observado que a PCR permite a detecção específica do gene de algumas toxinas, como o da toxina E que não é detectada pela RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination).

A utilização da PCR na identificação de genes de SEs em isolados de *S. aureus* é uma alternativa de baixo custo em relação a alguns métodos imunológicos (JOHNSON et al., 1991; MCLAUCHLIN et al., 2000).

Entre os testes imunológicos o ELISA é tão eficiente e sensível quanto RIA e não necessita do uso de material radioativo (MORISSETTE et al., 1991). Gómez-Lucía et al. (1989) verificaram que a imunodifusão não é um bom método para a determinação de enterotoxinas em alimentos, pois os diferentes componentes podem inibir ou realçar sua síntese. Outros estudos relatam ótima concordância entre métodos genéticos (hibridização, PCR) e métodos imunológicos (RIA, Imunodifusão em gel, ELISA, RPLA) na detecção de exotoxinas estafilocócicas (MCLAUCHLIN et al., 2000; HOLECKOVÁ et al., 2002).

Atualmente, em laboratórios de referência, os métodos mais utilizados são o ELISA na indústria de alimentos e o PCR em estudos epidemiológicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É notória a importância do *Staphylococcus aureus* para a Saúde Pública, principalmente no que se refere às suas exotoxinas. Muito já foi estudado sobre este microrganismo e seus fatores de patogenicidade, porém mais pesquisas ainda devem ser realizadas para se compreender melhor o envolvimento desta bactéria na etiologia de várias doenças, para a prevenção das intoxicações alimentares e incremento no diagnóstico das exotoxinas reconhecidas e de outras toxinas do agente, otimizando o uso da biologia molecular que nos últimos anos tem trazido grande contribuição ao estudo deste microrganismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARBUTHNOTT, J.P.; COLEMAN, D.C.; DE AZEVEDO, J.S. Staphylococcal toxins in human disease. In: The Staphylococci: an introduction. **The Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 69, n.19, p.101-107, 1990.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal Enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, p. 01-10, 2000.

BAYLES, K.W.; IANDOLO, J.J. Genetic and molecular analices of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, p. 4799-4806, 1989.

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.36, p. 2548-2553, 1998.

BERGDOLL, M.S.; CRASS, B.A.; REISER, R.F. et al. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with the toxic shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. **Lancet**, Oxford, p. 1017-1021, 1981.

BERGDOLL, B.M. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p. 91-100, 1990.

BETLEY, M.J.; MEKALANOS, J. J. Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. **Science**, Washington, v. 229, p. 185-187, 1985.

BETLEY, M.J.; MEKALANOS, J.J. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, p. 34-41, 1988.

BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Molecular and General Genetics**, Oakland, v. 209, p. 15-20, 1987.

BOHACH, G.A.; SCHLIEVERT, P.M. Conservation of the Biologically Active Portions of Staphylococcal Enterotoxins C1 and C2. **Infection and immunity**, Washington, v. 57, n. 7, p. 2249-2252, 1989.

CABRAL, K. G.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M. et al. Pheno and genotyping *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Canada, v. 50, p. 901-909, 2004.

CARMO, L.S.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 320-323, 1990.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v. 14, p. 09-14, 2002

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N.A. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, p. 7-10, 2000.

CASMAN, E.P.; BENNETT, E.P.; DORSEY, A.E. et al. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 94, n. 6, p.1875-1882, 1967.

CHEN, T.R.; HSIAO, M.H.; CHIOU, C.S. et al. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, p. 63-70, 2001.

COUCH, J.L.; SOLTIS, M.T.; BETLEY, M.J. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 2954-2960, 1988.

COUCH, J.L.; BETLEY, M.J. Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, p. 4507-4510, 1989.

CUNHA NETO, A. **Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de alimentos.**

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Nutrição, 1999. 65p.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

ENDO, Y.; YAMADA, T.; MATSUNAGA, K. et al. Phage conversión of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 96, p. 81-90, 2003.

EVENSON, M.L.; HINDS, M. W.; BERNSTEIN, R.S. et al. Estimation of human dose of Staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 7, p. 311-316, 1988.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAFF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2000, 182p.

GELLI, D.S.; JACABI, M.; SAKUMA, H. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (ETAs) investigados pelos laboratórios de Saúde Pública do Estado de São Paulo, no período de 1994 a 1998. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., Salvador. **Anais...** Salvador: [s. n.], 1999. p. 126.

GILETTO, A.; FYFFE, J. G. A novel ELISA format for the rapid and sensitive detection of Staphylococcal enterotoxin A. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Bunkyo-ku, v. 62, n. 11, p. 2217-2222, 1998.

GOMEZ-LUCÍA, E.; GOYACHE, J.; ORDEN, J.A. et al. Production of enterotoxin A by supposedly nonenterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 6, p. 1447-1451, 1989.

HERZER, C.M. Toxic Shock Syndrome: Broadening the Differential Diagnosis. **The Journal of American Board of Family Practice**, Lexington, v.14, n. 2, p. 131-136, 2001.

HO, G.; CAMPBELL, W.H.; BERGDOLL, M.S. et al. Production of toxic shock syndrome toxin variant by *Staphylococcus aureus* associated with sheep, goats, and cows. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.27, n. 9, p. 1946-1948, 1989.

HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M. et al. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Lublin, v. 9, p. 179-182, 2002.

JAURRAD, S; COZON, G.; VANDENESCH, F.. et al. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 2446-2449, 1999.

JAURRAD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A. et al. *egc* a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nurse of superantigens in *Staphylococcus aureus*.

Journal of Immunology, Rockville Pike, v. 166, p. 669-677, 2001.

JOHNS JR., M.B.; KHAN, A. Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with discrete genetic element. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 4033-4039, 1988.

JOHNSON, W.M.S.; TYLER, S.D.; EWAN, E.P. et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, n. 3, p. 426-430, 1991.

KATSUDA, K.; HATA, E.; KOBAYASHI, H. et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 105, p. 301-305, 2005.

KOKAN, N.P.; BERGDOLL, M.S.. Detection of low-enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n. 11, p. 2675-2676, 1987.

KONEMAN, F.W.; ALLEN S.D.; JANDA, S.P.C. et al. Cocos Gram-Positivos: Parte I: Estafilococos e Microrganismos Relacionados, pp.551-588. In: KONEMAN, F.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, P.C. et al. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, 1465p.

LADHANI, S.; JOANNOU, C. L.; LOCHRIE, D.P. et al. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 2, p. 224-242, 1999.

LADHANI, S.; ROBBIE, S.; GARRATT, R.C. et al. Development and evaluation of detection system for staphylococcal exfoliative toxin A responsible for scalded-skin syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 6, p.: 2050-2054, 2001.

LEE, C.Y.; SCHMIDT, J.J.; JOHNSON-WINEGAR, A.D. et al. Sequence determination and comparison of exfoliative toxin A and B genes from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, p. 3901-3909, 1987.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F. et al. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 63-76, 2003.

LIM, S.K.; JOO, Y.; MOON, J. et al. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 66, n. 5, p. 581-584, 2004.

LOIR, Y.L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and Food Poisoning. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 2, p. 63-76, 2003.

LONCAREVIC, S.; JORGENSEN, H. J.; LOVSETH, A. et al. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Journal of Applied Microbiology**, United Kingdom, v. 98, p. 344-350, 2005.

MCLAUCHLIN, J.; NARAYANAN, G.L.; MITHANI, V. et al. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, p. 479-488, 2000.

MEHOTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.

MORISSETTE, C.; GOULET, J.; LAMOUREX, G. Rapid and sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin B in cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 3, p. 836-842, 1991.

MOSSEL, D.A.A.; GARCIA, M.B. **Microbiologia de los Alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos.** 1º Edição. Zaragoza: Acribia, 1975, 375p.

MURRAY, P.R.; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G. et al. **Microbiologia Médica.** 3º Edição. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1992, 513p.

MUSON, S.H.; TREIMANE, M.T.; BETELEY, M.J. et al. Identification and characterization of *Staphylococcus* enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, p. 3337-3348, 1998.

NOVICK, R.P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and Resistance Islands of *Staphylococci*. **Microbes and Infection**, Amsterdam, v. 3, p. 585-94, 2001.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; SHIMODA, Y. et al. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh* ou *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n.3, p. 857-862, 2002.

ORWIN, P.M.; LEUNG, D.Y.M.; HEATHER, L.D. et al. Biochemical and Biological Properties of *Staphylococcal* Enterotoxin K. **Infection and Immunity**, Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 360-366, 2001.

ORWIN, P.M; FITZGERALD, J.R.; LEUNG, D.Y.M.. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin L. **Infection and Immunity**, Amsterdam, v. 71, n. 5, p. 2916-2919, 2003.

RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B.P.; CHANDRASHEKAR, A. et al. Application of convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. **Molecular and Cellular Probes**, Oxford, v. 16, p. 307-14, 2002.

RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N.E. et al. Resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. enterotoxigênicos isoladas de queijo tipo coalho. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104-105, p.161, 2003.

RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N.E. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.

REN, K; BANNAN, J.D.; PANCHOLI, V. et al. Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 180, p. 1675-1683, 1994.

SALASIA, S. I. O.; KHUSNAN, Z.; LÄMMLER, C. et al. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. **Journal of Veterinary Science**, Korea, v. 5, n. 2, p. 103-109, 2004.

SATO, H.; MATSUMORI, Y.; TANABE, T. et al. A new type of staphylococcal exfoliative toxin from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon. **Infection and Immunity**, Amsterdam, v. 62, n. 9, p. 3780-3785, 1994.

SENA, M.J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000, 75p.

SILVA JR. E.A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. São Paulo: Varela, 1997, 385p.

SILVA, E. R.; CARMO, L. S.; SILVA, N. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 106, p. 103-107, 2005.

SPICER W.J. **Bacteriologia, Micologia e Parasitologia Clínica**. 1º Edição. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2002, 224p.

SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1438-1443, 1995.

SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Detection of staphylococcal enterotoxin H by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 3, p. 327-330, 1996.

SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Current Perspectives on Detection of Staphylococcal Enterotoxins. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, p. 195-202, 1997.

THOMPSON, N.E.; GOMEZ-LUCIA, E.; BERGDOLL, M.S. Incidence of antibodies reactive with toxic shock syndrome toxin 1 in bovine milk. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, n. 4, p. 865-867, 1986.

TORTORA, J.G.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6ª Edição. São Paulo: Artmed, 2002, 827p.

TREIMANE, M.T.; BROCKMAN, D.K.; BETLEY, M.J. Staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression is not affected by the accessory gene (agr). **Infection and Immunity**, Washington, v. 61, p. 356-359, 1993.

TSEN, H.; YU, G.; LIN, I. Plasmid profiles and pulsed-field gel electrophoresis for type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 2, p. 147-153, 1995.

UDO, E.E.; AL-BUSTAN, M.A.; JACOB, L.E. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potencial cause of food poisoning. **Journal of Medical Microbiology**, Spencers woods, v. 48, p. 819-823, 1999.

VERAS, J.F.; SANTOS, D.A.; CARMO, L.S. et al. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, p. 218, 2003.

WILSON, I.G.; COOPER, J.E.; GILMOUR, A. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: use of polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes *entB* and *entC1* and thermonuclease gene *nuc*. **Applied of Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n.6, p. 1793-1798, 1991.

YAMAGUCHI, T.; NISHIFUJI, K.; SASAKI, M. et al. Identification of the *Staphylococcus aureus* etd pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 10, p. 5835-5845, 2002.

ZSCHÖCK, M.; RIBE, K.; SOMMERHÄUSER, J. Occurrence and clonal relatedness of *sec/tst*-gene positive *Staphylococcus aureus* isolated of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, United Kingdom, v. 38, p. 493-498, 2004.

ZHANG, S.; IANDOLO, J.J.; STEWART, G.C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 168, p. 227-233, 1998.

2.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica muito sensível, permitindo a detecção de baixas concentrações de microrganismos, além de ser mais específica e rápida em relação às técnicas convencionais comumente empregadas para o isolamento de microrganismos (WILSON et al., 1994; TAMARAPU et al., 2001; GILLESPIE e OLIVER, 2005; CREMONESI et al., 2005). Além do mais, tal técnica tem a vantagem de poder detectar microrganismos vivos, danificados e mortos, que são frequentemente encontrados em alimentos que foram submetidos a processos térmicos (NÁJARA-SÁNCHEZ et al., 2003).

As principais vantagens da técnica de PCR são: requerer quantidades muito pequenas de DNA, ser extremamente sensível e de simples execução, quando se tem a condição de reação padronizada, como reagentes, ciclos térmicos, amostras de DNA e pH da reação (FARAH, 1997; MATIOLI e PASSOS-BUENO, 2002). Desta forma, a obtenção de DNA genômico de boa qualidade e quantidade para amplificação pela reação em cadeia da polimerase torna-se um fator crucial para a pesquisa e diagnóstico laboratorial (NOGUEIRA et al., 2004).

A técnica da PCR para amplificação de uma sequência específica foi descrita por Kary Mullis no final dos anos 80 e tem como objetivo replicar seletivamente e rapidamente *in vitro*, grandes quantidades de uma sequência específica de DNA. A única exigência é que as sequências nas bordas da região selecionada sejam conhecidas, de modo que dois oligonucleotídeos iniciadores *primers*, geralmente de 20pb, se associem à molécula de DNA-alvo possibilitando o início da síntese pela DNA-polimerase na região desejada (BROWN, 1999).

A PCR é a amplificação enzimática de uma sequência específica de DNA, visando a produção de milhões de cópias desta sequência em um tubo de ensaio. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a ação da enzima DNA-polimerase, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo fita molde. A DNA-polimerase requer, entretanto, um “ponto de início” ligado à fita molde que servirá de apoio para que nucleotídeos subsequentes sejam adicionados. Esse ponto de início da síntese é fornecido por um oligonucleotídeo que se hibridiza (se anela) à fita molde simples, o qual é denominado de *primer* (FARAH, 1997; STRACHAN e READ, 2002; TURNER et al., 2004).

Na prática, o que se faz numa reação de PCR é adicionar em um tubo de ensaio uma quantidade muito pequena de DNA genômico, desoxirribonucleotídeos (dNTPs), tampão de reação, $MgCl_2$ em concentração adequada, uma DNA-polimerase termoestável e os oligonucleotídeos que servirão de *primers* (iniciadores), esses componentes são então misturados e a amostra é colocada em um termociclador (ZAHA et al., 2003) (Figura 3).

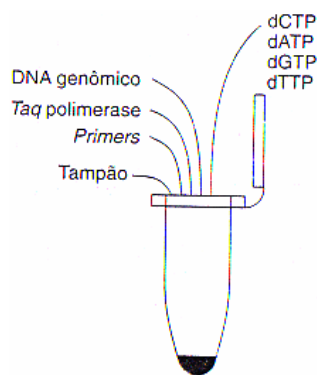


Figura 3 – Reação em Cadeia da Polimerase. Preparo da reação em tubo de ensaio antes da colocação em termociclador.

No termociclador, o tubo de ensaio contendo a amostra é submetido a uma alta temperatura, geralmente 94⁰C, para provocar o rompimento das pontes de hidrogênio entre ambas as cadeias de DNA, causando a desnaturação da molécula. A temperatura é diminuída a 65⁰C quando então, os *primers* têm a oportunidade de se anelarem às suas seqüências complementares no DNA genômico. Finalmente, a temperatura é colocada em torno de 72⁰C, temperatura ideal para que a DNA-polimerase utilizada na reação atue, dirigindo a síntese de novas cadeias (FARAH, 1997). Repetindo-se esses três tipos de passos, desnaturação, anelamento e síntese, por cerca de 30 ciclos permite-se a amplificação do DNA molde de forma exponencial (FARAH, 1997; TORTORA et al. 2000; ZAHA et al., 2003) (Figura 4).

As SEs são rotineiramente detectadas por ELISA, imunodifusão, radioimunoensaio, aglutinação em latex, mas a exequibilidade destes métodos é usualmente limitada a testes comerciais para SEA, SEB, SEC, SED e SEE (LETERTRE et al., 2003; CREMONESI et al., 2005). Além disso, a sensibilidade e especificidade desses métodos sempre dependem da obtenção de quantidades detectáveis de toxinas e podem variar significativamente com a pureza dos reagentes. Além do mais, esses testes levam de 3 a 24 horas para cada detecção, com sensibilidade de 0,25-1,0ng/mL ainda havendo a possibilidade de resultados falso-positivos (CHEN et al., 2001).

O seqüenciamento dos genes codificadores de todas as SEs identificadas têm dado a oportunidade para a detecção e diferenciação de todos os genes se pela técnica de PCR. A contínua identificação de novas SEs e o requerimento de métodos rápidos na investigação de intoxicações alimentares, tem levado ao desenvolvimento de métodos para a detecção simultânea de todos os genes se, como a técnica de PCR-Multiplex (MONDAY e BOHACH, 1999).

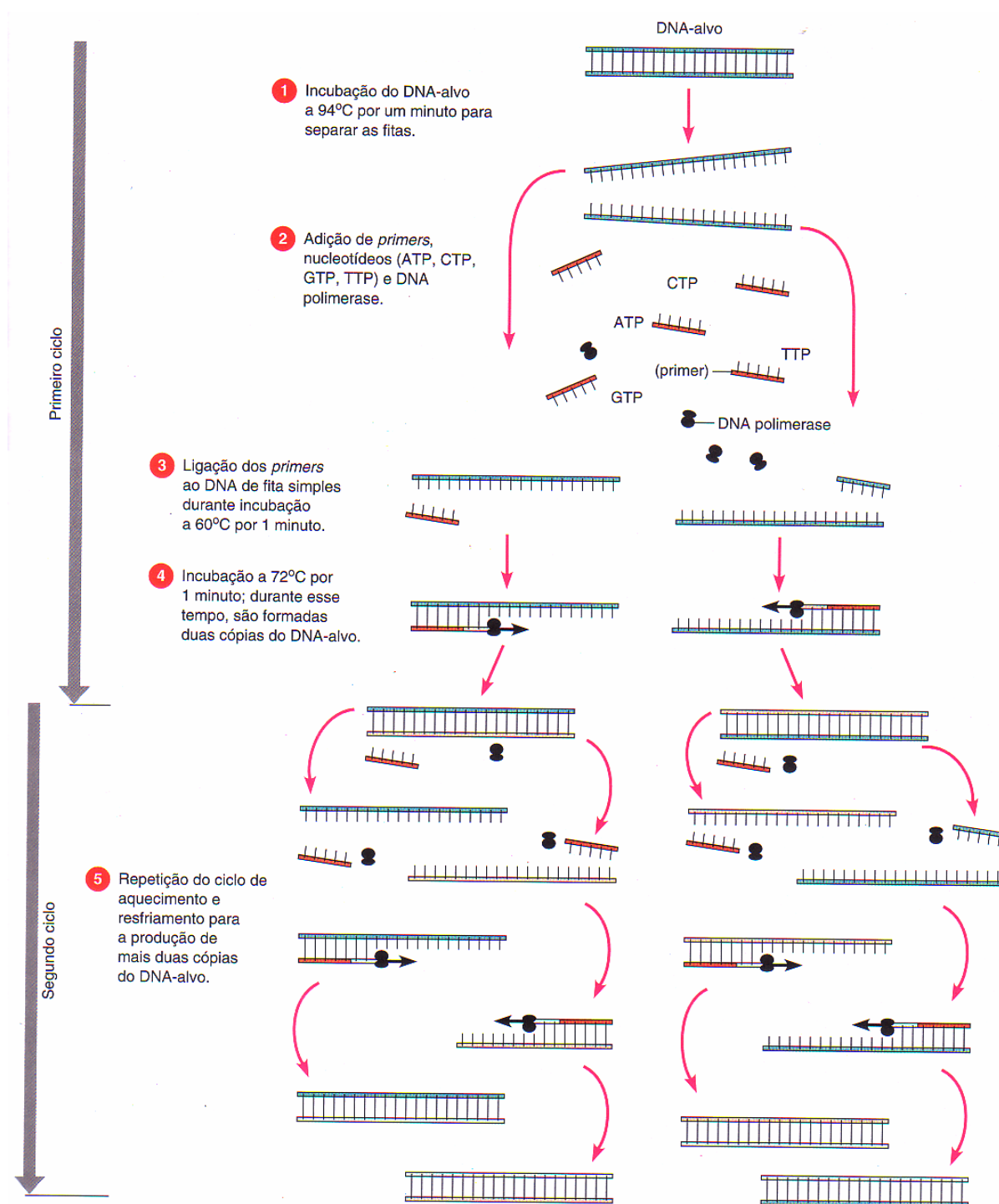


Figura 4 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Fonte: (TORTORA et al., 2000).

A PCR-Multiplex é uma variação da técnica de PCR, onde há a utilização de vários pares de *primers*, específicos para diferentes seqüências-alvo, numa mesma reação de amplificação. Este procedimento permite que várias seqüências de uma mesma molécula de DNA sejam lidas, ou ainda, que múltiplos fatores de virulência de um mesmo patógeno sejam pesquisados (SCHOSKE et al., 2003; MARTINEZ e TADDEI, 2004).

Desde que foi primeiramente descrita em 1988, a PCR-Multiplex tem sido amplamente aplicada em várias áreas que trabalham com testes de DNA (CHAMBERLAIN et al., 1988; SHUBER et al., 1993; HENEGARIU et al., 1994; SCHOSKE et al., 2003; OMOE et al., 2005).

Com relação à detecção de genes *se* Omoe et al. (2005) utilizaram a técnica de PCR-Multiplex para detectar 18 tipos de genes toxigênicos. Esta versatilidade permitiu que vários outros trabalhos também utilizassem este tipo de técnica, pois a mesma permite a detecção rápida e real de cepas de *S. aureus* portadoras de genes *se* que foram isoladas de amostras de leite e derivados (SHARMA et al., 2000; ROSEC e GIGAUD, 2002; NÁJERA-SÁNCHEZ et al., 2003; LONCAREVIC et al., 2005; CREMONESI et al., 2005; JORGENSEN et al., 2005a, 2005b) economizando tempo e gastos com materiais.

3-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; DANGLER, C.A.; SORDILLO, L.M. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v.2, n.59, p. 124-128, 1995.

AARESTRUP, F. M. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 12, p. 279-285, 1999.

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

AQUINO, F. T. M. (1983). **Produção de queijo de coalho na Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento**. 1983. 88p. Dissertação (Mestrado). Centro de Tecnologia. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1983.

ARAÚJO, W. P. (1984). ***Staphylococcus aureus* em leite cru. Produção de enterotoxina, caracterização da origem provável, humana ou bovina, a partir de cepas isoladas**. 1984. 127p. Tese (Livre Docência). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 1984.

BARBER, D. A.; New perspectives on transmission of food-borne pathogens and antimicrobial resistance. **American Veterinary Medical Association**. v. 218, p. 1559-1561, 2001.

BARTLETT, P. C.; MILLER, G. Y.; LANCE, S. E.; HEIDER, L. E. Managerial determinants of intramammary coliform and environmental streptococci infections in Ohio dairy herds. **Journal of Dairy Science**. v. 75, p. 1241-1252, 1992.

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, p. 2548-2553, 1998.

BENITES, N. R.; GUERRA, J. L.; MELVILLE, P. A.; COSTA, E. O. Aetiology and histopathology of bovine mastitis of expontaneous ocurrente. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 49, p. 366-370, 2002.

BLANC, B. O leite, fator essencial do equilíbrio vital. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 29, n. 172, p. 9-10, 1974.

BLOOD, D. C.; RADOSTITIS, O. M. **Clínica Veterinária**. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p. 424-463.

BORGES, M. S.; RODRIGUES, R.; RUBINICH, J. et al. Comparison of the quality of two types of milk at two sources in Belo Horizonte, Brazil market. **Journal of Food Protection**. v. 41, n. 9, p. 739-742, 1978.

BRABES, K. C. S.; CARVALHO, E. P.; DIONÍSIO, F. L.; PEREIRA, M. L.; GARINO JR, F.; COSTA, E. O. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Revista NAPGAMA**. v. 2, n. 3, p. 4-5, 1999.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos**. Diário Oficial da União, Brasília, 11 de março de 1996. Secção 1. p. 3977.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 30691 de 29 de março de 1952. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Diário Oficial da União, Brasília, 7 de julho de 1952. Secção 1. p. 10785.

BRASIL. Ministério da agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa, Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga.** Diário Oficial da União, Brasília, 16 de julho de 2001. Secção 1. p. 13.

BRITO, J. R.F.; CALDEIRA, G. A. V.; VERNE QUE, R. S.; BRITO, M. A. V. P. Sensibilidade e especificidade do California Mastitis Test como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 2, n. 17, p. 49-53, 1997.

BROW, T. A. **Genética, um enfoque molecular: Estudo de genes clonados.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 278-296.

BUYSER, M. L. D.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**. v. 67, p. 1-17, 2001.

CABRAL, T. M. A. (1993). **Coliformes totais e fecais e *Staphylococcus aureus* enteropatogênicos em queijos de coalho comercializados no município de João Pessoa-PB.** 1993. 88p. Dissertação (Mestrado). Centro de Tecnologia. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1993.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; ANUNCIAÇÃO, L. L. C. et al. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 47, n. 2, p. 113-122, 1994.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; ANUNCIAÇÃO, L. L. C.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State (Brazil). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 47, p. 113-122, 1995.

CARMO, L. S.; VIEIRA, C.; REIS, J.; DARC, P. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* present em food implicated em food poisoning. **Revista de Microbiologia**. v. 227, p. 122-125, 1996.

CHAMBERLAIN, J. S.; GIBBS, R. A.; RANIER, J. E.; NGUYEN, P. N.; CASKEY, C. T. Deletion screening if the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**. v. 16, p. 11141-11156, 1988.

CHEN, T. R.; HSIAO, M. H.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. Developmente and use of PCR *primers* for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**. v. 71, p. 63-70, 2001.

CARRARO, C. N. M.; LEITE, L.C.; SOSSELA, R.J.F. Resíduos de antibióticos no leite provenientes de quartos tratados e não tratados de vacas leiteiras. **Higiene Alimentar**, v.17, p.36, 2003.

CENTORBI, O.N. P.; CUADRADO, A. M. A.; ALCARAZ, L. E.; LACIAR, M. C.; MILAN, M. C. Prevalência de *S. aureus* aislados de masittis subclínica bovina en tambos de la cuenca lechera de la ciudad de San Luis. **Revista Argentina de Microbiologia**. v. 24, p. 73-80, 1992.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M. et al. Frequência de *Listeria* sp e de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas produzido artesanalmente. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. 1994. Olinda. **Anais...**Olinda, p. 507.

CHEN, J. H.; HOTCHKISS, J. H. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Clostridium sporogenes* in cottage cheese in modified atmosphere packaging. **Journal of Dairy Science**. v. 79, n. 6, p. 972-977, 1993.

CÔRREA, W. M.; CÔRREA, C. N. M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. Rio de janeiro: Médica e Científica Ltda., 1992, 843p.

COSTA, E. O. Importância econômica da mastite infecciosa bovina. **Comunidade Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. v. 15, n. 1, p. 21-26, 1991.

COSTA, E. O.; SÁ, R.; PONCE, H.; WATANABE, E. T.; VALLE, C. R. Avaliação da terapia de mastite clínica: eficácia terapêutica medida em números de dias de tratamento. **Revista NAPGAMA**. v. 2, n. 2, p. 10-14, 1999.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; THIERS, F. O.; RIBEIRO, A. R.; GARINO JR, F.; SILVA, J. A. B. Escore de CMT em relação ao nível de células somáticas em leite do tanque de refrigeração e percentual de mastite subclínica em propriedades leiteiras de São Paulo e Minas Gerais. **Revista NAPGAMA**. v. 3, n. 2, p. 14-18, 2000.

CULLOR, J.S. The control, treatment, and prevention of the various types of bovine mastitis. **Veterinary Medicine**. v.88, p.571-579, 1993

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. Development of multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**. v. 19, n. 5, p. 299-305, 2005.

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

DA SILVA, N.; FIGUEIREDO, J. B.; OLIVEIRA, M. Mamite no rebanho bovino da Escola Média de Agricultura de Florestal UFVMC. Parte II. Frequência etiologia. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 35, p. 471-478, 1983.

DAVIS, J. C.; WILBEY, R. A. Microbiology of cream and dairy desserts In: Robinson, R. K. (ed). **Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk Products**. 2ed. London: Elsevier, 1990. v. 2, p.41-108.

DE SÁ, M. E. P.; MOTA, R. A.; SOUZA, M. I.; OLIVEIRA, A. A. F. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v. 7, n. 2, p. 100-103, 2000.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

FARAH, S. B. **DNA Segredos e Mistérios**. São Paulo: Sarvier. 1997, 276p.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitário em queijo de coalho produzido no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, p. 162-165, 2003.

FERREIRO, L.; SOUZA, H. M.; HEINECK, L. A. Influence of subclinical mastitis on the milk composition of the cross bred dairy cattle. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**. v. 35, p. 19-24, 1980.

FITZGERALD, J. R.; MONDAY, S. R.; FOSTER, T. J.; BOHACH, G. A.; HARTIGAN, P. J.; MEANEY, W. J.; SMYTH, C. J. Characterisation of putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal of Bacteriology**. v. 183, p. 63-70, 2001.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial & Gráficos Ltda. 2001, 175pp.

FRANCIS, P. G. Mastitis therapy. **Brasilian Veterinary Journal**. v. 145, p. 302-311, 1989.

FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVERIA, L. A. T. Avaliação da qualidade higiênico-sanitário de leite e derivados. **Higiene Alimentar**. v. 14, n. 68-69, p. 70-77, 2000.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M. S.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.

FUEYO, J. M.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R.; MUÑIZ, J.; ALVAREZ, M. A.; MARTÍN, M. C. Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with macrorestriction genomic profiles. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 3, p. 1278-1284, 2005.

GARINO JR, F.; RIBEIRO, A. R.; SILVA, J. A. B.; RIBEIRO, M. G.; COSTA, E. O. Avaliação da susceptibilidade “in vitro” aos antimicrobianos e pesquisa de produção de β -lactamase de cepas de *E. coli*, isoladas de mastite bovina. **Revista NAPGAMA**. v. 3, n. 2, p. 19-22, 2000.

GENIGEORGIS, C. A. Present state of knowledge on Staphylococcal intoxication. **International Journal of Food Microbiology**. v. 9, n. 4, p. 327-360, 1989.

GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P. Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**. v. 88, p. 3510-3518, 2005.

HENEGARIU, O.; HIRSCHMANN, P.; KILIAN, K.; KIRSCH, S.; LENGAUER, C.; MAIWALD, R.; MIELKE, K.; VOGT, P. Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic steriline men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. **Andrologia**. v. 26, p. 97-106, 1994.

JAURRAD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. L. *egc* a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nurse of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**. v. 166, p. 669-677, 2001.

JORGENSEN, H. J.; MORK, T.; RORVIK, L. M. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on farm with small-scale production of raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**. v. 88, p. 3810-3817, 2005a.

JORGENSEN, H. J.; MORK, T.; HOGASEN, H. R.; RORVIK, L. M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **Journal of Applied Microbiology**. v. 99, p. 158-166, 2005b.

KURODA, M. O.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; CUI, L.; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y.; LIAN, J.; ITO, T.; KANAMORI, M.; MATSUMARU, H.; MARUYAMA, A.; MURAKAMI, H.; HOSOYAMA, A.; MIZUTANI-UI, Y.; TAKAHASHI, N. K.; SAWANO, T.; INOUE, R.; KAITO, C.; SEKIMIZU, K.; HIRAKAWA, H.; KUHARA, S.; GOTO, S.; YABUZAKI, J.; KANEHISA, M.; YAMASHITA, A.; OSHIMA, K.; FURUYA, K.; YOSHINO, C.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; OGASAWARA, N.; HAYASHI, H.; HIRAMATSU, K. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**. v.357, p.1225-1240, 2001.

LANGENEGGER, J.; ESTELITA, M. C.; BAHIA, M. G. Efeito do agente etiológico da mastite subclínica sobre a produção de leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 1, n. 2, p. 47-57, 1981.

LANGENEGGER, J.; FIGUEIREDO, M. P.; FERREIRA, E. R. Eficácia da combinação antibiótica de sulfato de gentamicina + penicilina G procaína no tratamento da mastite bovina. **Hora Veterinária**. v. 30, p. 447, 1986.

LANGONI, H.; PINTO, M. P.; DOMINGUES, P. E.; et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 43, p. 507-515, 1991.

LANGONI, H.; DA SILVA, A. V.; CABRAL, K. G.; DOMINGUES, P. F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 20, p. 204-209, 1998.

LEITE JÚNIOR, A. F. S.; FLORENTINO, E. R.; OLIVEIRA, E. B.; SÁ, S. N.; TORRANO, A. D. M. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande-PB. **Higiene Alimentar**. v. 14, n. 74, p. 53-59, 2000.

LERCHE, M. **Inspección veterinária de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1969. 375p.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 2, p.63-76, 2003.

LONCAREVIC, S.; JORGENSEN, H. J.; LOVSETH, A.; MATHISEN, T.; RORVIK, L. M. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Journal of Applied Microbiology**. v. 98, p. 344-350, 2005.

MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R. Métodos de Diagnóstico. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.), **Microbiologia**. 4 Ed. São Paulo: Atheneu, 2004, p. 117-125.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S. R. (Ed.), **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p.153-161, 2002.

MCDERMOTT, P. F.; ZHAO, S.; WAGNER, D. D.; SIMJEE, S.; WALKER, R. D.; WHITE, D. G.; The food safety perspective of antibiotic resistance. **Animal Biotechnology**. v. 13, p. 71-84, 2002.

MCLAUCHLIN, J.; NARAYANAN, G.L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**. v. 63, p. 479-488, 2000.

MESQUITA, A. J. Enumeração de *Staphylococcus* em leite cru. **Anais das Escolas de Agronomia e Veterinária da UFG**. v. 18, n. 1, p. 5-11, 1988.

MONDAY, S. R.; BOHACH, G. A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, 3411-3414, 1999.

MORAIS, C. M (1995). **Processamento artesanal do queijo de coalho de Pernambuco, uma análise de perigos**. 1995. 91f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1995.

MURRAY, P. R.; DREW, W. L.; KOBAYASHI, G. S.; THOMPSON JR., J.H. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 1992, 513p.

MUSON, S. H.; TREIMANE, M. T.; BETELEY, M. J.; WELCH, R. A. Identification and characterization of *Staphylococcus* enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**. v. 66, p. 3337-3348, 1998.

NÁJERA-SÁNCHEZ, G.; MALDONADO-RODRÍGUEZ, R.; OLVERA, P. R.; GARZA, L. M. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**. v. 66, p. 1055-1062, 2003.

NASSU, R. T.; MOREIRA, C. G.; ROCHA, R. G. A.; FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; MACEDO, A. A. M. Diagnóstico das condições de processamento e qualidade microbiológica de produtos regionais derivados do leite produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 55, p. 121-126, 2000.

MORENO, V. A.; LERAYER, A. L. S.; BARBIERI, M. K.; GRAEL, M. E. T.; SOUZA, F. K. H.; MARTINI, M. Caracterização microbiológica e microscópica de leite e queijos comercializados informalmente no estado de São Paulo. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia dos Alimentos-CBCTA, 2004, Recife, Pernambuco. **XIX CBCTA Ciência e Tecnologia dos Alimentos: estratégias para o desenvolvimento**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos-SBCTA, 2004. 1 CD-ROM.

NOGUEIRA, C. A. M.; MOMESSO, C. A. S.; MACHADO, R. L. D.; DE ALMEIDA, M. T. G.; ROSSIT, A. R. B. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**. v. 6, n. 2, p. 35-38, 2004.

NOUT, M. J. R. Fermented foods and food safety. **Food Research International**. v. 27, n. 7, p. 291-298, 1994.

OLIVEIRA, J. S. **Queijos: Fundamentos tecnológicos**. São Paulo: Ícone, 1986. 146p.

OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, R.A.; SOUZA, M.I. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* frente a amostra de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite subclínica bovina, no agreste meridional de Pernambuco. **A Hora Veterinária**. v. 22, n. 127, p.8-10, 2002.

OMOE, K.; HU, D. L.; OMOE, T. H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. **Infection and Immunity**. v. 71, p. 6088-6094, 2003.

OMOE, K.; HU, D. L.; OMOE, H. T.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**. v.246, p. 191-198, 2005.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D.Y.M; HEATHER, L.D.; et al. Biochemical and Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 360-366, 2001.

ORWIN, P.; LEUNG, D. Y. M.; TRIPP, T. J.; BOHACH, G. A.; EARHART, C. A.; OHLENDORF, D. H.; SCHLIEVERT, P. M. Characterisation of noval staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the Group V subfamily of pyrogenic toxins. **Biochemistry**. v. 41, p. 14033-14040, 2002.

ORWIN, P. M.; FITZGERALD, J. R.; LEUNG, D. Y.; GUTIERREZ, J. A.; BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin L. **Infection and Immunity**. v. 71, n. 5, p. 2916-2919, 2003.

OTERO, F. D.; CRUZ, J. R. S. Mecanismos de defesa de la glândula mamaria bovina em lãs fases de involución y lactación. **Veterinaria México**. v. 23, n. 4, p. 357-365, 1992.

PAIVA, M. S. D.; CARDONHA, A. M. S. Queijo de coalho artesanal e industrializado produzidos no Rio Grande do Norte: estudo comparativo da qualidade microbiológica. **Higiene Alimentar**. v. 13, n. 61, p. 33, 1999.

PERNAMBUCO. Legislação sobre Inspeção e Fiscalização Agropecuária do Estado de Pernambuco. Artigo 681, Capítulo 4. **Diário Oficial [do] Estado de Pernambuco, Poder Executivo**, Recife, 16 de junho 1992. p. 93.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. J.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S.; LIMA, M.. Queijo minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**. v. 15, n. 83, p. 63-70, 2001.

PINHEIRO, E. S.; NASSU, R. T.; ANDRADE, A. A.; MORAIS, R. P. Contribuição ao conhecimento do queijo de coalho comercializado na cidade de Fortaleza, Ceará. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia dos Alimentos-CBCTA, 2004, Recife, Pernambuco. **XIX CBCTA Ciência e Tecnologia dos Alimentos: estratégias para o desenvolvimento**. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos-SBCTA, 2004. 1 CD-ROM.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648pp.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, caprinos e eqüinos**. 9 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002, 1737p.

RAINARD, P. Tackling mastitis in dairy cows. **Nature Biotechnology**. v. 23, n. 4, p. 430-432, 2005.

RAJALA-SCHULTZ, P. J.; SMITH, K. L.; HOGAN, J. S.; LOVE, B. C. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. **Veterinary Microbiology**. v. 102, p. 33-42, 2004.

RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E.; GUIMARÃES, M. P. S. L. M. P.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Perfil antimicrobiano de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas do leite cru de cabra, queijo e manipuladores. **Higiene Alimentar**. v. 17, p. 162, 2003.

REN, K. et al. Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin. **Journal of Experimental Medicine**. v. 180, p. 1675-1683, 1994.

RITTER, R.; SANTOS, D.; BERGMANN, G.P. Análise da qualidade microbiológica de queijo colonial, não pasteurizado, produzido e comercializado por pequenos produtores, no Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**. v. 15, n. 87, p. 51-55, 2001.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**. v. 77, p. 61-70, 2002.

SANTOS, E. C.; GENIGEORGES, C.; FARVER, T. B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufactured Brazilian Minas cheese. **Journal of Food Protection**. v. 44, n. 3, p. 177-184, 1981.

SANTOS, J. A. **Patologia especial dos animais domésticos (mamíferos e aves)**. 2 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p. 154-159.

SANTOS, F. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; CUNHA, G. M. A. Aspectos microbiológicos do queijo tipo “coalho” comercializado em Fortaleza, CE. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**. v. 13, n. 1, p. 31-36, 1995.

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

SCHALM, O. W. CARROLL, C. J.; JAIN, N. C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea e Febiger, 1971. 369p.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experimental and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 130, n. 5, p.199-207, 1957.

SCHOSKE, R.; VALLONE, P. M.; RUITBERG, C. M. BUTTER, J. M. Multiplex PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10Y chromosome short tandem repeat (STR) loci. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 375, p. 333-343, 2003.

SENA, M. J.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SENA, M. C.; SILVA, J. F. M. Characterization of the pathogenic microorganisms in White cheese sold in Recife (PE). In: PROCEEDINGS OF THE PANAMERICAN CONGRESS ON MASTITIS CONTROL AND MILK QUALITY, 1, 1998. Merida, **Proceedings...**Meridas: UNAM, 1998. p. 524-533.

SENA, M. J. (2000). **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE**. 2000. 75p Tese (Doutorado). Escola Veterinária: Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SHAH, P. M.; SCHAFER, V.; KNOTHE, H. Medical and Veterinary use of antimicrobial agents: implications for public health: a clinical view on antimicrobial resistance. **Veterinary Microbiology**. v. 35, p. 269-274, 1993.

SHARMA, N. K.; CATHERINE, E. D. R.; DODD, C. E. R. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, n. 4, p. 1347-1353, 2000.

SHUBER, A. P.; SKOLETSKY, J.; STERN, R.; HANDELIN, B. L. Efficient 12-mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. **Human Molecular Genetics**. v. 2, p. 153-158, 1993.

SOUZA, C. S. Uma guerra quase perdida. **Revista Ciência Hoje**. v. 23, n. 138, p. 27-35, 1998.

STRACHAN, T.; READ, A. P. **Genética Molecular Humana**. 2 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 576p.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, p. 1438-1443, 1995.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Current Perspectives on Detection of Staphylococcal Enterotoxins. **Journal of Food Protection**. v. 60, p. 195-202, 1997.

SUMANO, H.; OCAMPO, L. The pharmacological basis for the treatment of bovine mastitis – a review. **Israel Journal of Veterinary Medicine**. v. 47, p. 127-135, 1992.

TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**. v. 64, n. 5, p. 664-668, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

TURNER, P. C.; MCLENNAN, A. G.; BATES, A. D.; WHITE, M. R. H. **Biologia Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 287p.

UDO, E. E; AL-BUSTAN, M.A; JACOB, L.E; et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potencial cause of food poisoning. **Journal of Medical Microbiology**, 48: 819-823, 1999.

VERAS, J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALI, C.; SILVA, M. C. C.; MARTINS, R. T.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. **Higiene Alimentar**. v. 17, p. 218, 2003.

VIANNI, M. C. E.; NADER FILHO, A.; LANGENEGGER, J. Frequência de isolamento de *Staphylococcus* coagulase –positiva e coagulase negativa na mastite subclínica em bovinos e sua influência na produção Láctea. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**. v. 15, n. 2, p. 187-192, 1992.

VIEIRA-DA-MOTA, O.; FOLLY, M.M.; SAKYIAMA, C.C.H. Detection of different *staphylococcus aureus* strains bovine milk using PCR and routine techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.27-31, 2001.

WIENEKE, A. A.; ROBERTS, D.; GILBERT, R. J. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-1990. **Epidemiology and Infection**. v. 110, n. 3, p. 519-531, 1993.

WILSON, I. G. ; COOPER, J. E.; GILMOUR, A. Some factors inhibiting amplification of the *Staphylococcus aureus* enterotoxin C1 gene (sec) by PCR. **International Journal of Food Microbiology**. v. 22, p. 55-62, 1994.

ZAHA, A.; SCHRANK, A.; LORETO, E. L. S.; FERREIRA, H. B. F.; SCHRANK, I. S.; RODRIGUES, J. J. S.; REGNER, L. P.; PASSAGLIA, L. M. P.; ROSSETTI, M. L. R.; VAINSTEIN, M. H.; SILVA, S. C.; GAIESKY, V. L. S. V. **Biologia Molecular Básica**. 3 Ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. 424p.

ZHANG, S.; IANDOLO, J.J.; STEWART, G.C., 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). **FEMS Microbiology Letters**. v. 168, p. 227-233, 1998.

4-OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar feno e genotipicamente as amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos de coalho e leite de vacas com mastite no Estado de Pernambuco.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a prevalência do *S. aureus* como agente causador de mastite bovina na região Agreste do Estado de Pernambuco;
- Avaliar a qualidade microbiológica dos queijos de coalho comercializados em Pernambuco com relação à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva;
- Isolar e identificar fenotipicamente os *Staphylococcus* spp. a partir de queijos de coalho e leite de vacas com mastite;
- Traçar o perfil de sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de queijos de coalho e de leite de vacas com mastite frente aos antibióticos mais utilizados na clínica médica veterinária e humana;
- Realizar a tipagem molecular das cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina;

- Investigar a presença de genes para as toxinas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI SEJ, TSST-1, ETA e ETB em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos de coalho e leite de vacas com mastite;
- Confirmar a presença dos fragmentos dos genes para as toxinas estafilocócicas que foram detectados em isolados de *Staphylococcus* spp. de queijos de coalho e leite de vacas com mastite.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1: PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASE POSITIVOS ISOLADOS DE LEITE DE VACAS COM MASTITE NO AGRESTE DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Este trabalho foi publicado na revista Arquivos do Instituto Biológico v. 72, n. 2, p. 171-177, abril/junho de 2005.

RESUMO

A mastite, inflamação da glândula mamária, é uma das principais doenças da bovinocultura de leite tendo como principal agente infeccioso bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. que comumente apresentam resistência aos antibióticos utilizados no tratamento da mastite. Desta forma, objetivou-se com este estudo traçar o perfil de sensibilidade antimicrobiana de 59 cepas de estafilococos coagulase positivo, isolados de amostras de leite de vaca com mastite. Os testes de sensibilidade antimicrobiana foram realizados através da técnica de difusão com discos para 13 antibióticos, verificando-se que os mais eficazes foram a vancomicina com 100% de sensibilidade e a norfloxacin com 96%. O menos eficaz foi a penicilina com 20% de sensibilidade. Em alguns municípios estudados as cepas de estafilococos apresentaram resistência múltipla para 6 a 9 antibióticos simultaneamente. Conclui-se que a análise da sensibilidade antimicrobiana *in vitro* deve ser considerada pelos proprietários antes da tomada de decisões para a escolha do tratamento adequado para reduzir perdas na produção de leite e em programas de controle da doença em questão.

PALAVRAS-CHAVES: *Staphylococcus* spp., sensibilidade antimicrobiana, mastite

ABSTRACT

Mastitis, inflammation of the mammary gland, is one of the main diseases of the milk cattle breeding, having, as main infectious agent the *Staphylococcus* spp. bacteria, which commonly presents resistance to the antibiotics used in the treatment of mastitis. For this reason, this study is aimed at drawing the profile of anti-microbial sensibility of 59 stumps of coagulase-positive *staphylococcus*, isolated from samples of cow milk with mastitis. The tests of anti-microbial sensibility were accomplished through a diffusion technique with disks for 13 antibiotics, being verified that the most effective were vancomycin with 100% of sensibility and norfloxacin with 96%. The least effective was penicillin with 20% of sensibility. In some of the studied municipal districts the *staphylococcus* stumps presented multiple resistance to from 6 to 9 antibiotics simultaneously. The conclusion is that the analysis of the anti-microbial sensibility in vitro should be considered by the proprietors before taking decisions about the choice of the appropriate treatment in order to reduce losses in the production of milk and in control programs of the disease in subject.

KEYWORDS: *Staphylococcus* spp., Antimicrobial Susceptibility, Bovine, Mastitis

INTRODUÇÃO

Mastite é a denominação do processo inflamatório da glândula mamária. Sua etiologia pode ser de origem tóxica, traumática, alérgica, metabólica e infecciosa, sendo as causas infecciosas as principais, destacando-se as de origem bacteriana. Os patógenos causadores de mastite têm sido classificados em dois grupos diferentes: contagiosos e ambientais. Os chamados contagiosos necessitam do animal para a sobrevivência, multiplicam-se na glândula mamária, canal do teto ou sobre a pele, são transmitidos de uma vaca infectada ou quarto mamário infectado para uma vaca sadia ou quarto sadio, principalmente durante a ordenha. Os patógenos ambientais são oportunistas, estão presentes no ambiente em que o animal vive e a infecção pode ocorrer no período entre ou durante a ordenha (COSTA, 1998).

Os microrganismos mais comuns em casos de mastite bovina são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli*, *Nocardia* spp. e *Prototheca zopffi* (BRABES et al., 1999).

Dentre os patógenos contagiosos, o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é o mais freqüente nos casos de mastite bovina (ZSCHÖCK et al., 2000). Possui vários fatores de virulência que contribui para sua persistência no tecido mamário e, embora medidas preventivas que visam o controle das mastites sejam amplamente praticadas, as mastites causadas por este patógeno ainda são bastante comuns (PHILPOT, 1984; SANTOS et al., 2003).

O *S. aureus* é mundialmente conhecido como agente causador de várias doenças purulentas tanto em humanos como em animais (BEAN & GRIFFIN, 1990) sendo também, uma das causas mais importantes de intoxicação alimentar (PENNA et al., 1998), devido a

produção de várias enterotoxinas (OMOE *et al.*, 2002). Desta forma, o leite e produtos derivados são importantes veículos de *S. aureus* e comumente estão envolvidos em surtos de intoxicação alimentar (BERGDOLL, 1989).

As infecções intramamárias são freqüentes e importantes em bovinos leiteiros, sendo responsáveis por grandes prejuízos à pecuária leiteira pois ocasionam redução na produção de leite, gastos com medicamentos e assistência veterinária, descarte de leite contaminado após tratamento e descarte precoce de animais doentes (COSTA *et al.*, 1999). Além disso, as mastites adquirem importância para a Saúde Pública pela possibilidade de veiculação de microrganismos, toxinas e resíduos de antimicrobianos no leite (COSTA, 1998).

O *S. aureus* além de ser responsável por grandes prejuízos à pecuária leiteira, apresenta resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento desta doença. Desta forma, é de grande importância o isolamento e identificação desse agente em laboratórios e a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana para um melhor controle através de terapêutica adequada. Segundo BRITO *et al.* (2001), diversos estudos que tratam da susceptibilidade a antimicrobianos de patógenos da mastite bovina no Brasil apontam para um aumento crescente no padrão de resistência, principalmente para *S. aureus*, o agente mais freqüentemente isolado.

Os resíduos de antibióticos no leite podem aparecer devido ao tratamento parenteral e ou intramamário de animais em lactação e representam o principal ponto crítico de controle de contaminação química no leite. Os riscos à saúde do consumidor são apresentados principalmente pelo desencadeamento de fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis, pelos efeitos tóxicos e carcinogênicos, por alterações no equilíbrio da microbiota

intestinal e pela seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores (MANSUR *et al.*, 2003).

Diante do exposto, este trabalho teve como finalidade verificar quais são os microrganismos mais frequentes em casos de mastite bovina e avaliar a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de amostras de *Staphylococcus* coagulase positivo para contribuir com os estudos de etiologia, tratamento e controle desta doença em diferentes municípios da região do Agreste do Estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 246 animais procedentes de onze propriedades de exploração leiteira dos municípios de Angelim (município A), São Bento do Una (município B), Caetés (município C) e Correntes (município D), localizados no Agreste do Estado de Pernambuco.

Nos rebanhos estudados o sistema de criação era semi-intensivo, sendo os animais alimentados à base de concentrado e volumoso e recebendo água procedente de poços e açudes, com produção média diária de 7,5 litros de leite por animal. Os animais eram ordenhados uma ou duas vezes ao dia, pelo sistema de ordenha manual ou mecânica (municípios A e B) ou apenas manual (Município C e D). A raça predominante nos rebanhos leiteiros estudados era holandesa, porém em algumas propriedades observou-se a utilização de animais da raça girolanda, guzerá leiteiro e seus mestiços.

Após prévia lavagem do úbere com água e sabão, secagem com papel toalha e anti-sepsia do óstio da teta com álcool a 70°GL as amostras de leite foram colhidas dos quartos mamários com mastite clínica, positivos ao teste da caneca telada, e daquelas com mastite subclínica, positivos ao *California Mastitis Test* (CMT) (SCHALM & NOORLANDER, 1957).

Colheu-se aproximadamente 5 mL de leite, em frascos com tampa rosqueável, estéreis e previamente identificados com o nome ou número do animal e do quarto mamário, sendo enviadas sob refrigeração ao Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, para serem devidamente processadas.

A lactocultura foi realizada em placas contendo Ágar Base (DIAGNOLAB®), acrescido de 8% (v/v) de sangue ovino desfibrinado e em Ágar Levine (OXOID®). As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 72 horas, sendo analisadas a cada 24 horas.

Observaram-se características de crescimento das colônias em placa, como produção de hemólise, pigmento e características morfo-tintoriais utilizando o método de coloração pela técnica de Gram. Para a identificação de *Staphylococcus aureus* todas as cepas de estafilococos foram submetidas aos testes de produção de coagulase livre (Plasma Coagulase EDTA, Coagu-Plasma LB – Laborclin, Brasil), termonuclease (Tnase – Ágar Azul de Orto-toluidina-DNA) e catalase, segundo SILVA *et al.* (1997). As provas de produção de acetoína, fermentação da glicose (aerobiose) e do manitol (aerobiose e anaerobiose) foram realizadas segundo MAC FADDIN (1980). Sendo os isolados classificados de acordo com BAIRD-PARKER (1990).

A identificação de outras bactérias Gram-positivas foi realizada segundo QUINN *et al.* (1994) e para as enterobactérias foram utilizadas as seguintes provas bioquímicas: produção de urease, reação em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (BIOBRÁS®), teste de VM/VP (VM - reação de Vermelho de Metila; VP - reação de Voges-Proskauer), teste em Ágar SIM (S - produção de H₂S; I - produção de Indol; M - motilidade) (MERCK®) e teste em Ágar Citrato (utilização do carbono do citrato) (MERCK®), sendo identificadas de acordo com CARTER (1988).

Os testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos isolados de *S. aureus* e outros estafilococos coagulase positivos foram realizados utilizando a técnica de difusão em ágar segundo BAUER *et al.* (1966) em Ágar Müller Hinton (MERCK®), utilizando os seguintes discos impregnados de antibióticos: amoxicilina (10 µg), bacitracina (10 U.I.), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), enrofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), lincomicina (2 µg), norfloxacina (10 µg), novobiocina (30 µg), oxacilina (1 µg), penicilina (10 U.I.), sulfá (25 µg) + trimetoprim (5 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg) (CECON® / LABORCLIN®).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 246 animais, totalizando 984 quartos mamários. Destes, 10 (1,0%) apresentaram mastite clínica, 562 (57,1%) mastite subclínica e 412 (41,9%) foram negativos.

Correlacionando o teste do CMT com o exame microbiológico, verificou-se que dos 562 quartos mamários com mastite subclínica, ou seja, reagentes ao CMT, 356 (63,3%) foram positivos ao exame microbiológico e 206 (36,7%) foram negativos. Os resultados positivos no CMT, mas negativos no exame microbiológico, pode indicar um processo inflamatório de etiologia não bacteriana, pois segundo COSTA *et al.* (1996), o CMT é um método auxiliar de boa correlação com o exame microbiológico, porém o processo inflamatório pode não ser de origem infecciosa.

Mesmo apresentando alguns resultados positivos no CMT mas que não indique processo infeccioso, este teste deve ser rotineiramente executado para que medidas no manejo dos animais e na linha de ordenha sejam adotadas para garantir máxima produção e qualidade do leite.

Os microrganismos isolados das 572 amostras de leite de vaca com mastite encontram-se na Tabela 1, verificando-se que os agentes mais prevalentes nos casos de mastite bovina no Agreste do Estado de Pernambuco foram *Staphylococcus* coagulase negativa 36%, *Corynebacterium* spp. 34,8% e *Staphylococcus aureus* 13,6%, corroborando com achados de PITKÄLÄ *et al.* (2004) que observaram que o agente etiológico mais prevalente nos casos de mastite bovina na Finlândia foi *Staphylococcus* coagulase negativa (49,6%) seguido por *Corynebacterium bovis* (34,4%).

Tabela 1 – Microrganismos isolados de leite de vacas com mastite em municípios do Agreste do Estado de Pernambuco, 2005

MICROORGANISMOS	FA	FR
<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa	172	36,0%
<i>Corynebacterium</i> spp.	166	34,8%
<i>Staphylococcus aureus</i>	65	13,6%
<i>Bacillus</i> spp.	25	5,30%
<i>Micrococcus</i> spp.	19	4,00%
<i>Streptococcus</i> spp.	18	3,80%
<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva	7	1,50%
<i>Enterobacter</i> spp.	3	0,60%
<i>Escherichia coli</i>	2	0,40%
TOTAL	477	100,0%

FA – Frequência Absoluta

FR – Frequência Relativa

Segundo GENTILINI *et al.* (2002) atualmente os estafilococos coagulase negativo têm recebido maior importância como agentes causadores de infecções intramamárias em bovinos leiteiros em todo o mundo.

COSTA *et al.* (1995) observaram que o agente etiológico mais prevalente nos casos de mastite bovina em propriedades nos estados de São Paulo e Minas Gerais foi *Staphylococcus* spp. (34,09%), porém BRITO *et al.* (1999) verificaram maior prevalência

para *Corynebacterium* spp. (55,2%) como agente etiológico de mastite bovina em rebanhos localizados na Zona da Mata e Campo das Vertentes do Estado de Minas Gerais.

Na mesma região avaliada neste estudo, ou seja, Agreste do Estado de Pernambuco, PINHEIRO DE SÁ *et al.* (2000) verificaram que os microrganismos mais comuns em casos de mastite bovina foram *Staphylococcus* spp. (32,6%) e *Corynebacterium* spp. (13,2%), porém, entre os estafilococos isolados, a espécie *S.aureus* apresentou maior prevalência (66,4%). No entanto, apesar de se tratar da mesma região os resultados foram divergentes aos obtidos neste estudo, pois os estafilococos coagulase negativa foram mais prevalentes que o *S.aureus*. O gênero *Corynebacterium* spp. apresentou maior percentual de isolamento (34,7%) em relação ao observado por PINHEIRO DE SÁ *et al.* (2000).

O perfil de sensibilidade antimicrobiana de 59 amostras de estafilococos analisadas encontra-se na Tabela 2, das quais 52 amostras eram de *S. aureus* e 07 amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva. Os percentuais gerais de sensibilidade, resistência e sensibilidade intermediária foram de 64,5%, 28,5% e 7,0%, respectivamente. Os antibióticos mais eficazes foram a vancomicina com 100% de eficácia e a norfloxacin com 96% e os menos eficazes penicilina com apenas 20% de sensibilidade e amoxicilina com 25% (Tabela 2).

Resultados semelhantes foram obtidos por BRITO *et al.* (2001) que observaram que a norfloxacin apresentou 100% de eficácia para cepas de estafilococos isoladas de mastite bovina na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. A alta eficácia da vancomicina deve-se, possivelmente, ao pouco uso deste antibiótico em medicina veterinária, pois em nenhuma das propriedades estudadas este medicamento era utilizado.

Tabela 2- Análise geral do perfil de sensibilidade antimicrobiana de 59 cepas de estafilococos coagulase positivas isoladas de amostras de leite de vacas com mastite no Agreste do Estado de Pernambuco, 2005

Antibióticos	Sensível	Intermediário	Resistente
Amoxicilina	25%	0%	75%
Penicilina	20%	0%	80%
Oxacilina	65%	20%	15%
Vancomicina	100%	0%	0%
Gentamicina	42%	7%	51%
Lincomicina	32%	12%	56%
Norfloxacina	96%	2%	2%
Enrofloxacina	88%	3%	9%
Tetraciclina	71%	3%	26%
Novobiocina	71%	14%	15%
Cloranfenicol	83%	10%	7%
Sulfa+Trimetoprim	95%	5%	0%
Bacitracina	48%	15%	37%

Os resultados apresentados revelaram altos índices de resistência tanto para a amoxicilina quanto para a penicilina. A amoxicilina pertence ao mesmo grupo de antibióticos beta-lactâmicos e geralmente os estafilococos mostram elevada resistência (acima de 70%) à penicilina G, bem como, ampicilina, amoxicilina e carbenicilina (TAVARES, 2000). Os estafilococos isolados de leite de vacas com mastite quase sempre apresentam altos índices de resistência à penicilina (ANDRADE *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2000; BYARUGABA *et al.*, 2004). Porém, através de testes de sensibilidade *in vitro*, é possível detectar cepas de estafilococos sensíveis e sugerir a utilização da penicilina no tratamento *in vivo*, ao invés, de um medicamento de última geração. Devendo lembrar que muitas vezes um antibiótico apresenta-se sensível no teste *in vitro*, mas não tem boa eficácia *in vivo*.

Analisando individualmente os resultados de resistência das amostras de estafilococos isoladas de leite de vacas com mastite por município estudado e por antibiótico testado (Figura 1), observou-se que a amoxicilina apresenta baixa eficácia em

todos os municípios, a penicilina poderia ser indicada para tratamento de mastite no município D e a norfloxacinina em todos os municípios exceto o B. A gentamicina foi 100% eficaz apenas para isolados do município C (Figura 1).

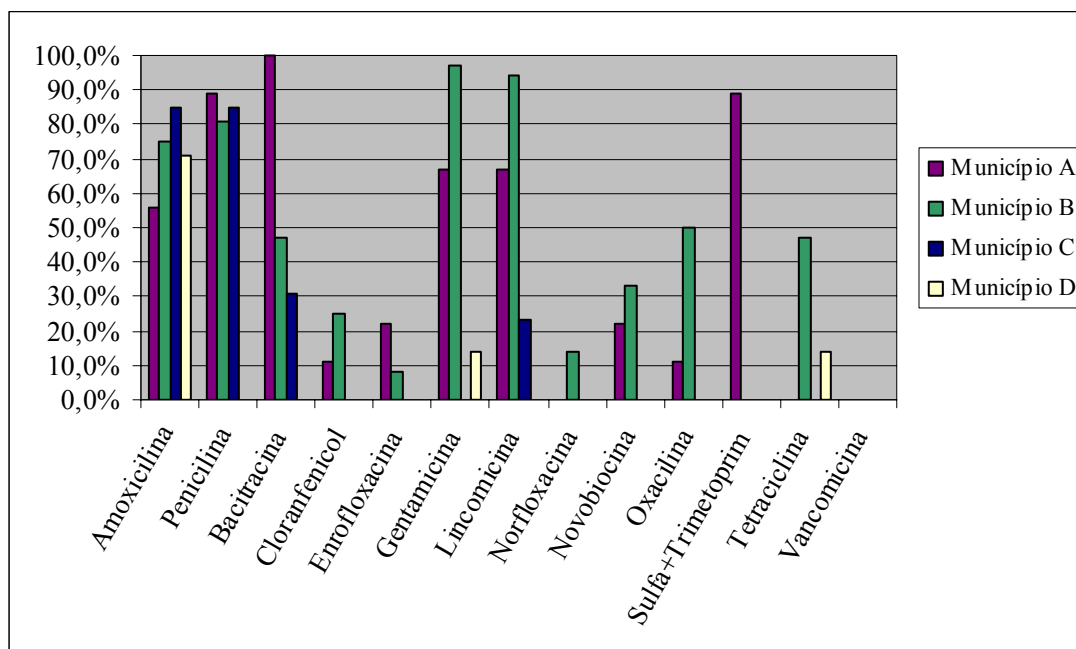


Figura 1- Comparação da resistência antimicrobiana de cepas de estafilococos coagulase positivo por antibióticos e municípios estudados (A, B, C e D) no Agreste do Estado de Pernambuco, 2005

Na Figura 1, observa-se que a gentamicina e a lincomicina apresentaram maior resistência no município B, a sulfá+trimetoprim no A e que a vancomicina foi 100% eficaz em todos os municípios estudados.

Segundo LANGONI *et al.* (2000) a gentamicina continua sendo um antibiótico eficaz para o tratamento das mastites bovinas de origem bacteriana da mesma forma que vários autores verificaram altos índices de sensibilidade de estafilococos isolados de casos de mastite a este antibiótico (COSTA *et al.*, 2000; BRITO *et al.*, 2001; WATANABE *et al.*, 2001; BYARUGABA, 2004). No entanto, no presente estudo verificou-se alto nível de resistência a

este antibiótico, principalmente no Município B, onde este antibiótico era mais freqüentemente utilizado para tratar os animais com mastite.

No Agreste do Estado de Pernambuco, OLIVEIRA *et al.* (2002) observaram que as amostras de estafilococos isoladas de casos de mastite bovina foram 100% sensíveis a gentamicina, não corroborando com os resultados desta atual pesquisa, onde valores elevados de resistência dos estafilococos foram encontrados, principalmente no município onde este era o antibiótico de eleição no tratamento das mastites. Este fato reflete ainda mais a importância dos exames laboratoriais e como o uso indiscriminado de um determinado antibiótico seleciona bactérias resistentes.

A alta resistência para a sulfa+trimetoprim em apenas um dos municípios estudados (Município A, Figura 1) pode estar associada ao uso deste quimioterápico para tratar mastites, uma vez que as sulfas são principalmente utilizadas no tratamento preventivo de septicemias em animais com mastites por coliformes (OLIVEIRA *et al.*, 2000), ou ainda pelo uso de sulfa no tratamento de parasitoses como a coccidiose bovina.

Ao analisar as amostras de estafilococos resistentes, verificou-se que no município A mais de 60% das amostras foram resistentes para 6 a 9 antibióticos simultaneamente. No município B esta multirresistência foi maior para 4 a 5 antibióticos. No C para 2 a 3 e no D todas as amostras apresentaram-se resistentes para 2 a 3 antibióticos (Figura 2).

O alto percentual de multirresistência revelado pelos isolados de *S. aureus* nos municípios estudados é preocupante, pois muitos dos antibióticos disponíveis no mercado não teriam efeito sobre esta bactéria dificultando ou impossibilitando o tratamento dos animais com mastite e trazendo maiores gastos e prejuízos para os proprietários.

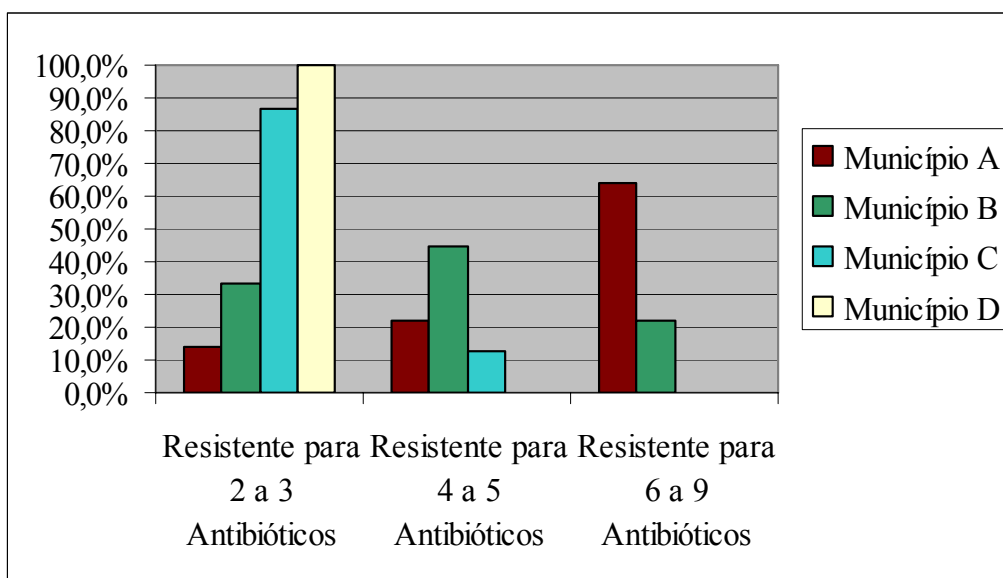


Figura 2 - Perfil de resistência múltipla de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite nos (Município A, B, C e D) do Agreste do Estado de Pernambuco, 2005

Nas propriedades dos municípios A e B de ordenha manual e mecânica verificou-se maiores índices de resistência em relação às propriedades dos municípios C e D onde a ordenha era exclusivamente manual. Outro aspecto interessante é que nas propriedades dos municípios C e D os proprietários dificilmente tratavam os animais com mastite, preferiam retirá-los do plantel. Talvez a pouca utilização de antibióticos tenha contribuído para a baixa resistência apresentada pelos isolados dos municípios C e D.

Devido ao alto custo para a realização da cultura do leite mastítico, isolamento e identificação dos agentes infecciosos e testes de sensibilidade antimicrobiana, muitas propriedades terminam gastando muito mais com antibióticos que já não apresentam eficácia, aumentando o número de bactérias resistentes, além de muitas vezes aumentar a dosagem destes produtos na tentativa de melhorar sua eficiência contribuindo, muitas vezes para riscos como presença de resíduos medicamentosos acima dos limites permitidos no leite consumido pela população.

Os resultados obtidos neste estudo ressaltam a importância da avaliação da sensibilidade antimicrobiana *in vitro* para cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de casos de mastite bovina antes da indicação do tratamento para os animais. Pois, antibióticos como a gentamicina que geralmente apresenta alta eficácia pode apresentar-se ineficaz, principalmente naquelas propriedades onde seu uso é freqüente e inadequado, aumentando os custos da produção. A penicilina, que mesmo sendo um antibiótico de baixa eficácia também pode ser indicado para tratamento, após prévia análise laboratorial, antes da indicação de antibióticos mais recentes, de última geração que devem ser utilizados em último caso para evitar resistência e servir como mais uma ferramenta no controle das mastites. Estes dados também demonstram que muitas vezes por não quererem ter custos a mais realizando testes laboratoriais para propor um adequado tratamento e melhores medidas de controle, os proprietários terminam tendo mais gastos com a utilização de antibióticos ineficazes que não estariam atuando sobre um dos principais agentes responsáveis pela mastite bovina resultando em perda na produção de leite.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos oferecem subsídios aos criadores quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, contribuindo dessa forma para o tratamento e controle das mastites causadas por estafilococos coagulase positivos nos rebanhos estudados. A presença de cepas de estafilococos multirresistentes é preocupante para a clínica veterinária e para a Saúde Pública, pois o leite é fonte de renda para criadores de bovinos e também é um alimento indispensável na dieta de pessoas de várias faixas etárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, M. A.; Dias Filho, F. C.; Mesquita, A. J.; Rocha, P. T. Sensibilidade *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciência Animal Bras.*, v. 1, n. 1, p. 53-57, 2000.

Baird-Parker, A.C. The *Staphylococci*: an introduction. *J. Appl. Bacteriol.*, Supp. v.19, p. 15-85, 1990.

Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

Bean, N. H. & Griffin, P. M. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. *J. Food Protec.*, v. 53, n. 9, p. 804-817, 1990.

Bergdoll, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: *Foodborne Bacterial Pathogens*. New York: Marcell Dekker, 1989, p. 463-523.

Brabes, K. C. S.; Carvalho, E. P.; Dionísio, F. L.; Pereira, M. L.; Garino, F.; Costa, E. O. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *NAPGAMA*, v. 2, n.3, p. 4-11, 1999.

Brito, M. A. V. P.; Brito, J. R. F.; Ribeiro, M. T.; Veiga, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários de vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

Brito, M.A.V.P.; Brito, J.R.F.; Silva, M.A.S.; Carmo, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, n.5, p. 10-17, 2001.

Byarugaba, D. K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, v. 24, p. 105-110, 2004.

Carter, G. R. *Fundamentos da Bacteriologia e Micologia Veterinária*. São Paulo: Roca., 1988. 249p.

Costa, E.O.; Carciofi, A.C.; Melville, P.A.; Prada, M. S.; Schalch, U. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.17, p. 156-159, 1995.

Costa, E. O.; Mielville, P. A.; Ribeiro, A. R.; Viani, F. C.; Mascolli, R.; Liveira, P. J. Mastite bovina: CMT versus microbiológico. *A Hora Vet.*, v. 15, n. 89, p. 53-54, 1996.

Costa, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. *Revista de Educação Continuada do CRMV-SP.*, v. 1, p. 3-9, 1998.

Costa, E. O.; Sá, R.; Ponce, H.; Watanabe, E. T.; Valle, C. R. Avaliação da terapia de mastite clínica: eficácia terapêutica medida em número de dias em tratamento. *NAPGAMA*, v. 2, n. 2, p. 10-14, 1999.

Costa, E. O.; Benitis, N. R.; Guerra, J. L.; Guerra, J. L.; Melville, P. A. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. Isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. *J. Vet. Med B.*, v. 47, p. 99-103, 2000.

Gentilini, E.; Denamiel, G.; Betancor, A. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 1913-1917, 2002.

Langoni, H.; Mendonça, A. O.; Develley, A. Avaliação do uso da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. *NAPGAMA*, n. 1, p. 4-7, 2000.

Mansur, P. U.; Folly, M. M.; Carlos, L. A.; Araújo, F. M.; Gai, Z. T.; Teixeira, G. N. Avaliação do período de persistência do antibiótico cloxacilina no leite de vacas com mastite subclínica. *Rev. Hig. Alim.*, v. 17, n. 104/105, p. 106, 2003.

Mac Faddin, J.F. *Biochemical test for identification of medical bacteria*. 2ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. 527p.

Oliveria, A. P.; Watts, J. L.; Salmont, S. A. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and United States. *J. Dairy Sci.*, v. 88, p. 855-862, 2000.

Oliveira, A. A. F.; Mota, R. A.; Souza, M. I.; Sá, M. E. P. Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana *in vitro* frente a amostras de *Staphylococcus* spp isoladas de mastite subclínica bovina, no Agreste meridional de Pernambuco. *Hora Vet.* v. 22, n. 127, p. 8-10, 2002.

Omoe, K.; Ishikawa, M.; Shimoda, Y. Hu, D.; Ueda, S.; Shinagawa, K. Detection of *seg*, *she*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *Staphylococcus aureus* isolates harborin *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* v.40, n. 3, p.857-862, 2002.

Penna, T.C.V.; Colombo, A.J.; Abe, L.E.; Machoshvili, S.A. Parâmetros de resistência térmica de cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos no leite. *Rev. Farm. Bioq.*, v.24, p.113-117, 1998.

Philpot, W. N. Control of mastitis by hygiene and therapy. *Vet Clin North Am Large Anim Pract.*, v. 6, p. 233-245, 1984.

Pinheiro de Sá, M. E.; Mota, R. A.; Souza, M. I.; Oliveira, A. A. F. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do Estado de Pernambuco. *R. Bras. Ci. Vet.*, v. 7, n. 2, p. 100-1003, 2000.

Pitkälä, A.; Haveri, M.; Pyörälä, S.; Myllys, V.; Honkanen-Buzalski, T. Bovine Mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.*, v. 87, p. 2433-2441, 2004.

Quinn, P. J.; Carter, M.E.; Markey, B.; Carter, G. R. *Clinical Veterinary Microbiology*, London: Wolfe, 1994. 648p.

Santos, F. G. B.; Mota, R. A.; Silveira-Filho, V. M.; Souza, H. M.; Oliveira, M. B. M.; Johner, J. M. Q.; Leal, N. C.; Almeida, A. M. P.; Leal-Balbino, T. C. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. *NAPGAMA*, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.

Schalm, O. W. & Noorlander, D. O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 130, n. 5, p. 199-207, 1957.

Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

Tavares, W. Bactérias gram positivas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

Watanabe, E. T.; Ribeiro, A. R.; Silva, J. B.; Garino Jr., F.; Costa, E. O. A valiação *in vitro* e *in vivo* da eficiência dos antimicrobianos no tratamento de casos de mastite clínica bovina. *NAPGAMA*, v. 4, n. 1, p. 9-14, 2001.

Zschöck, M.; Botzler, D.; Blöcher, S.; Sommerhäuser, J.; Hamann, H. P. Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. *Int. Dairy J.*, v. 10, p. 569-574, 2000.

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ASSOCIADOS A MASTITE BOVINA PROVENIENTES
DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

Este trabalho foi aceito para publicação na Revista Napgama (Anexo 1).

RESUMO

Para melhor compreender a complexidade etiológica do *S. aureus* como agente causador da mastite bovina, foi analisada uma amostra casual aleatória constituída de duas fazendas de exploração leiteira no estado de Pernambuco. Foram coletadas 126 amostras de leite mastítico provenientes de 63 vacas, além de 27 *swabs* de conjuntos de ordenhadeiras, pele do úbere e mãos de ordenhadores. Foram isolados 27 *S. aureus* de amostras de leite de vacas com mastite subclínica e equipamento de ordenha mecânica. Os isolados de *S. aureus* foram caracterizados pela técnica de PCR-RFLP do gene da coagulase em dois perfis genotípicos, provavelmente, em virtude da manutenção constante dos plantéis e predominância de clones específicos de *S. aureus* na região. Foi identificado o mesmo perfil genotípico entre um isolado de *S. aureus* procedente do equipamento de ordenha e de animais com infecção subclínica, sugerindo a ausência dos princípios adequados de limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha mecânica. Todos os isolados submetidos ao teste de sensibilidade antimicrobiana foram resistentes à gentamicina e sensíveis à vancomicina, independente do coagulotipo considerado. Entretanto, foi constatada uma variação quanto à distribuição dos clones nas propriedades em estudo, sugerindo uma possível correlação entre a presença dos diferentes clones, o manejo-higiênico sanitário e o sistema de criação adotado nas propriedades analisadas, mostrando que as técnicas moleculares utilizadas constituem ferramenta útil em investigações epidemiológico das mastites bovinas causadas por *S. aureus*.

Unitermos: Mastite bovina, *S. aureus*, gene da coagulase, PCR-RFLP, sensibilidade *in vitro*, antimicrobianos

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is considered the most frequently occurring major pathogen of cow's mammary gland. In order to find out the etiological complexity of the *S. aureus* as causing agent of the bovine mastitis, a random casual sample of two dairy farms of milk exploration in the state of Pernambuco was analyzed, where 126 mastitic milk bovine had been collected proceeding from 63 cows, beyond 27 swabs sets of milking equipment, udder's skin and dairy workers' hands. Had been isolated 27 *S. aureus* from bovine mastitic milk with subclinical mastitis and equipment of milks mechanics. *S. aureus* isolated strains had been characterized by the technique of PCR-RFLP of the gene of coagulase in two genotype profiles, probably, in virtue of the constant maintenance of the breeding and specific predominance of clones of *S. aureus* in the region. Genotype profile similarity was identified enters an isolated of *S. aureus* originating the equipment of milks and of animals with subclinical infection, suggesting the absence of the adequate principles of cleanliness and disinfection of sets of milking equipment. All the isolated submitted to the test of antimicrobiana sensitivity had been resistant to the gentamicin and sensible to the vancomycin, independent of coagulotype considered. However, a variation was verified around clones distribution in the farms analysed, suggesting a probable relationship among the presence of different clones, the sanitary management and the system of creation adopted, showing that the used molecular techniques constitute a useful tool in inquiries epidemiologist of the bovine mastitis caused by *S. aureus*.

Keywords: bovine mastitis, *S. aureus*, coagulase gene, PCR-RFLP, *in vitro* sensitivity, antimicrobials

INTRODUÇÃO

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária, apresentando-se sob a forma clínica ou subclínica de acordo com a intensidade da inflamação. A forma subclínica é a mais importante devido a maior prevalência nos rebanhos, difícil detecção e longa duração¹⁸.

Staphylococcus aureus destaca-se entre os agentes etiológicos da mastite bovina. As infecções causadas por *S. aureus* respondem pobremente à terapia antimicrobiana, até mesmo as administradas parenteralmente ou por via intramamária, pois este microrganismo invade o tecido glandular onde pode e determina a formação de abscessos, a parede do tecido conjuntivo formado dificulta o acesso dos agentes antimicrobianos no foco da infecção, até mesmo quando estes atingem o órgão em concentrações terapêuticas²⁴.

As estratégias de controle das mastites baseiam-se em medidas preventivas, tratamento imediato dos casos clínicos e tratamento no período seco de casos subclínicos, sendo o portador um elemento que não é considerado⁶. Contudo, estratégias de controle da mastite têm apresentado sucesso relativamente limitado. O conhecimento da cadeia epidemiológica de qualquer enfermidade é passo fundamental para que sejam aplicadas medidas ideais de profilaxia e controle de uma doença². Técnicas moleculares têm sido utilizadas na identificação e comparação de cepas de *S. aureus* em estudos epidemiológicos^{20,26}.

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é utilizada para estabelecer a relação clonal em estudos epidemiológico-moleculares e permite subdividir as cepas de *S. aureus* baseando-se no polimorfismo do gene da coagulase (*coa*). A região 3'-terminal do gene *coa* contém uma sequência de pequenas repetições em tandem de 81 pb que permitem, pela análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP),

diferenciar isolados de *S. aureus* pelo número das seqüências repetidas e pela localização de sítios de restrição⁹.

O conhecimento do perfil molecular dos clones de *S. aureus* possibilita estudos epidemiológicos para compreensão do padrão de dispersão deste patógeno em propriedades rurais, oferecendo subsídios para elaboração de estratégias de profilaxia e controle das mastites estafilocócicas no rebanho²³. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo realizar estudo epidemiológico-molecular de *S. aureus* associados à mastite bovina em propriedades de exploração leiteira localizadas no município de São Bento do Una (Pernambuco), a fim de oferecer subsídios para elaboração de protocolos para profilaxia e controle desta afecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi analisada uma amostra casual aleatória constituída de duas fazendas de exploração leiteira localizadas no município de São Bento do Una, no Agreste de Pernambuco, uma propriedade de ordenha manual (Propriedade A) e outra propriedade de ordenha mecânica (Propriedade B). Os animais e equipamentos de ordenha também foram selecionados aleatoriamente. As amostras de leite foram colhidas por ocasião da ordenha matinal, realizando-se a lavagem do úbere com água e sabão, seguida de secagem com toalha de papel descartável. Foi realizado como provas de triagem o exame de Tamis (caneca telada) para diagnóstico de mastite clínica e o CMT (*California Mastitis Test*), para diagnóstico da mastite subclínica, segundo Schalm; Noorlander²¹.

Foram coletadas 126 amostras de secreção láctea provenientes de 63 vacas cujos quartos mamários foram diagnosticados com mastite clínica ou subclínica (2+ e 3+) nos

testes de triagem, no volume de 5 mL, em frascos estéreis antecedido pela anti-sepsia do óstio do teto com álcool 70°GL. Foram coletados 27 *swabs* dos conjuntos de ordenhadeiras mecânicas, pele do úbere e mãos de ordenhadores nos intervalos entre as ordenhas e acondicionados em tubos de ensaio estéreis contendo 2 mL de solução salina 0,85% (m/v). Todo o material biológico foi transportado sob refrigeração em caixas isotérmicas para análise microbiológica.

As lactoculturas foram realizadas em placas de ágar sangue acrescido 8% (v/v) de sangue ovino desfibrinado e os *swabs* cultivados em meios seletivos ágar Levine e *Mannitol Salt Agar*, incubados a 37°C e analisados por 24 e 48 horas. Foram observadas as características das colônias em placa, produção de hemólise e caracteres morfo-tintoriais utilizando a coloração de Gram. A caracterização microbiológica de *S. aureus* foi realizada pelas provas da produção de coagulase livre (Coagulo-Plasma LB-Larboclin-Brasil), termonuclease, catalase, DNase, manitol em aerobiose e fermentação dos açúcares glicose e manitol. Os testes de sensibilidade *in vitro* dos isolados de *S. aureus* foram realizados em ágar Müeller Hinton utilizando discos impregnados com antibióticos utilizados rotineiramente na medicina humana e veterinária. O crescimento das zonas de inibição foram avaliados após 24 horas de incubação a 37°C de acordo com os padrões do *National Committee for Clinical Laboratory Standards*²⁵.

O DNA genômico dos isolados de *S. aureus* foi extraído segundo o método de Maniatis *et al.*¹⁴. A amplificação do gene *coa* foi realizada utilizando os seguintes *primers* específicos: COAG2 (5' ACC ACA AGG TAC TGA ATC AAC G 3') e COAG3 (5' TGC TTT CGA TTG TTC GAT GC 3')¹. As reações de amplificação foram preparadas contendo 20 ng do DNA genômico, tampão PCR 10x (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 50 mM de

KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 1 uM de cada *primer*, 200 uM de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP's) e 1 U de *Taq* Polimerase (Invitrogen, Brasil), completando-se com água deionizada estéril para um volume final de 50 uL. Nesse experimento foi utilizado como controle positivo a cepa de *S. aureus* ATCC nº 25923. As amostras foram submetidas a 40 ciclos térmicos, cada um consistindo de 30 segundos a 95°C, 2 minutos a 62°C e 4 minutos a 72°C. Os produtos de PCR (amplicons) foram digeridos com as enzimas de restrição *AluI* (BioLabs, New England) e *HaeIII* (Invitrogen, Brasil), após purificação com o QIAquick PCR *Purification Kit* (Qiagen). Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo (15 mg/mL), visualizados e fotografados em transiluminador de UV. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pb DNA *ladder* para estimar o tamanho dos amplicons e dos fragmentos de restrição.

RESULTADOS

Nos 252 quartos mamários analisados, pertencentes a 63 fêmeas bovinas em diferentes estágios de lactação, 126 apresentavam mastite, sendo que 97,62% (123/126) foram diagnosticadas como mastite subclínica, positivas (3+) ao CMT, enquanto que 2,38% (3/126) foram diagnosticadas como mastite clínica positiva ao teste de Tamis. Entre as amostras analisadas positivas para mastite, em 108 agentes infecciosos foram isolados, 64 do gênero *Staphylococcus* (48,85%), dos quais 26 (40,62%) foram *S. aureus* provenientes exclusivamente de mastite subclínica. A partir da cultura dos 27 *swabs* coletados, uma amostra de *S. aureus* foi obtida dos equipamentos de ordenha. Todos os 27 isolados de *S. aureus* apresentaram b-hemólise em ágar sangue e foram positivos a todos os testes bioquímicos.

Todos os isolados caracterizados pelos métodos microbiológicos citados como *S. aureus* amplificaram o gene *coa* na reação de PCR. A amplificação por PCR do gene *coa* dos *S. aureus* isolados de vacas com mastite subclínica e de equipamento de ordenha produziu dois perfis genotípicos. Dessa forma, os isolados foram distribuídos em dois coagulotipos, de acordo com o tamanho do segmento amplificado (P1=750 pb e P2=1000 pb) (Figura 1). A cepa utilizada como controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923) amplificou um fragmento de 800 pb (Figura 1, linha 1).

A maioria dos isolados (85,18%) amplificou um fragmento de 1000 pb (P2). Este perfil foi encontrado nas duas propriedades analisadas (Figura 1). O perfil P1 foi observado em apenas quatro isolados (14,82%) (Figura 1, linhas: 2, 3, 5 e 6). As cinco amostras da propriedade A apresentaram dois perfis diferentes (coagulotipos), com predominância do fragmento de 750 pb (P1) presente em 80% dos isolados (Figura 1, linhas: 2, 3, 5 e 6). O segundo coagulotipo (P2) foi encontrado em apenas 20% dos isolados (Figura 1, linha 4). Todos os 22 isolados da propriedade B (Figura 1, linhas: 7 a 27), inclusive o procedente do equipamento de ordenha (Figura 1, linha 28) apresentaram o mesmo perfil de amplificação (P2=1000 pb).

A digestão dos amplicons com as enzimas de restrição (ER) confirmou a presença de dois clones na propriedade A e a presença de um clone na propriedade B (Figura 2; Tabela 1). As amostras de 750 pb não foram digeridas com a ER *AluI* (Figura 2, linhas: 2, 3, 5, e 6), e por isso foram também submetidas a digestão com a ER *HaeIII* que confirmou a homogeneidade genotípica destas amostras (Figura 3, linhas: 2Hae, 3Hae, 5Hae e 6Hae). O tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) estão descritos na Tabela 1.

O teste de sensibilidade antimicrobiano in vitro dos 2 isolados de *S. aureus* demonstraram alto índice de resistência frente aos antimicrobianos: gentamicina (100%), lincomicina (96,29%), penicilina G (85,18%) e amoxicilina (74,07%). Por outro lado, foram observados altos índices de sensibilidade das amostras frente aos antimicrobianos: norfloxacin (77,78%), enrofloxacin (85,18%), sulfa+trimetoprim (96,29%) e vancomicina (100%) (Figura 4A). Adicionalmente foi observado perfil de multirresistência entre os isolados de *S. aureus* de São Bento do Una predominando 6-7 antibióticos simultaneamente (Figura 4B).

DISCUSSÃO

A produção leiteira em Pernambuco constitui-se numa das principais atividades econômicas, concentrando-se principalmente na Região do Agreste Pernambucano, que é responsável por mais da metade da produção estadual. O leite e seus derivados produzidos nesta região abastecem as cidades locais e a Região Metropolitana do Recife, atingindo grande contingente populacional¹¹. Apesar do Estado de Pernambuco ter capacidade potencial para a produção de leite, seu rebanho produtor não é alvo de medidas de controle das mastites.

A mastite bovina é considerada uma enfermidade de alta prevalência e de grande importância na pecuária leiteira, sendo discutida desde o século passado, devido aos prejuízos causados pela redução na produção de leite, ao leite descartado, ao custo de reposição de animais, à mão-de-obra extra, ao tratamento e serviços veterinários⁷.

As infecções causadas por *S. aureus* geralmente resultam em mastites subclínicas que podem progredir para manifestações clínicas e, embora medidas preventivas visando o

controle da transmissão sejam amplamente praticadas, as mastites causadas por esse patógeno ainda são bastante comuns³.

Staphylococcus spp são os microrganismos mais freqüentemente isolados em amostras de leite provenientes de animais com mastite, sendo o *S. aureus* a espécie de maior importância econômica para a indústria leiteira e para a saúde pública.

No presente trabalho foi diagnosticada mastite subclínica em 48,8% dos quartos mamários e *S. aureus* foi isolado em 24% das amostras de leite de vacas com mastite subclínica. Santos *et al.*²⁰ obtiveram resultados similares estudando amostras de leite da região da Zona da Mata de Pernambuco, onde foi diagnosticada mastite subclínica em 52,2% dos quartos mamários e *S. aureus* foi isolado em 20,74% das amostras de leite de vacas com mastite subclínica.

A resistência bacteriana aos antibióticos é outro sério problema para a Saúde Pública, pois há evidências que o tratamento indiscriminado de animais com antibióticos torne seus produtos e derivados, fontes para resistência aos antibióticos na espécie humana¹⁷. Além disso, resíduos de antibióticos causam diminuição no rendimento industrial na fabricação de derivados lácteos, uma vez que inibem a ação de bactérias fermentadoras⁴.

No Brasil, desde a década de 80, a gentamicina é largamente utilizada no tratamento de mastite bovina causada por bactérias Gram-positivas⁵. Ainda hoje, observam-se inúmeros resultados positivos no emprego deste antibiótico para tratamento das mastites estafilocócicas em ruminantes¹⁷. Entretanto, por se tratar do antibiótico de eleição na atualidade, o uso contínuo e indiscriminado deste aminoglicosídeo, justifica a alta resistência dos isolados de *S. aureus* à gentamicina nas propriedades estudadas. Por outro lado, destacou-se a vancomicina com 100% de eficácia no teste de sensibilidade *in vitro*.

Esta alta sensibilidade a vancomicina se explica devido ao raríssimo uso na medicina veterinária, desta forma, como descrito por Howe *et al.*¹⁰, torna-se o antimicrobiano de eleição em casos de infecções por cepas de *S. aureus* multirresistentes.

Cerca de 63% dos isolados estudados apresentaram resistência á oxacilina (metecilina), no entanto, estudos mais detalhados do perfil de resistência dessas cepas, seriam necessários para classificá-las em *S. aureus* metecilina resistentes (MRSA). A presença dos genes *mec* e *femB* envolvidos na resistência á metecilina foram pesquisados pela PCR em cepas de *S. aureus* resistentes a metecilina pelo teste de sensibilidade “in vitro”. A resistência desses isolados foi atribuída a hiperprodução da beta-lactamase e presença do gene *femB* (resultados apresentados em outro trabalho). Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos são complexos e envolvem mudanças no conteúdo e composição da parede celular bacteriana.

A caracterização da diversidade genética dos *S. aureus* isolados de rebanhos leiteiros é fundamental para uma melhor compreensão do padrão de dispersão desse patógeno nas propriedades rurais. Tais informações poderão auxiliar na elaboração de estratégias mais eficientes para a redução da infecção, uma vez que a partir dos perfis moleculares podem-se inferir relações genéticas existentes entre os diferentes clones, detectar o fluxo gênico e traçar rotas de dispersão da infecção no rebanho¹².

Estudos epidemiológico-moleculares sobre *S. aureus* de origem bovina foram conduzidos na Europa^{23,26}, América do Norte⁸, Ásia¹⁶ e Oceania¹⁹. Nos últimos anos alguns grupos implementaram a análise molecular do gene da coagulase como um teste de exatidão para o diagnóstico e genotipagem de *S. aureus*^{15,19,22}. Segundo Goh *et al.*⁹, a presença de formas alélicas múltiplas é mostrada pelas variações no tamanho dos fragmentos amplificados, baseados na inclusão ou exclusão das seqüências repetidas de 81

pb que compõem o gene *coa*. A análise do gene *coa* pela técnica do PCR-RFLP em isolados de *S. aureus* procedentes do Rio Grande do Sul, Austrália e República Tcheca permitiu maior diferenciação dos genótipos^{13,19,22}, uma vez que essa técnica apresenta maior poder discriminatório devido à digestão dos fragmentos de PCR por enzimas de restrição⁹.

A genotipagem por PCR-RFLP do gene *coa* dos 27 isolados de *S. aureus* demonstrou a importância do estudo epidemiológico molecular através da compreensão do padrão de dispersão do *S. aureus* nas propriedades estudadas a partir da inferência do perfil genético destes patógenos. Neste estudo foi observada a presença de dois perfis genotípicos obtidos a partir dos 27 isolados de *S. aureus* analisados, provenientes de casos de mastite subclínica e dos equipamentos de ordenha, tendo sido determinado a presença de dois clones numa mesma propriedade, um mesmo clone nas duas propriedades e um mesmo clone procedente do equipamento de ordenha.

As linhas de ordenha são locais de intenso manejo que podem servir como via de transmissão entre o patógeno e a glândula mamária, especialmente. A identificação do mesmo perfil genotípico entre um isolado de *S. aureus* procedente do equipamento de ordenha e dos animais com infecção subclínica na propriedade B sugere a ausência dos princípios adequados de limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha mecânica.

Independente do coagulotipo encontrado entre os isolados de *S. aureus* das propriedades estudadas todos apresentaram resistência à gentamicina e sensibilidade à vancomicina. Adicionalmente, 69,23% dos isolados coagulotipo P1 mostraram-se sensíveis aos antimicrobianos utilizados nos testes de sensibilidade *in vitro* e 49,78% dos isolados coagulotipo P2 foram sensíveis aos antimicrobianos. O índice de susceptibilidade à

penicilina G e amoxilina nas amostras de *S. aureus* coagulotipo P1 foi de 75% e 100%, respectivamente, enquanto que nos coagulotipos P2 foi de apenas 4,3% e 13%.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem a existência de relação entre a presença dos diferentes clones, o manejo-higiênico sanitário e o sistema de criação adotado nas propriedades analisadas. A presença de dois perfis genotípicos na propriedade A indica para casos alóctones de mastite por aquisição de vacas leiteiras infectadas provenientes de outras localidades. Por outro lado, a presença de um perfil genotípico na propriedade B, poderia ser devido aos casos de mastite autóctone, causada por apenas um clone. Além disso, a observação de um perfil genotípico idêntico nas duas propriedades (P2=1000pb) estudadas sugere a presença de um mesmo clone de *S. aureus* nesta região do estado de Pernambuco.

CONCLUSÕES

Métodos genotípicos possibilitam a detecção das principais fontes e reservatórios de *S. aureus* envolvidos na mastite bovina e na elaboração de estratégias de profilaxia em propriedades de exploração leiteira. A implementação dessas estratégias, aliada à educação higiênico-sanitária de todos os indivíduos envolvidos na cadeia produtiva, resultará no aumento da produção, melhoria da qualidade microbiológica do leite e redução do ônus gerado pelo descarte precoce de animais cronicamente infectados, por antibioticoterapia inadequada e honorários médico-veterinários. A técnica de PCR-RFLP mostrou-se reprodutível, específica e discriminatória para estudo do polimorfismo do gene *coa* de *S. aureus*, representando ferramenta promissora para estudos epidemiológicos-moleculares em propriedades com mastite causada por este patógeno.

Tabela 1: Resultados do PCR-RFLP do gene *coa* de isolados de *S. aureus* associados à mastite bovina em duas propriedades leiteiras do município de São Bento do Una, Pernambuco, Brasil

Coagulotipo	Nº de isolados	Propriedade	Produto de PCRa	Fragmentos de RFLP – <i>AluI</i> a	Fragmentos de RFLP – <i>HaeIII</i> a
Perfil 1	4	A	750	750	150 – 600
Perfil 2	23	A e B	1000	200 – 310 – 450 – 550	<i>b</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1	-	800	250 – 310 – 510	<i>b</i>

(a) – número aproximado em pb

(b) – não foi submetida à clivagem

Figura 1: Produtos de PCR do gene *coa* de *S. aureus* isolados do município de São Bento do Una, Pernambuco, Brasil. Marcador de peso molecular, linha **M** (100 pb DNA *ladder*). Controle positivo, linha **1** (*S. aureus* ATCC 25923). Propriedade A, linhas **2** a **6**. Propriedade B, linhas **7** a **28**.

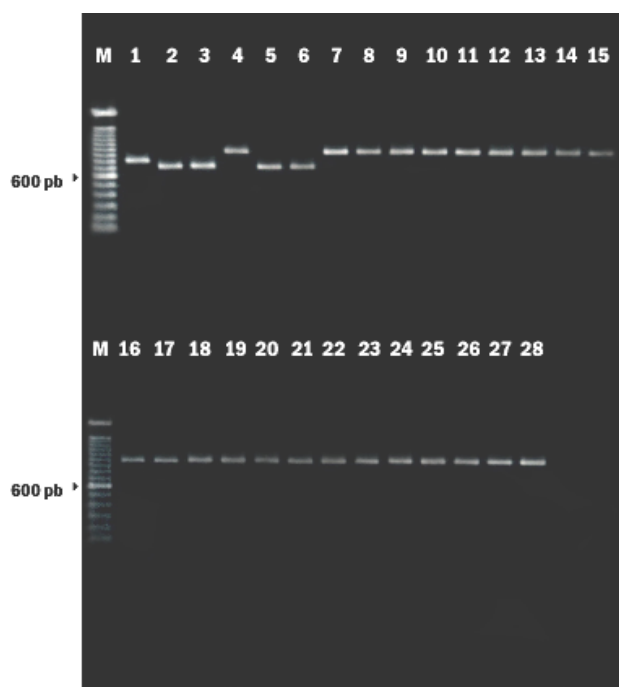


Figura 2: Produtos de PCR do gene *coa* digeridos com *AluI* de *S. aureus* isolados do município de São Bento do Una, Pernambuco, Brasil. Marcador de peso molecular, linha **M** (100 pb DNA *ladder*). Controle positivo, linha **1** (*S. aureus* ATCC 25923). Propriedade A, linhas **2 a 6**. Propriedade B, linhas **7 a 28**.

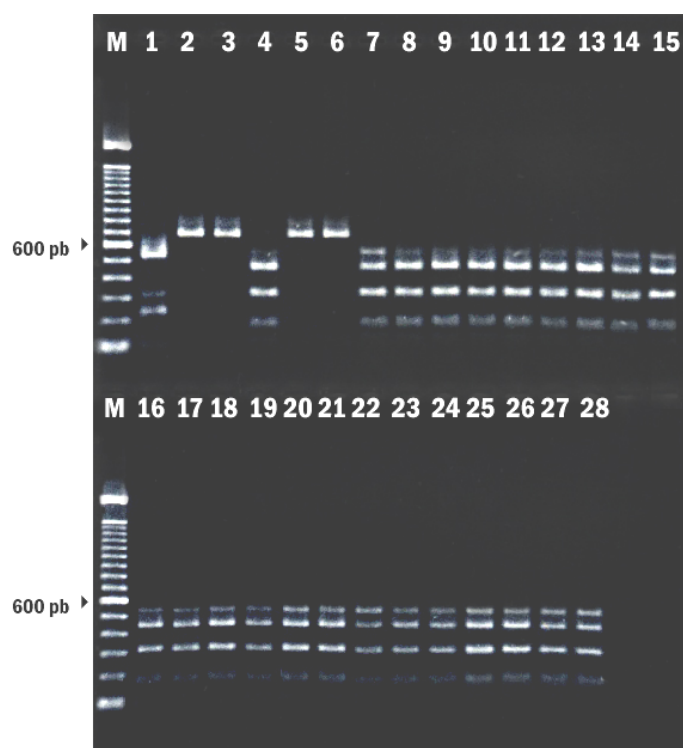


Figura 3: Produtos de PCR do gene *coa* de 750pb digeridos com *AluI* e *HaeIII* de isolados de *S. aureus* do município de São Bento do Una, Pernambuco, Brasil. Marcador de peso molecular, linha **M** (100 pb DNA ladder). Linhas **2** (PCR); **2Alu** (RFLP *AluI*); **2Hae** (RFLP *HaeIII*); **3** (PCR); **3Alu** (RFLP *AluI*); **3Hae** (RFLP *HaeIII*); **5** (PCR); **5Alu** (RFLP *AluI*); **5Hae** (RFLP *HaeIII*); **6** (PCR); **6Alu** (RFLP *AluI*); **6Hae** (RFLP *HaeIII*).

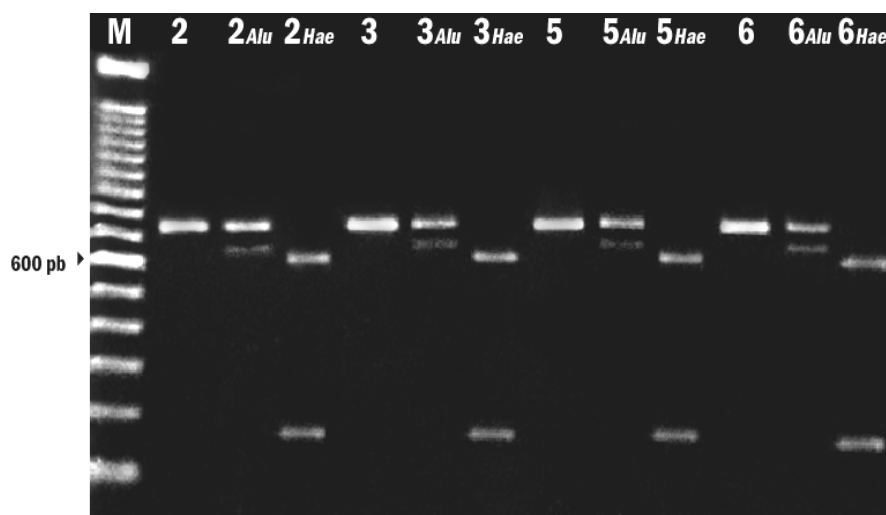
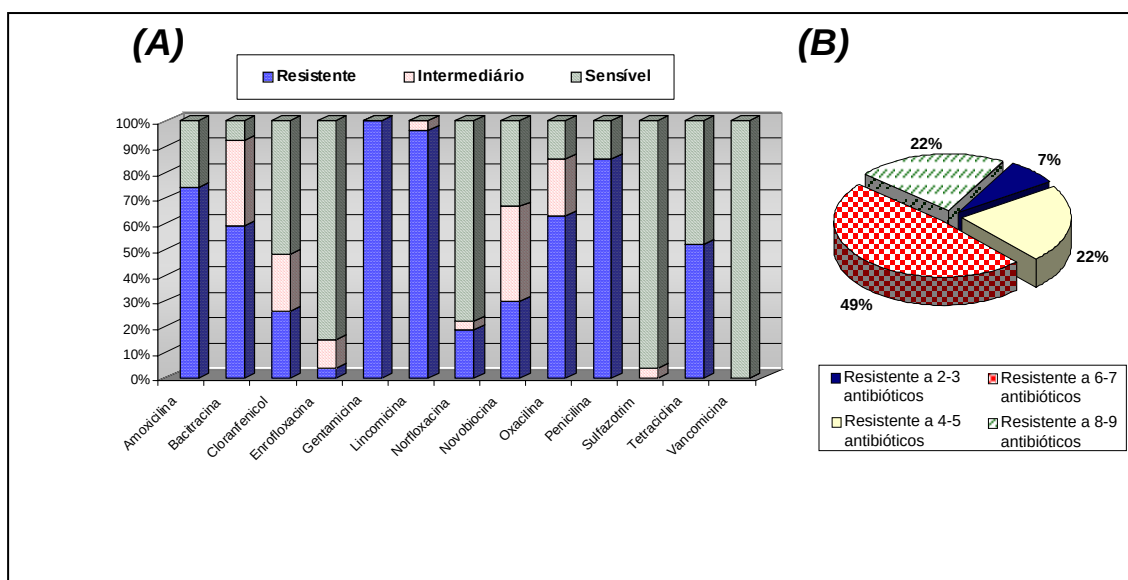


Figura 4: Teste de sensibilidade *in vitro* (A) e Perfil de multirresistência *in vitro* (B) de 27 isolados de *S. aureus* associados à mastite subclínica no município de São Bento do Una (PE).



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AARESTRUP, F.M.; DANGLER, C.A.; SORDILLO, L.M. Prevalence of coagulase gene polymorphism in *Staphylococcus aureus* isolates causing bovine mastitis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 2, n. 59, p. 124-128, 1995.
2. AMARAL, L.A. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3., 1999, Botucatu. **Anais**. FMVZ-UNESP, 1999, p. 19-26.
3. BRADLEY, A.J. Bovine mastitis: an evolving disease. **Veterinary Journal**, v. 164, p.116-128, 2002.
4. BYARUGABA, D.K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 105-110, 2004.
5. COSTA, E.O.; CARVALHO, V.M.; COUTINHO, S.D.; CASTILHO, W.; CARAMORI, L.F.L. *Corynebacterium bovis* e sua importância na etiologia da mastite bovina no estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 5, p. 117-120, 1985.
6. COSTA, E.O.; VIANI, F.C.; WHITE, C.R.; ABE, S.; LOPES, V.C.A. Importância do portador na dinâmica da infecção intramamária. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., 1994, Olinda. **Anais**. SBMV, 1994, p. 239.

7. COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; SILVA, J.A.B.; GARINO-JUNIOR, F.; BENITES, N.R.; HORIUTI, A.M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **NAPGAMA**, n. 2, p. 16-20, 1999.
8. FITZGERALD, J.R.; MEANEY, W.J.; HARTIGAN, P.J.; SMYTH, C.J.; KAPUR V. Fine structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Epidemiol. Infect.**, v. 119, p. 261-269, 1997.
9. GOH, S.W.; BYRNE, S.K.; ZHANG, J.L.; CHOW, A.W. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1642-1645, 1992.
10. HOWE, R.A. Vancomycin susceptibility within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. **Emerging Infectious Diseases**, n. 5, v. 10, p. 855-857, 2004.
11. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004) [on line] Disponível na Internet via WWW. URL: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: dezembro de 2004.
12. KAPUR, V.; SISCHO, W.M.; GREER, R.S.; WITTAM, T.S.; MUSSER, J.M. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 33, p. 376-380, 1995.
13. LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, n. 67, p. 127-141, 1999.
14. MANIATIS, T.; FRISCH, E.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

15. MONTESINOS, I.; SALIDO, E.; DELGADO, T.; CUERVO, M.; SIERRA A. Epidemiologic genotyping of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 6, v. 40, p. 2119-2125, 2002.
16. NAGASE, N.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; YAMASHITA, K.; YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M.; KOJIMA, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, p. 1169-1172, 2002.
17. OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, R.A.; SOUZA, M.I.; SÁ, M.E.P. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* frente a amostra de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite subclínica bovina, no agreste meridional de Pernambuco. **A Hora Veterinária**, n. 127, p. 8-10, 2002.
18. PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S.C. Mastitis: counter attack. In: _____. **Experiment station**. Babson Bros. Co., 1991, p. 3-7.
19. RAIMUNDO, O.; DEIGTON, M.; CAPSTICK, J.; GERRATY, N. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. **Veterinary Microbiology**, n. 66, p. 275-284, 1999.
20. SANTOS, F.G.B.; MOTA, R.A.; SILVEIRA-FILHO, V.M.; SOUZA, H.M.; OLIVEIRA, M.B.M.; JOHNER, J.M.Q.; LEAL N.C.; ALMEIDA, A.M.P.; LEAL-BALBINO, T.C. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **NAPGAMA**, n. 1, v. 6, p. 19-23, 2003.

21. SCHALM, O.W.; NOORLANDER, B.S. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n. 5, v. 130, p. 199-207, 1957.
22. SCHLEGELOVÁ, J.; DENDIS, M.; BENEDÍK, J.; BABÁK, V.; RYSÁNEK, D. *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cows and humans on a farm differ in coagulase genotype. **Veterinary Microbiology**, n. 92, p. 327-334, 2003.
23. SOMMERÄUSER, J.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M.; SOBIRAJ, A.; FAILING, K. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p. 91-102, 2003.
24. SUTRA, L.; POUTREL, B. Detection of capsular polysaccharide in milk of cows with natural intramammary infection caused by *Staphylococcus aureus*. **American Journal of Veterinary Research**, n. 11, v. 51, p. 1857-1859, 1990.
25. WOODS, G.L.; WASHINGTON, J.A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P.R.; BARIN, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 6. ed., Washington: ASM, 1995. p. 1327-1341.
26. ZADOKS, R.N.; VAN LEEUWEN, W.B.; KREFT D.; FOX, L.K.; BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; VAN BELKUM, A. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment and bovine milk by phage typing, pulse-field gel electrophoresis and binary typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 40, p. 3894-3902, 2002.

5.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3: INVESTIGAÇÃO DOS GENES PARA AS TOXINAS ESTAFILOCÓCICAS EM ISOLADOS DE LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA NA REGIÃO AGRESTE DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

Este trabalho será enviado para publicação na Revista Veterinary Microbiology (Anexo 2).

RESUMO

Para investigar a presença e distribuição dos genes para as toxinas estafilocócicas SEA, -SEE, SEG-SEJ, TSST-1, ETA e ETB foram analisadas 81 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite de 246 vacas de 11 propriedades leiteiras de quatro municípios (Angelim, São Bento do Una, Caetés e Correntes), localizados na região do Agreste do Estado de Pernambuco-Brasil, sendo utilizadas duas reações de PCR-Multiplex e quatro reações de PCR-Uniplex. Nenhuma das cepas apresentou os genes *sea-see*, *tst*, *eta* e *etb* que são responsáveis pelas toxinas clássicas, no entanto, para as novas toxinas SEG-SEJ verificou-se que 65/81 (80,2%) das cepas comportavam um a três genes toxigênicos. Os genótipos encontrados entre os isolados de estafilococos de casos de mastite subclínica foram *seg*, *seh*, *sei*, isoladamente, ou associações, *seg* + *sei*, *seg* + *sej*, *seg* + *seh*, *seh* + *sei*, *sei* + *sej*, *seg* + *seh* + *sei*, *seg* + *sei* + *sej*. No município de Angelim só foi encontrado o gene *sei*, no município de São Bento do Una os genes *seg* e *sej*, no município de Caetés os genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* e no município de Correntes os genes *seh* e *sei*. O gene *seh*, que raramente é observado em outras regiões do Brasil e também no mundo, foi verificado isoladamente ou em associação com outro gene *se*, apenas nos municípios de Caetés e Correntes. Os resultados obtidos sugerem a existência de uma distribuição geográfica das cepas de estafilococos portadoras de genes *se*. A presença dessas cepas em leite de vacas com mastite subclínica é preocupante pois podem causar intoxicações alimentares.

Palavras-Chave: Toxinas Estafilocócicas; PCR-Multiplex; PCR-Uniplex

1- Introdução

Staphylococcus aureus é responsável por várias enfermidades no homem e nos animais. Nos bovinos é conhecido como o mais freqüente agente causador de mastite (Cardoso et al., 1999), processo inflamatório da glândula mamária, apresentando-se sob a forma clínica ou subclínica de acordo com a intensidade da inflamação, sendo a forma subclínica a mais importante devido a maior prevalência nos rebanhos, difícil detecção e longa duração (Bradley et al., 2002).

A habilidade do *S.aureus* em causar uma ampla variedade de doenças pode estar associada a um grande número de toxinas extracelulares, além de outros fatores de virulência (Zschöck et al., 2005). Dentre estas toxinas destacam-se as enterotoxinas, a toxina 1 da síndrome do choque tóxico e as toxinas esfoliativas (Dinges et al., 2000).

As enterotoxinas são exoproteínas estáveis a altas temperaturas e que induzem gastroenterite em humanos após ingestão de alimentos contaminados (Klotz et al., 2003). A intoxicação estafilocócica é caracterizada por náuseas, dores abdominais, vômito e diarreia (Balaban e Rasooly, 2000; Scherrer et al., 2004).

Além dos cinco tipos antigênicos de enterotoxinas estafilocócicas clássicas (SEs) (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) (Dinges et al., 2000), quatro SEs adicionais (SEG, SEH, SEI e SEJ) foram descritas e os genes correspondentes identificados (Ren et al., 1994; Muson et al., 1998; Zhang et al., 1998). Recentemente, a listagem da família de enterotoxinas estafilocócicas se expandiu através da detecção dos genes que codificam as enterotoxinas SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU (Jaurrad et al., 2001; Kuroda et al., 2001; Orwin et al., 2001; Letertre et al., 2003; Omoe et al., 2003).

A toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) é responsável pela síndrome do choque tóxico em humanos (Cardoso et al., 1999), caracterizando-se por febre, hipotensão, congestão em vários órgãos e choque letal (Silva et al., 1999).

A toxina esfoliativa é causadora da síndrome da pele escaldada (SSSS) em crianças e neonatos (Endo et al., 2003), provoca sintomas como febre, sensibilidade da pele, eritema e descamação da epiderme (Yamaguchi et al., 2002), que revela uma superfície úmida e brilhante com aparência semelhante à pele escaldada (Arbuthnott et al., 1990).

A ocorrência de genes para as toxinas estafilocócicas ou a produção destas toxinas por cepas de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite e produtos derivados do leite foi relatada por diversos autores Cardoso et al. (1999), Endo et al. (2003), Cabral et al. (2004), Ercolini et al. (2004), Salasaia et al. (2004), Zschöck et al. (2004), Loncarevic et al. (2005) e Silva et al. (2005).

O *S. aureus* pode ter acesso ao leite por excreção direta do úbere com mastite clínica e subclínica (Scherrer et al., 2004). Este fato é importante, pois o leite estando contaminado por *S. aureus* pode comprometer a qualidade dos queijos e de outros produtos representando um risco para o consumidor (Ercolini et al., 2004). Se o leite for ingerido cru torna-se uma fonte potencial para intoxicações alimentares, devido à presença das toxinas estafilocócicas (Lim et al., 2004).

Diante do exposto e da carência de dados no Brasil referente às toxinas estafilocócicas, principalmente as mais recentemente identificadas, objetivou-se com este trabalho investigar a presença e a distribuição de genes para as toxinas SEA-SEE, SEG-SEJ, TSST-1, ETA e ETB em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite de vacas com mastite subclínica em municípios da região Agreste do Estado de Pernambuco.

2- Material e Métodos

2.1 Cepas Bacterianas

Foram analisadas 81 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite de 246 vacas de 11 propriedades leiteiras de quatro municípios (A: Angelim, B: São Bento do Una, C: Caetés e D: Correntes), localizados na região do Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil. Como controle da especificidade das reações de PCR foram utilizadas as cepas padrão de *S. aureus* FRI (Food Research Institute Madison, Wiscosin, EUA) FRI MN8 portadora do gene *tst*, FRI 722 portadora do gene *sea*, FRI S6 gene *seb*, FRI 361 genes *sec*, *sed*, *seg*, *sei* e *sej* e FRI 1151 gene *sed*, cedidas gentilmente pelo Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG).

2.2 Coleta e Identificação das Amostras

Nas propriedades estudadas o sistema de criação era semi-intensivo e os animais eram ordenhados uma ou duas vezes ao dia, pelo sistema de ordenha manual ou mecânica (Municípios A e B) ou apenas manual (Municípios C e D).

Para coleta das amostras de leite, o teto foi previamente lavado com água e sabão, secado com papel toalha e realizada anti-sepsia do óstio da teta com álcool a 70°GL. As amostras de leite foram colhidas dos quartos mamários com mastite clínica, positivos ao teste da caneca telada, e daquelas com mastite subclínica, positivos ao *California Mastitis Test* (CMT) (Schalm e Noorlander, 1957).

Para a identificação dos isolados de *Staphylococcus* spp., foram observadas características como produção de hemólise e pigmento em Ágar Base acrescido de 8% de sangue desfibrinado de ovino e características morfo-tintoriais, utilizando o método de coloração de Gram, além de provas bioquímicas como produção de coagulase livre,

termonuclease e catalase, segundo Silva et al. (1997). As provas de produção de acetoina, fermentação da glicose (anaerobiose) e do manitol (aerobiose e anaerobiose) foram realizadas de acordo com Mac Faddin (1980), sendo os isolados de *S. aureus* classificados segundo Baird-Parker (1990).

2.3 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico das cepas de *Staphylococcus* spp. foi extraído de acordo com Maniatis et al. (1989) e quantificado através do programa 1D Image Analysis Software, version 3.5 da Kodak Digital Science, DC 120 zoom Digital Câmera, após eletroforese em gel de agarose a 1%, usando-se o DNA do bacteriófago λ clivado com a enzima de restrição *HindIII*.

2.4 Detecção dos Genes Toxigênicos por PCR

2.4.1 PCR - Multiplex

Foram realizadas duas reações de PCR-Multiplex, sendo uma para pesquisa dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e outra para pesquisa dos genes *eta*, *etb* e *tst*.

As reações foram preparadas para um volume final de 25 μ L contendo 20pmol de cada *primer*, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 50mM de KCl, 160 μ M de cada dNTP, 3mM de MgCl₂, 20ng de DNA genômico e 1,2U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil). As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra) programado para 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 95°C por 1 min. (desnaturação), 55°C por 1 min. (anelamento) e 72°C por 2 min. (extensão). A sequência dos *primers* utilizados nas reações e tamanho dos segmentos esperados são mostrados na Tabela 1. Foram usadas como

controle as cepas padrão de *S. aureus* FRI (Food Research Institute Madison, Wiscosin, EUA) portadoras dos genes *tst*, *sec* e *sed*.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), corados com brometo de etídeo (10mg/mL) por 15 min., visualizados e fotografados em transiluminador de UV.

2.4.2 PCR-Uniplex

As reações de PCR-Uniplex para a pesquisa dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* separadamente, consistiu de uma mistura de 20pmol de cada *primer*, 160 µM de cada dNTP, 1,5mM do MgCl₂, 10mM do Tris-HCl pH 9.0, 50mM de KCl, 20ng do DNA genômico e 1U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) em um volume final de 25µL. As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra) programado para 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 94°C por 3 min., 94°C por 30 seg., 60°C por 30 seg. e 72°C por 30 seg para os genes *seg*, *seh* e *sej*. Para o gene *sei* o ciclo foi programada para 94°C por 30 seg., 60°C por 30 seg. e 72°C por 60 seg. A seqüência dos *primers* utilizados nas reações e tamanho dos segmentos esperados são mostrados na Tabela 1. Foi usada para controle a cepa padrão de *S. aureus* FRI (Food Research Institute Madison, Wiscosin, EUA) portadoras dos genes *seg*, *sei* e *sej*. Os produtos de amplificação foram analisados como descrito anteriormente.

2.4.3 Análise de Restrição e Seqüenciamento

Para confirmar a identidade dos fragmentos amplificados pela PCR dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* foi analisado o padrão de restrição dos fragmentos obtidos. A endonuclease de restrição *DraI* foi escolhida para digestão do fragmento amplificado pela PCR do gene *seh*

e a enzima *RsaI* para os genes *seg* e *sej* como descrito por Rosec e Gigaud (2002). A enzima *RsaI* também foi selecionada para digestão do fragmento amplificado pela PCR do gene *sei* segundo sítios de restrição obtidos através do programa *Generunner DNA Sequence Analyses software*, versão 3.05, disponível gratuitamente na rede (Tabela 2). O tamanho dos fragmentos obtidos após digestão foi analisado após eletroforese em gel de agarose 1,8%.

Para confirmar que os segmentos amplificados pela PCR faziam parte dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, os fragmentos foram purificados com o kit PureLink PCR Purification (Invitrogen, Brasil) e analisados através do seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem, USA). As seqüências dos nucleotídeos obtidas foram analisadas pelos programas: Agrupamento das seqüências de *S. aureus* - *forward* e *reverse* (Huang e Madan, 1999) e comparadas com seqüências depositadas no GenBank: versão 2.2.12 do programa Blast (Altschul et al.1990).

3- Resultados

Dos 984 quartos mamários estudados, 10 (1,0%) apresentaram mastite clínica, 562 (57,1%) mastite subclínica e 412 (41,9%) foram negativos. Dos casos de mastite clínica não foi isolado estafilococos, sendo estes causados por outros microrganismos, isolando-se estafilococos apenas de casos de mastite subclínica.

Das 81 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de vaca com mastite subclínica, 53/81 (65%) foram identificados como *S. aureus*, 16/81 (20%) *Staphylococcus* coagulase positiva e 12/81 (15%) *Staphylococcus* coagulase negativa.

Nenhuma das 81 cepas de *Staphylococcus* spp. possuíam os genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *tst*, *eta* e *etb*. Houve apenas a amplificação dos segmentos de tamanho esperado apenas

para os genes *tst*, *sea*, *seb*, *sec* e *sed* nas cepas de referência (FRI) usadas como controle positivo (Figura 1).

As análises para pesquisa dos genes responsáveis pela produção das toxinas SEG, SEH, SEI e SEJ identificou os segmentos de tamanho esperado em 65/81 (80,2%) das cepas de estafilococos isoladas de leite de vacas com mastite subclínica (Figura 2 A-D) e 16/81 (19,8%) não amplificaram para nenhum dos genes toxigênicos *seg*, *seh*, *sei* e *sej*.

Entre as 65 cepas de *Staphylococcus* spp. que amplificaram segmentos para a presença dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, 39/65 (60%) amplificaram apenas para um gene, 21/65 (32%) amplificaram para dois genes e 5/65 (8%) amplificaram para três genes.

Das 65 cepas positivas para os genes toxigênicos *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, 23/65 (35%) comportavam apenas o gene *seg*, 10/65 (16%) o gene *seh*, 6/65 (9%) o gene *sei*, 2/65 (3%) o genótipo *seh* + *sei*, 6/65 (9%) o genótipo *seg* + *sei*, 8/65 (12%) o genótipo *seg* + *sej*, 5/65 (8%) o genótipo *seg* + *seh*, 4/65 (6%) o genótipo *seg* + *seh* + *sei* e 1/65 (2%) o genótipo *seg* + *sei* + *sej*.

No município A foi encontrado apenas o genótipo *sei* (6/9), no município B os genótipos *seg* (16/33) e *seg* + *sej* (6/33), no município C os genótipos *seg* (7/26), *seg* + *sei* (6/26), *seg* + *sej* (2/26), *seg* + *seh* (5/26), *seg* + *sei* + *sej* (1/26) e *seg* + *seh* + *sei* (4/26) e no município D os genótipos *seh* (10/13) e *seh* + *sei* (2/13) (Tabela 3, Figura 2).

Neste estudo foi alta a ocorrência do gene *seh* nas cepas estudadas. No município C o gene *seh* estava presente em (9/26) das cepas de *Staphylococcus* spp., contudo em associação com o gene *seg* (5/26) ou com os genes *seg* + *sei* (4/26). No município D o gene *seh* predominou, sendo detectado em (12/13) das cepas analisadas, entretanto em (10/13) das cepas o gene *seh* foi observado isoladamente e em (2/13) das cepas em associação com o gene *sei* (Tabela 3. Figura 2).

As 12 cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa comportavam um ou mais genes toxigênicos para as toxinas SEG, SEH e SEI, sendo que 4/12 (33%) comportavam o gene *seh*, 2/12 (17%) apenas o gene *seg*, 3/12 (25%) o genótipo *seg+seh* e 3/12 (25%) o genótipo *seg+seh+sei* (Tabela 3).

A análise dos resultados com o programa *Blast* revelou alta homologia entre os genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* nas cepas estudadas quando comparadas com seqüências depositadas no GenBank: 98%, 99%, 99% e 95%, respectivamente. A comparação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* amplificados nas diferentes cepas e digeridos com *RsaI* e *DraI*, revelou um padrão de restrição esperado e idêntico entre as cepas para cada gene estudado (Tabela 2, Figura 2). Estes resultados confirmam a presença dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* nas cepas analisadas.

4- Discussão

Apesar de nenhuma das cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de vacas com mastite subclínica que amplificaram os genes para as toxinas clássicas SEA, SEB, SEC, SED, SEE, TSST-1, ETA e ETB, a incidência de cepas comportando os genes que codificam as toxinas mais recentemente descritas SEG, SEH, SEI e SEJ foi muito alta (80,2%). Estudos anteriores realizados em São Paulo e na Alemanha com cepas de *S. aureus* de origem bovina também não detectaram a presença destes genes ou detectaram em baixo percentual, apenas detectando os genes para as novas toxinas (Cabral et al., 2004; Salasia et al., 2004).

A ausência de genes para as toxinas clássicas e presença dos genes das novas toxinas descritas nos municípios estudados indica uma distribuição geográfica das cepas toxigênicas. Em vários locais são observados diferentes percentuais para os genes

toxigênicos. Silva et al. (2005) relataram um baixo percentual de isolados contendo os genes *sea*, *seb* e *sec* de casos de mastite bovina no Estado de Minas Gerais. Omoe et al. (2002) ao analisarem 21 isolados de leite de vacas com mastite no Japão observaram que oito comportavam os genes *sec*, *seg* e *sei* e sete os genes *seg* e *sei* não tendo sido observada a presença dos genes *sea*, *seb*, *sed* e *see*.

Alta prevalência de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas foi observada por Lim et al. (2004) que trabalhando com 166 isolados de *S. aureus* de mastite bovina na Korea, verificaram que 32 dos isolados continham o gene *sea*, três o gene *seb*, um o gene *sec* e outro os genes *sea* e *tst* e que estes isolados ao serem caracterizados através de eletroforese em campo pulsado (PFGE) pertenciam ao mesmo perfil genotípico que prevalecia nas fazendas analisadas. Katsuda et al. (2005) ao analisarem 270 cepas de *S. aureus*, isoladas de leite de vacas com mastite no Japão também verificaram alta prevalência de cepas enterotoxigênicas 181/270 (67%), sendo o genótipo mais encontrado o que comportava simultaneamente os genes *sec*, *seg*, *sei* e *tst*.

Jorgensen et al. (2005a) ao analisarem *S. aureus* isolados de amostras de leite bovino e caprino em sete regiões da Noruega, constataram que na maioria das regiões era encontrado um único tipo de gene toxigênico e apenas uma das sete regiões apresentou grande diversidade de genes toxigênicos. Estes relatos sugerem que existe uma distribuição regional na prevalência de algumas SEs e seus genes, indicando uma dispersão das cepas de *S. aureus* em áreas geográficas específicas. Diferentes autores relataram esta distribuição geográfica das cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas isoladas de leite de vacas com mastite (Lopes et al., 1990; Fitzgerald et al., 1997; Larsen et al., 2000; Stephan et al., 2001).

O papel destas SEs recentemente descritas na intoxicação alimentar estafilocócica, ainda permanece indeterminado (Rosec e Gigaud, 2002), no entanto, MacLauchlin et al.

(2000) ao analisarem 23 cepas de estafilococos envolvidas em casos de intoxicação alimentar não observaram a produção das toxinas SEA, SEB, SEC, SED ou SEE, mas detectaram a presença dos genes toxigênicos *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, indicando que estas novas SEs podem ser responsáveis por tais surtos de intoxicação alimentar.

Na análise das cepas estudadas de *Staphylococcus* spp. dos quatro municípios da região Agreste do estado de Pernambuco o gene *seg* predominou de forma isolada (23/65). Abe et al. (2000) também sugerem que SEG foi uma das mais freqüentes toxinas produzidas por *S. aureus*.

O genótipo *seg* + *sei* como o mais prevalente em isolados de estafilococos de casos de mastite bovina (Cabral et al., 2004; Katsuda et al., 2005; Zschöck et al., 2005), por estes genes estarem interligados em tandem (Munson et al., 1998; Maclauchlin et al., 2000).

Neste estudo a associação *seg* + *sei* predominou em 6/65 (9%), sendo a segunda associação que mais ocorreu, porém, com um baixo percentual. Omoe et al. (2002) relataram que há uma alta incidência de linhagens de *S. aureus* positivas para os genes *seg* + *sei* isoladas de leite de vacas com mastite. No entanto, Jorgensen et al. (2005a) ao analisarem 101 isolados de tanques de leite bovino, verificaram baixa incidência da associação *seg* + *sei* 2/53. Estes resultados sugerem que os genes *seg* e *sei* nem sempre coexistem na mesma cepa e parece também existir uma distribuição geográfica destas associações.

O gene *seh* foi detectado em 21/65 (32%) das cepas de *Staphylococcus* spp. isoladamente ou em associação com genes para outras toxinas, sendo estes resultados divergentes dos descritos por outros autores, pois baixos percentuais, (inferiores a 16%) ou a não detecção do gene *seh* foi relatada (Omoe et al., 2002; Salasaia et al., 2004; Cabral et al., 2004; Cremonesi et al., 2005; Jorgensen et al., 2005a; Katsuda et al., 2005; Zschöck et

al., 2005). O gene *seh* foi observado apenas nos municípios C e D, provavelmente por serem próximos, com as mesmas características geográficas, além de as propriedades analisadas apresentarem o mesmo tipo de manejo animal.

O percentual de 32% encontrado é considerado elevado em relação aos encontrados em outros locais, reforçando a evidência da distribuição geográfica entre as cepas toxigênicas de estafilococos.

Em um massivo surto de intoxicação alimentar envolvendo 10000 casos, causados pela ingestão de leite reconstituído que tinha como matéria prima leite desnatado em pó em Osaka, Japão, verificou-se que a toxina envolvida era a SEA, mas segundo Ikeda et al. (2005) a quantidade detectada (80 ng) seria insuficiente para causar um surto com tamanha extensão, desta forma, estes autores se propuseram a investigar dez lotes do leite em pó desnatado envolvido em tal surto com relação à presença de outras toxinas além da SEA, utilizando para tal a técnica de PCR. Verificaram a presença de *sea* e *seh* genes em 10 amostras, realizaram a quantificação da SEH por ELISA e concluíram que o referido surto foi causado por pequenas quantidades de SEA e SEH, pois estas toxinas estavam presentes nas mesmas quantidades em todas as amostras analisadas e que 30µg de SEH causa resposta emética em macacos após 1,5 a 3 horas da administração (Su e Wong, 1995).

Um surto de intoxicação alimentar causado por purê de batata feito com leite cru, observou-se a presença de cepas de *S. aureus* portadoras apenas do gene *seh*. E a pesquisa para as enterotoxinas clássicas SEA-SEE foi negativa (Jorgensen et al. 2005b). Os isolados testados produziram quantidades significantes (98 a 108 ng) de SEH. O que significa que cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras do gene *seh* podem produzir quantidade de SEH suficiente para causar intoxicação.

Foi alta a prevalência entre as cepas de SCN (100%) que comportavam genes *se*. Cada cepa apresentou um dos genes *seg*, *seh* ou as associações *seg* + *seh* e *seg* + *seh* + *sei*.

A síntese das enterotoxinas estafilocócicas clássicas em SCN foi bastante estudada no passado (Vernozy-Rozand et al., 1996, Jaulhac et al., 1992, Rosec et al., 1997, Udo et al., 1999) e os resultados sugerem que os SCN podem estar envolvidos em surtos de intoxicação alimentar associados às enterotoxinas clássicas. Entretanto existe ainda a necessidade de investigar os SCN para síntese de todas as enterotoxinas já descritas, principalmente as mais recentes.

5- Conclusão

Neste estudo foi observada apenas a presença dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, sendo o gene *seg* o mais freqüente entre cepas de *Staphylococcus* spp. estudadas, representando potencial risco para a Saúde Pública. A presença do gene *seh*, com alto percentual, em apenas dois dos quatro municípios analisados é um achado que reafirma a existência de uma distribuição geográfica de algumas cepas toxigênicas, não só em relação a países e estados diferentes, mas também, municípios de uma mesma região.

6- Agradecimentos

Ao Banco do Nordeste do Brasil pelo financiamento do projeto e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida ao primeiro autor. Agradecem também ao Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG) e ao Dr. Luiz Simeão do Carmo por ter cedido as cepas padrão FRI (Food Research Institute Madison, Wiscosin, EUA).

Tabela 1 – *Primers* usados na análise da PCR para a detecção dos genes *sea-see*, *seg-sej*, *tst*, *eta* e *etb* em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite de vacas com mastite subclínica na região Agreste do estado de Pernambuco, Brasil

Gene	Primer	Sequência de Oligonucleotídeos (5' → 3')	Tamanho do Fragmento (pb)
* <i>sea</i>	SEA-3b	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG	127
	SEA-4b	TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C	
* <i>seb</i>	SEB-1c	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	477
	SEB-4b	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	
* <i>sec</i>	SEC-3b	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG	271
	SEC-4b	TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	
* <i>sed</i>	SED-3b	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG	319
	SED-4b	TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC	
* <i>see</i>	SEE-3b	CAG TAC CTA TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC	178
	SEE-2c	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	
* <i>tst</i>	TST-3	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG	445
	TST-6	ATCGAACTTTGGCCCATACTTT	
* <i>eta</i>	ETA-3b	CTAGTGCATTTGTTATTCAAGACG	119
	ETA-4b	TGCATTGACACCATAGTACTTATTC	
* <i>etb</i>	ETB-3b	ACG GCT ATA TAC ATT CAA TTC AAT G	262
	ETB-4b	AAA GTT ATT CAT TTA ATG CAC TGT CTC	
** <i>seg</i>	SEG-1	ACGTCTCCACCTGTTGAAGG	400
	SEG-2	TGAGCCAGTGTCTTGCTTTG	
** <i>seh</i>	SEH-1	TCACATCATATGCGAAAGCAG	357
	SHE-2	TAGCACCAATCACCCCTTTCC	
*** <i>sei</i>	SEI-1	GGTGATATTGGTGTAGGTAAC	454
	SEI-2	ATCCATATTCTTTGCCTTTACCAG	
** <i>sej</i>	SEJ-1	CAGCGATAGCAAAAATGAAACA	426
	SEJ-2	TCTAGCGGAACAACAGTTCTGA	

*Becker et al., 1998, **Rosec e Gigaud, 2002 e ***Omoe et al., 2002

Tabela 2– Endonucleases de restrição usadas para confirmação da identidade dos fragmentos dos genes *seg*, *seh*, *sei*, *sej* e padrão de restrição esperado

Gene	Tamanho do Produto Amplificado	Enzimas	Padrão de Restrição (tamanho das bandas)
<i>seg</i>	400 pb	<i>Rsa</i> I	296 pb + 104 pb
<i>seh</i>	357 pb	<i>Dra</i> I	218 pb + 139 pb
<i>sei</i>	454 pb	<i>Rsa</i> I	345pb + 109 pb
<i>sej</i>	426 pb	<i>Rsa</i> I	210 pb + 216 pb

Tabela 3 – Distribuição dos genes para as toxinas SEG, SEH, SEI e SEJ nas cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de leite de vacas com mastite subclínica em quatro municípios localizados na região Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil

GENÓTIPO	MUNICÍPIOS ANALISADOS									
	A	B			C			D		
	S.A	S.A	SCP	SCN	S.A	SCP	SCN	S.A	SCP	SCN
<i>seg</i>	-	10	4	2	3	4	-	-	-	-
<i>seh</i>	-	-	-	-	-	-	-	4	2	4
<i>sei</i>	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>seg+sej</i>	-	6	-	-	2	-	-	-	-	-
<i>seg+seh</i>	-	-	-	-	2	-	3	-	-	-
<i>seg+sei</i>	-	-	-	-	4	2	-	-	-	-
<i>seh+sei</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-
<i>seg+sei+sej</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>seg+seh+sei</i>	-	-	-	-	1	-	3	-	-	-
Cepas negativas	3	9	2	-	-	1	-	1	-	-
Total de cepas	9	25	6	2	13	7	6	6	3	4

S.A. – *Staphylococcus aureus*, SCP – *Staphylococcus coagulase positiva*, SCN – *Staphylococcus coagulase negativa*, A (Município de Angelim), B (Município de São Bento do Una), C (Município de Caetés), D (Município de Correntes)

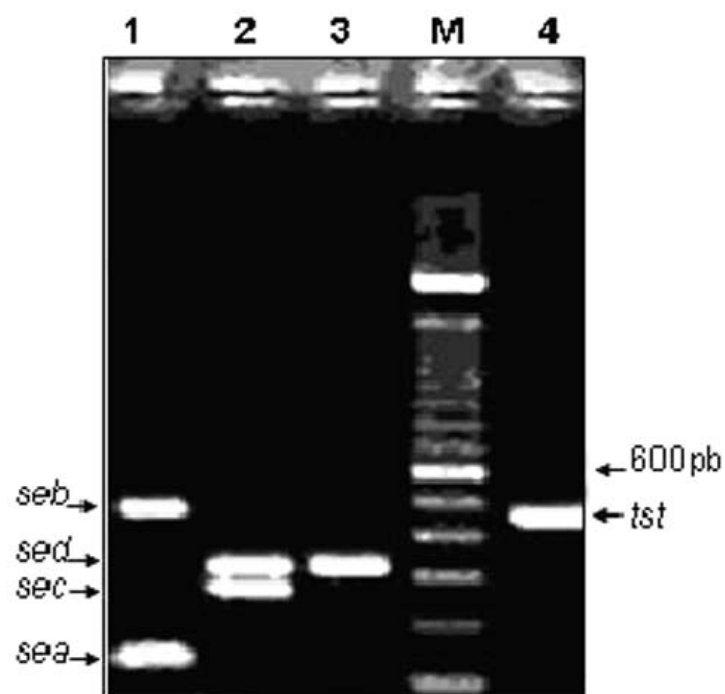


Figura 1 - Detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tst* nas cepas padrões de *S. aureus* FRI através da PCR-Multiplex. Linhas - M: DNA ladder 100 pb, 1: FRI S6, 2: FRI 361, 3: FRI 1151, 4: FRI MN8.

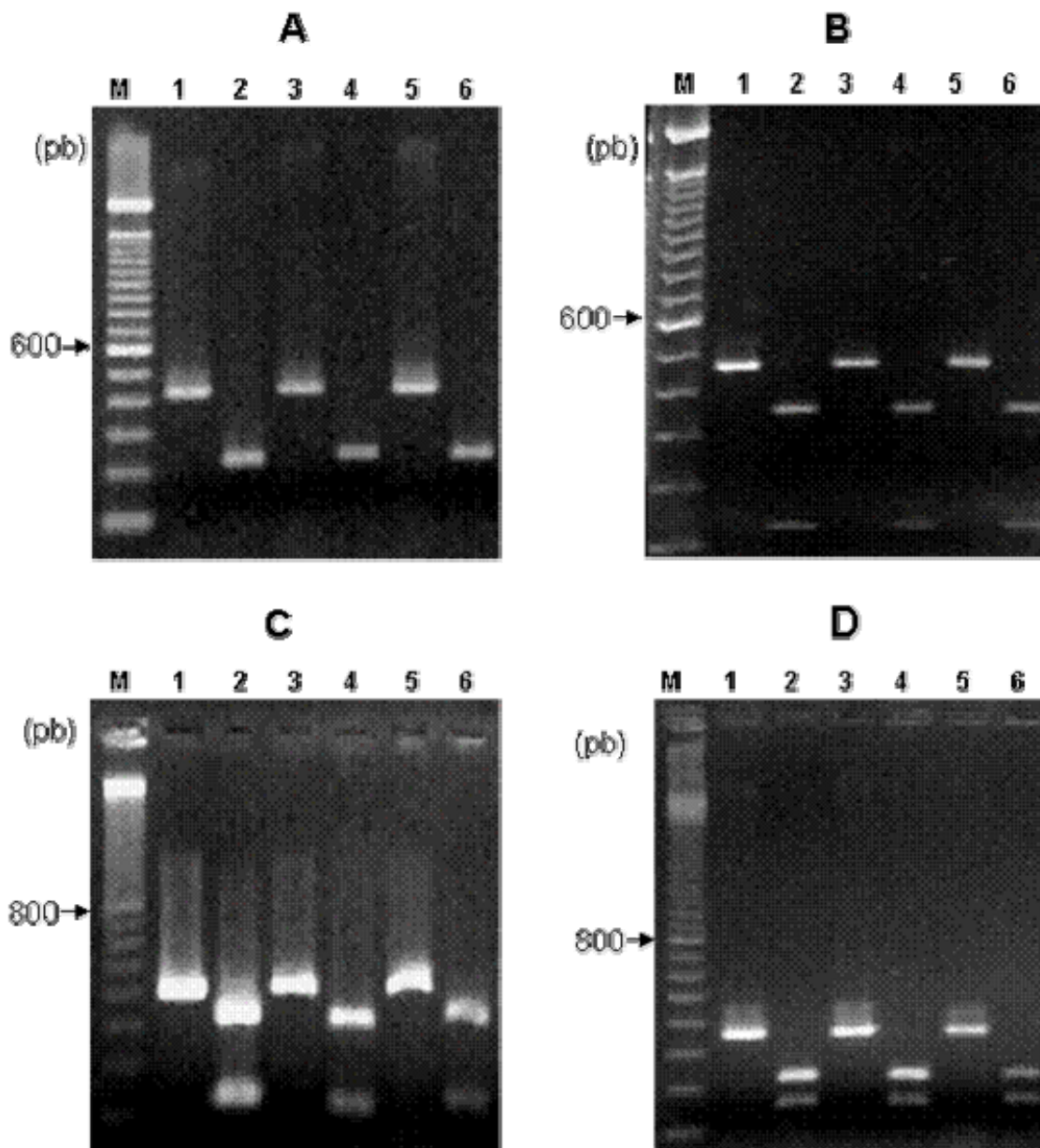


Figura 2 - Produto de amplificação da PCR dos genes *sej*, *sei*, *seg* e *seh* (A, B, C e D, linhas: 1, 3 ,5) e seus padrões de restrição com as enzimas, *Rsa*I: A, B e C e *Dra*I: D, linhas: 2, 4, 6).

7- Referências Bibliográficas

Abe, J., Ito, Y., Onimaru, M., Kohsaka, T., Takeda, T., 2000. Characterization and distribution of a new enterotoxin-related superantigen produced by *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Immunol. 44, 79-88.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myres, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.

Arbuthnott, J.P., Coleman, D.C., De Azevedo, J.S., 1990. Staphylococcal toxins in human disease. In: The Staphylococci: an introduction. J. Appl. Bacteriol. 69, 101-107.

Balaban, N., Rasooly, A., 2000. Staphylococcal Enterotoxins. Int. J. Food Microbiol. 61, 01-10.

Baird-Parker, A.C., 1990. The Staphylococci: an introduction. J. Appl. Bacteriol. 19, 15-85.

Bradley, A.J., 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet J. 164, 116-128.

Becker, K., Roth, R., Peters, G., 1998. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassay for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. J. Clin. Microbiol. 36, 2548-2553.

Cabral, K.G., Lämmle, C., Zschöck, M., Langoni, H., Sá M.E.P., Victória, C., Da Silva, A.V., 2004. Pheno and genotyping *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. Can. J. Microbiol. 50, 901-909.

Cardoso, H.F.T., Silva, N., Sena, M.J., Carmo, L.S., 1999 Production of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. Lett. Appl. Microbiol. 29, 347-349.

Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini, D., Caramente, G., Moroni, P., Castiglioni, B., 2005. Development of multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. Mol. Cell. Probes. 19,299-305.

Dinges, M.M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M., 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol.Rev. 13, 16-34.

Endo, Y., Yamada, T., Matsunaga, K., Hayakawa, Y., Kaidoh, T., Takeuchi, S., 2003. Phage conversion of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. Vet. Microbiol. 96, 81-90.

Ercolini, D., Blaiotta, G., Fusco, V., Coppola, S., 2004. PCR-based detection of enterotoxin *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. J. Appl. Microbiol. 96, 1090-1096.

Fitzgerald, J.R., Meaney, W.J., Hartigan, P.J., Smyth, C.J., Kapur, V., 1997. Fine structure molecular epidemiology analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. Epidemiol. Infect. 119, 261-269.

Huang, X., Madan, A., 1999. Cap3: a DNA sequence assembly program. Genome Res.9, 868-877.

Ikeda, T., Tamate, N., Yamaguchi, K., Makino, S.I., 2005. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxin A e H. Appl. Env. Microbiol. 71, 2793-2795.

Jaulhac, B., Bes, M., Bornstein, N., Piemont, Y., Brun, Y., Fleurette, J., 1992. Synthetic DNA probes for detection of genes for enterotoxins A, B, C, D, E and TSST-1 in staphylococcal strains. J Appl Microbiol. 72,386-392.

Jaurrad, S., Peyrat, M.A., Lim, A., Tristan, A., Bes, M., Mougei, C., Etienne, J., Vandenesch, F., Bonneville, M., Lina, G.L., 2001. *egc* a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nurse of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J. Immun. 166, 669-677.

Jorgensen, H.J., Mork, T., Hogasen, H.R., Rorvik, L.M., 2005a. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. J. Appl. Microbiol. 99, 158-166.

Jorgensen, H., Mathisen, T., Lovseth, A., Omoe, K., Qvale, K.S., Loncarevic, S., 2005b. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. FEMS Microbiol. Lett. 252, 267-272.

Katsuda, K., Hata, E., Kobayashi, H., Kohmoto, M., Kawashima, K., Tsunemitsu, H., Eguchi, M., 2005. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. Vet. Microbiol. 105, 301-305.

Klotz, M., Opper, S., Heeg, K., Zimmermann, S., 2003. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. J. Clin. Microbiol. 41, 4683-4687.

Kuroda, M.O., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., Hiramatsu, K., 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet. 357, 1225-1240.

Larsen, H.D., Huda, A., Eriksen, N.H.R., Jensen, N.E., 2000. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. Vet. Microbiol. 76, 153-162.

Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F., Fach, P., 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by egc cluster of *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Microbiol. 2, 63-76.

Lim, S.K., Joo, Y., Moon, J., Lee, A., Nam, H., Wee, S., Koh, H., 2004. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. J. Vet. Med. Sci. 66, 581-584.

Loncarevic, S., Jorgensen, H.J., Lovseth, A., Mathisen, T., Rorvik, L.M., 2005. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. J. Appl. Microbiol. 98, 344-350.

Lopes, C.A.M., Moreno, G., Curi, P.R., Gottschak, J.R., Modolo, J.R., Correa, A., Pavan, C., 1990. Characteristics of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Brazil. Br. Vet. J. 146, 443-448.

Mac Faddin, J.F., 1980. Biochemical test for identification of medical bacteria. 2ed. Baltimore: Williams e Wilkins. 527p.

Mclauchlin, J., Narayanan, G.L., Mithani, V., O'neil, G., 2000. The detection of enterotoxins and toxic shock síndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. J. Food Prot. 63, 479-488.

Maniatis, T., Frisch, E., Sambrook, J., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Muson, S.H., Treimane, M.T., Beteley, M.J., Welch, R.A., 1998. Identification and characterization of *Staphylococcus* enterotoxin type G and I from *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 66, 3337-3348.

Omoe, K., Ishikawa, M., Shimoda, Y., Hu, D.L., Ueda, S., Shinagawa, K., 2002. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh* or *sei* genes. J. Clin. Microbiol. 40, 857-862.

Omoe, K., Hu, D.L., Omoe, T.H., Nakane, A., Shinagawa, K., 2003 Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infec. Immun. 71, 6088-6094.

Orwin, P.M., Leung, D.Y.M., Heather, L.D., Schlievert, P.M., 2001. Biochemical and Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin K. Infec. Immun. 69, 360-366.

Ren, K; Bannan, J.D., Pancholi, V., Cheung, A.L., Robbins, J.C., Fischetti, V.A., Zabriskie, B., 1994. Characterization and biological properties of a new staphylococcal enterotoxin. J. Exp. Med. 180, 1675-1683.

Rosec, J.P., Guiraud, J.P., Dalet, C., Richard, N., 1997. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int Food Microbiol.* 35,213-221.

Rosec, J.P., Gigaud, O., 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int J Food Microbiol.* 25,61-67.

Salasaia, S.I.O., Khusnan, Z., Lämmler, C., Zschöck, M., 2004. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse en Germany. *J. Vet. Sci.* 5, 103-109.

Schalm, O.W., Noorlander, B.S., 1957. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130, 199-207.

Scherrer, D., Corti, S., Muehlherr, J.E., Zweifel, C., Stephan, R., 2004. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Vet. Microbiol.* 101, 101-107.

Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A., 1997. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 295p.

Silva, N., Cardoso, H.F.T., Sena, M.J., Carmo, L.S., 1999. Produção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico por *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino em Minas Gerais. *NAPGAMA.* 2, 12-14.

Silva, E.R., Carmo, L.S., Silva, N., 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.

Stephan, R., Annemüller, C., Hassan, A.A.; Lämmli, C.H., 2001 Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. Vet. Microbiol. 78, 373-382.

Su, Y.C., Wong, A.C.L., 1995. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1438-1443.

Udo, E.E., Al-Bustan, M.A., Jacob, L.E., Chugh, T. D., 1999. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from kuwait city may be a potencial cause of food poisoning. J. Med. Microbiol. 48, 819-823.

Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Prevost, G., Lapeyre, C., Bes, M., Brun, Y., Fleurette, J., 1996. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk and cheese. Int. J. Food Microbiol. 30, 271-280.

Yamaguchi, T., Nishifuji, K., Sasaki, M., Fudaba, Y., Aepfelbacher, M., Takata, T., Ohara, M.; Komatsuzawa, H., Amagai, M., Sugai, M., 2002. Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. Infect. Immun. 70, 5835-5845.

Zhang, S., Iandolo, J.J., Stewart, G.C., 1998. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (*sej*). FEMS Microbiol. Lett. 168, 227-233.

Zschöck, M., Ribe, K., Sommerhäuser, J., 2004. Occurrence and clonal relatedness of *sec/tst*-gene positive *Staphylococcus aureus* isolated of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. Lett. Appl. Microbiol. 38, 493-498.

Zschöck, M., Kloppert, B., Wolter, W., Hamann, H.P., Lämmler, C., 2005. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. Vet. Microbiol. 108, 243-249.

5.4 ARTIGO CIENTÍFICO 4: PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA E DETECÇÃO DE GENES TOXIGÊNICOS EM CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. ISOLADAS DE QUEIJOS DE COALHO NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

Este trabalho será enviado para a Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Anexo 3).

Resumo

Para avaliar a qualidade microbiológica de queijos de coalho comercializados no Estado de Pernambuco com relação a *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), realizou-se o isolamento, contagem e identificação deste microrganismo, utilizando-se o Ágar Baird-Parker. A presença de genes toxigênicos responsáveis pela produção das toxinas SEA-SEE, SEG-SEJ, TSST-1, ETA e ETB nas cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa isoladas das amostras de queijos de coalho foi investigada por PCR. Estas cepas também foram submetidas a testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro*, através da técnica de difusão em disco. Os resultados revelaram contagens de SCP variando de 10^2 a 10^6 UFC/g e que 9/10 das amostras de queijos de coalho estavam fora dos padrões estabelecidos pela legislação vigente. A presença de genes toxigênicos *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* foi encontrada em 18/20 das cepas com os seguintes percentuais 5%, 11%, 9%, 20%, 16%, 25%, 14%, respectivamente. Com relação ao perfil de sensibilidade antimicrobiana foi constatado que os antibióticos mais eficazes foram: sulfa+trimetoprim e vancomicina com 100% de eficácia. Estes resultados são preocupantes para a saúde do consumidor nordestino, pois o queijo de coalho é amplamente consumido nesta região.

Palavras-chave: PCR, *Staphylococcus* spp., Queijo de Coalho, Resistência Antimicrobiana

1- Introdução

Os alimentos destinados ao consumo humano estão expostos a contaminações desde sua origem até a mesa do consumidor. Leite e produtos derivados apesar de nutritivos para o homem, constituem-se em excelentes meios para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, podendo desencadear surtos de toxinfecção alimentar, os quais têm sido amplamente relatados na literatura, verificando-se a necessidade de melhoria nas condições higiênico-sanitárias na cadeia produtiva do leite (Veras et al. 2003).

O queijo de coalho é um dos mais tradicionais queijos produzidos no Nordeste brasileiro e devido à simplicidade de sua tecnologia, é amplamente fabricado nesta região. É também um importante derivado do leite, apreciado tanto pelo seu valor nutritivo como pelo seu sabor que atende aos mais exigentes paladares. No entanto, as condições de processamento, armazenamento e comercialização podem comprometer suas características organolépticas, bem como, torná-lo impróprio para consumo, em virtude da contaminação por microrganismos responsáveis por toxinfecções alimentares (Ribeiro de Sá et al. 2003).

A qualidade e a durabilidade de um produto dependem da qualidade da matéria-prima utilizada na sua fabricação. Dessa forma, a qualidade do leite é de fundamental importância para a produção de queijos.

A contaminação microbiana de queijos assume destacada relevância em saúde pública ao se considerar que bactérias enterotoxigênicas e patogênicas como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Listeria* sp. e *Salmonella* sp. são comumente encontradas (Sena et al. 1999; Ercolini et al. 2004).

Elevados índices de *Staphylococcus aureus* ocorrem em queijos tanto no Brasil (Santos et al. 1995; Ritter et al., 2001; Benevides & Telles 2002; Hoffmann et al. 2002; Barbosa et al. 2004) como em outros países do mundo (Holecková et al. 2002; Normanno

et al. 2005), incluindo cepas de estafilococos enterotoxigênicas. Por isso, o queijo ocupa lugar de destaque entre os produtos lácteos envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar, veiculando principalmente *Staphylococcus* (Veras et al. 2003).

Segundo Carmo et al. (2002), 378 pessoas estavam envolvidas em um surto de intoxicação alimentar estafilocócica em Minas Gerais após a ingestão de queijo Minas e de acordo com levantamentos anuais sobre doenças de origem alimentar realizados em sete países, o leite e derivados são responsáveis por 1 a 5% dos surtos causados por bactérias, sendo o leite responsável por 39,1% dos casos, os queijos por 53,1% e outros produtos derivados por 7,8% (Buyser et al. 2001). No Brasil, também foram diagnosticados sete casos de intoxicações estafilocócicas onde o alimento envolvido foi o queijo e a toxina responsável a SEH (Pereira et al., 1996).

O *S. aureus* e os *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa podem produzir enterotoxinas e, assim, representarem risco quando presentes em alimentos (Pereira & Pereira, 2005).

Outro problema de destaque na área de saúde em relação aos estafilococos é a resistência antimicrobiana, pois bactérias resistentes a antibióticos preocupam uma vez que podem ser transmitidas ao homem pela ingestão de alimentos contaminados. No trato gastrointestinal, elas podem transferir genes que conferem resistência antimicrobiana a outras bactérias (Wite 2000).

A seleção de populações microbianas resistentes a antibióticos ocorre como consequência do impacto combinado do uso da droga no homem, animais, e plantas (Rapini et al. 2003).

Sendo o queijo de coalho um alimento bastante consumido no Estado de Pernambuco, este trabalho teve como objetivo realizar o isolamento e quantificação de

Staphylococcus spp., bem como testar a sensibilidade antimicrobiana das cepas isoladas, frente a alguns antibióticos utilizados na medicina veterinária e humana e investigar a presença de genes toxigênicos utilizando a técnica de PCR.

2- Material e Métodos

2.1 Cepas de *Staphylococcus* spp.

Foram analisadas 20 cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de 10 amostras de queijos de coalho comercializadas no estado de Pernambuco (Tabela1).

As amostras de queijos foram submetidas ao isolamento, contagem e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva no Setor de Microbiologia do Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco (LANAGRO) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva as amostras de queijos foram pesadas em alíquotas de 25 +/- 0,2g, em sacos de *stomacher* previamente identificados e mantidas sob refrigeração até o início das análises.

As amostras de queijos de coalho foram analisadas seguindo-se a metodologia oficial, preconizada pela Coordenação de Laboratório Animal (CLA) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA (Brasil 2003), utilizando como meio de cultura o Ágar Baird-Parker enriquecido com emulsão de gema de ovo em solução salina 0,85% (1:1) e solução de telurito de potássio (1%). O cálculo para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/g) foi realizado em função do número de colônias típicas e atípicas contadas, diluição inoculada e percentual de colônias confirmadas (Brasil 2003).

2.2 Identificação das Cepas de *Staphylococcus* spp.

Para a identificação das cepas de estafilococos foram verificadas características morfológicas das colônias através de seu crescimento em Ágar Base, acrescido de 8% de sangue desfibrinado de carneiro e pela coloração através da técnica de Gram, produção de hemólise e provas bioquímicas como catalase, coagulase, termonuclease, fermentação da glicose em anaerobiose, fermentação do manitol em aerobiose e anaerobiose e produção de acetoina. Após a realização dos testes, as cepas foram classificadas em *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), quando positiva em todos os testes, *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), quando positiva para a produção da coagulase, fermentação da glicose em anaerobiose e catalase, mas negativa em algum dos outros testes. Em *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), quando a cepa não coagulava o plasma de coelho, apresentava características de estafilococos na técnica de coloração de Gram, fermentava a glicose em anaerobiose e produzia a catalase.

2.3 Testes de Sensibilidade Antimicrobiana

Os testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos isolados de *Staphylococcus* spp. foram realizados utilizando a técnica de difusão em Ágar segundo Bauer *et al.* (1966) em Ágar Müeller Hinton, utilizando os seguintes discos impregnados de antibióticos: amoxicilina (10 µg), bacitracina (10 U.I.), cefalexina (10 µg), clindamicina (2µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), enrofloxacin (5 µg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), neomicina (30 µg), norfloxacin (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina (10 U.I.), sulfa (25 µg) + trimetoprim (5 µg), e vancomicina (30 µg).

2.4 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico das cepas de *Staphylococcus* spp. foi extraído de acordo com Maniatis et al. (1989) e quantificado através do programa 1D Image Analysis Software, version 3.5 da Kodak Digital Science, DC 120 zoom Digital Câmera, após eletroforese em gel de agarose a 1%, usando-se o DNA do fago λ clivado com a enzima *HindIII*.

2.5 Detecção dos Genes Toxigênicos por PCR

2.5.1 PCR - Multiplex

Duas reações de PCR-Multiplex foram realizadas, uma para pesquisa dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e outra para pesquisa dos genes *eta*, *etb* e *tst*.

As reações foram preparadas para um volume final de 25 μ L contendo 20pmol de cada *primer*, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 50mM de KCl, 160 μ M de cada dNTP, 3mM de MgCl₂, 20ng de DNA genômico e 1,2U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil). As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra) programado para 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 95°C por 1 min. (desnaturação), 55°C por 1 min. (anelamento) e 72°C por 2 min. (extensão). A sequência dos *primers* utilizados nas reações e tamanho dos segmentos esperados são mostrados na Tabela 2. Foram usados como controle as cepas padrão de *S. aureus* FRI (Food Research Institute Madison, Wiscosin, EUA) MN 8 portadoras do gene *tst* e FRI 361 portadora dos genes *sec* e *sed*.

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), corados com brometo de etídeo (10mg/mL) por 15 min., visualizados e fotografados em transiluminador de UV.

2.5.2 PCR-Uniplex

As reações de PCR-Uniplex para a pesquisa dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* separadamente, consistiu de uma mistura de 20pmol de cada *primer*, 160 µM de cada dNTP, 1,5mM do MgCl₂, 10mM do Tris-HCl pH 9.0, 50mM de KCl, 20ng do DNA genômico e 1U da *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) em um volume final de 25µL. As amplificações para os genes *seg*, *seh* e *sej* foram realizadas em termociclador (Biometra) programado para 30 ciclos térmicos, cada um consistindo de 94°C por 3 min., 94°C por 30 seg., 60°C por 30 seg. e 72°C por 30 seg. A amplificação do fragmento para o gene *sei* foi programada para 94°C por 30 seg., 60°C por 30 seg. e 72°C por 60 seg. Foi usada para controle a cepa padrão de *S. aureus* FRI 361 portadora dos genes *seg*, *sei* e *sej*.

A sequência dos *primers* utilizados nas reações e tamanho dos segmentos esperados são mostrados na Tabela 2.

2.5.3 Análise de restrição e sequenciamento

Para confirmar se os segmentos amplificados pela PCR faziam parte dos genes *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* o padrão de restrição dos fragmentos foi obtido. A enzima *RsaI* foi selecionada para a digestão dos fragmentos amplificados pela PCR dos genes *seg* e *sej* e a enzima *DraI* para o gene *seh*, de acordo com Rosec & Gigaud (2002). Avaliando-se os sítios de restrição através do programa *Generunner DNA Sequence Analyses software*, versão 3.05, disponível gratuitamente na rede a enzima *RsaI* foi utilizada para a digestão dos fragmentos amplificados pela PCR dos genes *sec*, *sed* e *sei* e a *DraI* para o gene *tst* (Tabela 3). O tamanho dos fragmentos obtidos após restrição foi analisado após eletroforese em gel de agarose 1,8%.

Para confirmar que o segmento amplificado era parte dos genes *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* os segmentos foram purificados com o kit PureLink PCR Purification (Invitrogen, Brasil) e analisados através do seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystem, USA). As seqüências dos nucleotídeos obtidas foram analisadas pelos programas: agrupamento das seqüências de *S. aureus* - *forward* e *reverse* (Huang & Madan, 1999) e comparadas com seqüências depositadas no GenBank: versão 2.2.12 do programa Blast (Altschul et al. 1990).

3- Resultados

Das 20 cepas de *Staphylococcus* spp. estudadas, (55%) foram identificadas como *S. aureus*, (30%) como SCP e (15%) como SCN.

As contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva em Ágar Baird-Parker nas 10 amostras de queijos de coalho variaram de 10^2 a 10^6 UFC/g (Tabela 1), com a seguinte distribuição (50%) das amostras apresentaram contagens de 10^5 UFC/g, (20%) apresentaram contagens de 10^4 e (10%) apresentou contagem de 10^6 , de 10^3 e 10^2 .

De acordo com a resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) para os queijos de quartirolo, cremoso, criollo, mussarela e similares, com umidade entre 46% e 55%, exceção de minas frescal e incluído o queijo de coalho com umidade correspondente, o limite padrão para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva é de 5×10^3 UFC/g. Desta forma, das 10 amostras de queijos de coalho analisadas, (90%) estavam fora do padrão estabelecido para *Staphylococcus* coagulase positiva.

No que se refere à pesquisa de genes toxigênicos através da técnica de PCR constatou-se que (10%) das cepas avaliadas não apresentaram nenhum dos genes

toxigênicos *sea-see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *tst*, *eta* e *etb* e (90%) foram positivas para um ou mais genes toxigênicos.

A prevalência dos genes toxigênicos nas cepas de *Staphylococcus* spp. foi *seg* (20%), *seh* (16%), *sei* (25%), *sej* (14%), *sec* (11%), *sed* (9%) e *tst* (5%). No entanto, não foi diagnosticada a presença de genes para as toxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEE, ETA e ETB em nenhuma das vinte cepas de *Staphylococcus* spp. estudadas.

Das 18 cepas que apresentaram genes toxigênicos (11%) portavam apenas um gene, (11%) dois genes, (45%) três genes, (11%) cinco genes e (22%) seis genes, tendo sido verificado os seguintes genótipos: *tst* 1/18 isoladamente, *sei* 1/18 isoladamente, a associação (*seh* + *sei*) 2/18 e as associações (*seg* + *sei* + *sej*) 5/18, (*tst* + *seg* + *seh*) 1/18, (*sec* + *sed* + *sei*) 1/18, (*seg* + *seh* + *sei*) 1/18, (*sec* + *tst* + *seg* + *seh* + *sei*) 1/18, (*sec* + *sed* + *seg* + *seh* + *sei* + *sej*) 4/18.

Das três cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, uma cepa apresentou o genótipo (*seh* + *sei*) e duas o genótipo (*sec* + *sed* + *seg* + *seh* + *sei* + *sej*).

A análise dos resultados feita com o programa Blast revelou homologia superior a 90% entre os genes *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* nas cepas estudadas quando comparadas com seqüências depositadas no GenBank. A comparação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose dos genes *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* amplificados nas diferentes cepas e digeridos com *Rsa*I e *Dra*I, revelou um padrão de restrição esperado e idêntico entre as cepas para cada gene estudado (Tabela 3, Figura 1). Estes resultados confirmam a presença dos genes *tst*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej* em cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa isoladas de amostras de queijos de coalho no Estado de Pernambuco.

Com relação à sensibilidade antimicrobiana (80%) das cepas de *Staphylococcus* spp. analisadas apresentaram-se sensíveis aos antibióticos utilizados no teste de sensibilidade

antimicrobiana *in vitro*, (4%) apresentaram sensibilidade intermediária e (16%) foram resistentes. O Perfil de sensibilidade antimicrobiana para cada antibiótico testado, encontra-se na Tabela 4, onde também verifica-se que os antibióticos mais eficazes, com 100% de sensibilidade foram sulfá + trimetoprim e vancomicina e os menos eficazes, com maiores percentuais de resistência foram estreptomicina 65% e penicilina 65%.

Ao se analisar a característica de multiresistência, verificou-se que 60% das cepas foram resistentes para 0 a 2 antibióticos, 30% para 3 a 5 antibióticos e 10% para 6 a 8 antibióticos, simultaneamente.

4- Discussão

Os resultados referentes às contagens de SCP são semelhantes aos encontrados por outros autores que também avaliaram os índices de SCP em queijos comercializados em algumas regiões do país, como por exemplo, Sena (2000) que verificou contagens variando de 10^3 a 10^7 UFC/g em queijos de coalho em Recife, Peresi et al. (2001) que relataram contagens de 10^3 a 10^6 em queijos Minas frescal em São José do Rio Preto e Barbosa et al. (2004) que encontraram contagens de 10^3 a 10^6 UFC/g em queijos de coalho comercializados em Teresina.

Com relação à legislação vigente (BRASIL, 2001) os resultados obtidos para as amostras de queijos de coalho analisadas neste estudo encontram-se fora dos padrões. Estes achados corroboram com os de Loguercio & Aleixo (2001) que ao analisarem amostras de queijo Minas frescal, verificaram que (96%) das amostra estavam em desacordo com o padrão legal. Da mesma forma, Hoffmann et al. (2002) também constataram que (100%) das amostras estavam fora dos padrões permitidos, assim como, Benevides & Telles (2002) constataram que 45% das amostras de queijos de coalho estavam impróprias para consumo

humano com relação a *S. aureus*. Cardoso & Araújo (2003) e Ribeiro de Sá (2003) também encontraram elevados índices de amostras de queijos fora dos padrões, demonstrando que geralmente o queijo de coalho apresenta-se impróprio para consumo.

O *S. aureus* é um patógeno responsável por intoxicações que resulta da ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas termoestáveis e pré-formadas (Su & Wong, 1997) e representa um risco sanitário quando níveis desta bactéria atingem contagens em torno de 10^5 a 10^6 UFC/g ou mL do alimento (Gelli et al. 1986; Jablonski & Bohach 1997). Neste estudo, (60%) das amostras de queijos de coalho apresentaram contagens de SCP de 10^5 a 10^6 UFC/g o que indica que estes produtos poderiam conter toxinas pré-formadas e serem veículos de intoxicações alimentares, principalmente por estas cepas de estafilococos terem apresentado em seu genoma genes toxigênicos.

Através das técnicas de Sensibilidade Ótima em Placa (OSP) e ELISA (Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay), Sena (2000) constatou a produção das toxinas SEA, SEB, SEC, SED e TSST-1 em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de queijos de coalho em Recife, Pernambuco. Em Minas Gerais, usando as mesmas técnicas, Carmo et al. (2002) encontraram as toxinas SEA, SEB e SEC em cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de queijos suspeitas de envolvimento em casos de intoxicação alimentar, da mesma forma que Veras et al. (2003), só que em isolados de amostras de leite e derivados.

Não só no Brasil, mas principalmente em outros países do mundo a presença das toxinas estafilocócicas clássicas já foi relatada, como por exemplo, Jorgensen et al. (2005) e Loncarevic et al. (2005) que através da técnica de RPLA (Reversed Passive Látex Agglutination) detectaram a presença das toxinas (SEA, SEB e SEC) e (SEC e SED), respectivamente, em cepas de *S. aureus* de leite e derivados na Noruega e Normanno et al.

(2005) que utilizaram a mesma técnica e observaram as toxinas SEB, SEC e SED em cepas de *S. aureus* isoladas de queijos na Itália.

Como visto anteriormente, no Brasil, as principais técnicas empregadas no diagnóstico das toxinas estafilocócicas são os métodos de OSP e ELISA. Em outros países além destas técnicas e da técnica de RPLA, que são aplicadas na detecção das toxinas clássicas, a técnica de PCR tem sido uma valiosa ferramenta no diagnóstico de cepas de *S. aureus* portadoras de genes toxigênicos em alimentos (Nájera-Sánchez et al. 2003; Ercolini et al. 2004; Blaiotta et al. 2004; Cremonesi et al. 2005), casos de mastite (Omoe et al. 2002; Cabral et al. 2004; Silva et al. 2005) e surtos de doenças de origem alimentar (Asao et al. 2003; Chen et al. 2004; Martín et al. 2004; Omoe et al. 2005), permitindo a estes e outros pesquisadores detectarem genes para as toxinas TSST-1, ETA, ETB, genes para as toxinas clássicas SEA a SEE, assim como, genes para as toxinas recentemente descritas como SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SER e SEU e genes para outras toxinas que ainda podem ser descobertas.

Ao utilizar-se a técnica de PCR neste estudo verificou-se que (90%) das cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijos de coalho comercializados em Pernambuco, portavam genes toxigênicos que codificam para as toxinas TSST-1, SEC, SED, SEG, SEH, SEI e SEJ. Estes achados demonstram que tais resultados apresentam-se semelhantes aos encontrados no Brasil com relação às toxinas clássicas, pois foi verificada a presença de cepas de *Staphylococcus* spp. que portavam os genes *sec*, *sed* e *tst* que teriam todo o material genético para a produção de tais toxinas *in vitro*.

Com relação aos genes para as toxinas clássicas, observou-se a presença dos genes *sec* e *sed* entre as cepas de *Staphylococcus* isoladas de queijos de coalho. Alguns estudos vêm demonstrando que SEC e SED estão associadas com contaminação animal, enquanto

SEA e SEB com contaminação humana (Bergdoll 1990; Rodrigues et al. 1993; Vernozy-Rozand et al. 1996; Un Lee et al. 1998).

Jorgensen et al. (2005) constataram que (69%) das cepas de *S.aureus* portavam os genes toxigênicos *tst*, *sea*, *sec*, *seg*, *seh* e *sei* e Loncarevic et al. (2005) que (34%) das cepas continham os genes *seb*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *sei* e *sej*, sendo estes resultados condizentes aos encontrados neste estudo, exceto pela ausência dos genes *sea* e *seb*. E a presença do gene *see* não foi encontrada neste estudo e nem pelos autores acima citados.

Ao avaliar-se a presença dos genes *seg*, *seh*, *sei* e *sej* para as novas toxinas nos isolados de queijos de coalho, verifica-se que os genes mais prevalentes são *seg* e *sei*. Estes achados são similares aos de Loncarevic et al. (2005). Este fato é importante, pois tais cepas podem produzir as toxinas SEG e SEI e causarem intoxicação alimentar. Pois, ao utilizar a técnica de PCR para estudar os genes *seg*, *seh* e *sei* em cepas de *S. aureus* de indivíduos envolvidos em casos de doenças de origem alimentar, Chen et al. (2004) verificaram que em um dos pacientes a cepa de *S. aureus* isolada, apenas portava o gene *seg*, enquanto em outro paciente, a cepa portava apenas o gene *sei*, sendo ambas as cepas negativas para a produção das toxinas clássicas SEA-SEE e não portadoras dos genes *sea-see*. Este fato demonstra que as toxinas mais recentes descobertas como SEG e SEI podem ser responsáveis por casos de intoxicação alimentar, só que com menor frequência.

A resistência antimicrobiana apresentada por microrganismos isolados de alimentos também é outro fator preocupante para a saúde pública. No presente estudo foi encontrado um baixo percentual de resistência entre as cepas de *Staphylococcus* spp. avaliadas., no entanto, as cepas que foram resistentes apresentaram multiresistência elevada e os antibióticos menos eficazes foram a estreptomicina e a penicilina. Trabalhos realizados por Sena (2000), Peresi et al. (2001) e Rapini et al. (2003, 2004) com cepas de *Staphylococcus*

spp. isoladas de queijos verificaram altos índices de resistência à penicilina e também de multiresistência. A resistência à estreptomicina e à penicilina, pode ter ocorrido devido ao uso da associação penicilina+estreptomicina no tratamento de animais produtores de leite com infecções por microrganismos sensíveis a estes antibióticos.

5. Conclusão

Através deste estudo, observou-se que os genes *se* mais freqüentes em cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, isoladas de amostras de queijos de coalho foram *sei* e *seg*. A presença de alto percentual de cepas contendo seis diferentes genes toxigênicos, isoladas de amostras de queijos de coalho, que apresentaram contagens elevadas de estafilococos, é preocupante para a saúde do consumidor, pela possibilidade de produzirem toxinas responsáveis por intoxicações alimentares. A presença de cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa portadoras de grande diversidade genética para os genes *se* é outro importante fato, uma vez que no Brasil não há portarias que determinem limites para *Staphylococcus* coagulase negativa em alimentos.

6- Agradecimentos

Ao Banco do Nordeste do Brasil pelo financiamento do projeto e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida ao primeiro autor. Agradecem também ao Laboratório de Enterotoxinas Estafilocócicas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG) e ao Dr. Luiz Simeão do Carmo por ter cedido as cepas padrões FRI (Food Research Institute Madison, Wiscosin, EUA).

Tabela 1 – Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijos de coalho no Estado de Pernambuco, Brasil

I	Procedência	Contagem UFC/g	D	Característica das Colônias
Q01	São Bento do Una	$1,7 \times 10^5$	-4	Típica
Q02			-4	Atípica
Q03	Venturosa	$3,1 \times 10^5$	-4	Típica
Q04			-4	Atípica
Q05	Venturosa	$2,3 \times 10^5$	-4	Atípica
Q06			-4	Típica
Q07	Venturosa	$2,1 \times 10^4$	-3	Atípica
Q08	Cabo de Santo Agostinho	$8,3 \times 10^2$	-2	Típica
Q09			-2	Típica
Q10	Pombos	$2,1 \times 10^4$	-3	Típica
Q11			-3	Típica
Q12			-3	Atípica
Q13	Igarassu	$6,8 \times 10^5$	-4	Típica
Q14			-4	Típica
Q15	Camaragibe	$1,1 \times 10^6$	-3	Típica
Q16			-3	Típica
Q17	Arruda	$5,4 \times 10^5$	-2	Típica
Q18			-3	Típica
Q19	Alagoinha	$6,0 \times 10^3$	-2	Típica
Q20			-3	Típica

D – Diluição utilizada; I – Identificação das cepas de *Staphylococcus* spp.

Tabela 2 – *Primers* usados para a detecção por PCR dos genes *sea-see*, *seg-sej*, *tst*, *eta* e *etb* em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de queijos de coalho no Estado de Pernambuco, Brasil

Gene	Primer	Seqüência de Oligonucleotídeos (5' → 3')	Tamanho do Fragmento (pb)
* <i>sea</i>	SEA-3b	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG	127
	SEA-4b	TCT GAA CCT TCC CAT CAA AAA C	
* <i>seb</i>	SEB-1c	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	477
	SEB-4b	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	
* <i>sec</i>	SEC-3b	CTC AAG AAC TAG ACA TAA AAG CTA GG	271
	SEC-4b	TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	
* <i>sed</i>	SED-3b	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT TAA ACG	319
	SED-4b	TTA ATG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC	
* <i>see</i>	SEE-3b	CAG TAC CTA TAG ATA AAG TTA AAA CAA GC	178
	SEE-2c	TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	
* <i>tst</i>	TST-3	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG	445
	TST-6	ATCGAACTTTGGCCCATACTTT	
* <i>eta</i>	ETA-3b	CTAGTGCATTTGTTATTCAAGACG	119
	ETA-4b	TGCATTGACACCATAGTACTTATTC	
* <i>etb</i>	ETB-3b	ACG GCT ATA TAC ATT CAA TTC AAT G	262
	ETB-4b	AAA GTT ATT CAT TTA ATG CAC TGT CTC	
** <i>seg</i>	SEG-1	ACGTCTCCACCTGTTGAAGG	400
	SEG-2	TGAGCCAGTGTCTTGCTTTG	
** <i>seh</i>	SEH-1	TCACATCATATGCGAAAGCAG	357
	SHE-2	TAGCACCAATCACCCCTTTC	
*** <i>sei</i>	SEI-1	GGTGATATTGGTGTAGGTAAC	454
	SEI-2	ATCCATATTCTTTGCCTTTACCAG	
** <i>sej</i>	SEJ-1	CAGCGATAGCAAAAATGAAACA	426
	SEJ-2	TCTAGCGGAACAACAGTTCTGA	

*Becker et al. 1998, **Rosec & Gigaud 2002 e ***Omoe et al. 2002

Tabela 3– Enzimas de restrição usadas para confirmação da identidade dos fragmentos dos genes *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sec*, *sed* e *tst* e padrão de restrição esperado

Gene	Tamanho do Produto Amplificado	Enzimas	Padrão de Restrição (tamanho das bandas)
<i>seg</i>	400 pb	<i>Rsa</i> I	296 pb + 104 pb
<i>seh</i>	357 pb	<i>Dra</i> I	218 pb + 139 pb
<i>sei</i>	454 pb	<i>Rsa</i> I	345pb + 109 pb
<i>sej</i>	426 pb	<i>Rsa</i> I	210 pb + 216 pb
<i>tst</i>	445 pb	<i>Dra</i> I	390 pb + 55 pb
<i>sec</i>	271 pb	<i>Rsa</i> I	198 pb + 73 pb
<i>sed</i>	319 pb	<i>Rsa</i> I	66 pb + 95 pb + 158 pb

pb – Pares de Bases

Tabela 4– Perfil de sensibilidade de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de queijos de coalho no Estado de Pernambuco, frente aos antibióticos testados

Antibiótico	S	I	R
Amoxicilina	50%	10%	40%
Enrofloxacina	95%	5%	0%
Estreptomicina	15%	20%	65%
Cloranfenicol	95%	0%	5%
Sulfa+Trimetoprim	100%	0%	0%
Cefalexina	95%	0%	5%
Norfloxacina	90%	5%	5%
Vancomicina	100%	0%	0%
Eritromicina	85%	10%	5%
Penicilina	35%	0%	65%
Oxacilina	90%	0%	10%
Neomicina	80%	10%	10%
Gentamicina	90%	0%	10%
Clindamicina	85%	5%	10%
Bacitracina	85%	0%	15%

S – Sensível, I – Intermediário, R – Resistente

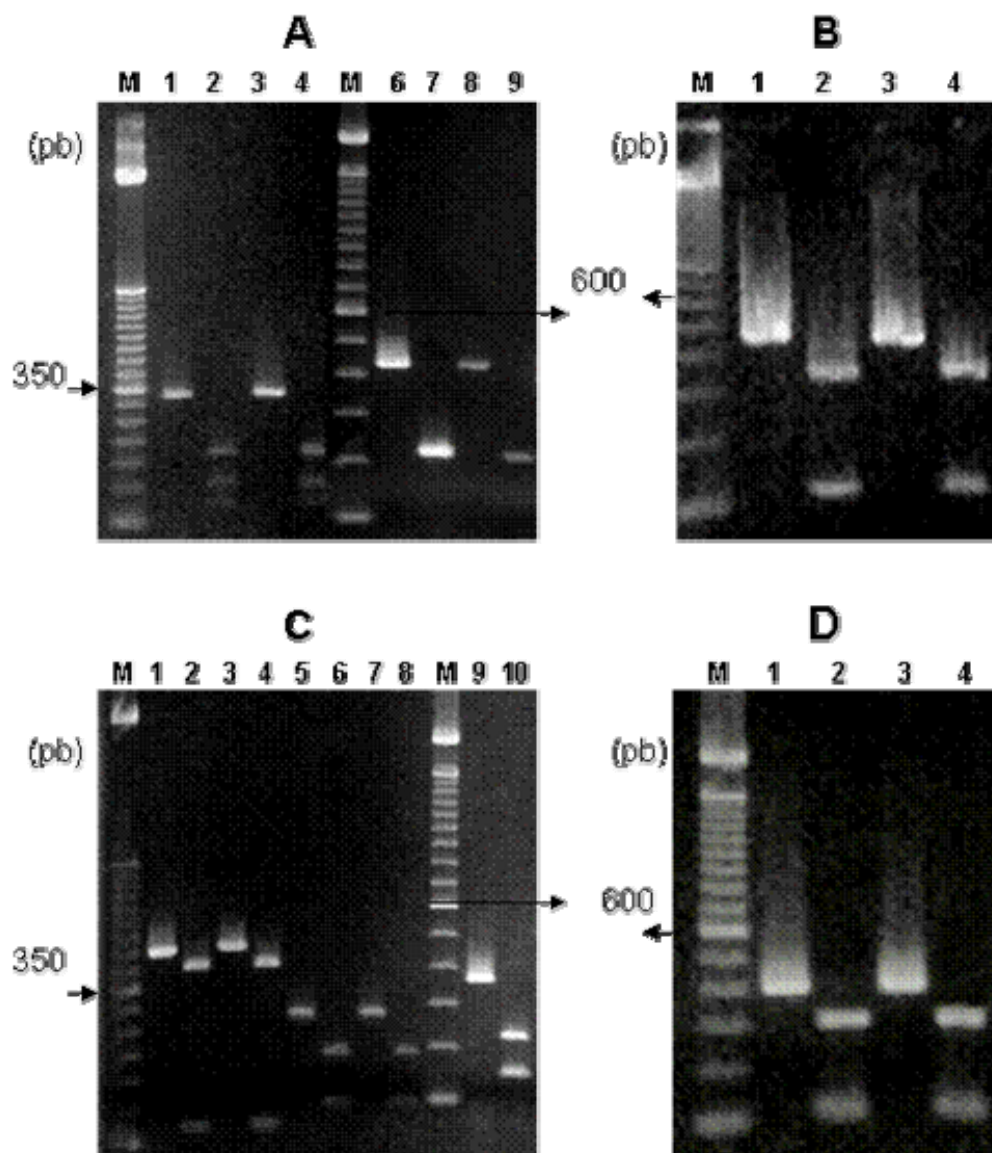


Figura 1 – Produto de amplificação da PCR dos genes *sed*, *sej*, *sei*, *tst*, *sec*, *seh* e *seg* (A, linhas: 1 e 3, gene *sed*; A, linhas: 6 e 8, gene *sej*; B, linhas: 1 e 3, gene *sei*; C, linhas: 1 e 3, gene *tst*; C, linhas: 5 e 7, gene *sec*; C, linha: 9, gene *seh*; D, linhas: 1 e 3, gene *seg*) e seus padrões de restrição com as enzimas, *RsaI* (A, linhas: 2 e 4, gene *sed*; A, linhas: 7 e 9, gene *sej*; B, linhas: 2 e 4, gene *sei*; C, linhas: 6 e 8, gene *sec*; D, linhas: 2 e 4, gene *seg*) e *DraI* (C, linhas: 2 e 4, gene *tst*; C, linha: 10, gene *seh*)

7- Referências Bibliográficas

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myres EW, Lipman DJ 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.

Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* 130, 33-40.

Barbosa SS, Trajano HMR, Santos HS, Muratori MCS, Lima FL 2004. Detecção de *Staphylococcus* sp em queijos de coalho adquiridos em Teresina-Piauí. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia dos Alimentos-CBCTA, 2004, Recife, Pernambuco. *XIX CBCTA Ciência e Tecnologia dos Alimentos: estratégias para o desenvolvimento*. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos-SBCTA, 2004. 1 CD-ROM.

Bauer MD, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493-496.

Benevides SD, Telles FJS 2002. Características microbiológicas, de armazenamento e de embalagem de queijos tipo “coalho” comercializados na cidade de Fortaleza, CE. *Higiene Alimentar.* 16, 44-47.

Bergdoll MS 1990. Staphylococcal food poisoning. In H. Riemman and F. L. Bryan. *Foodborne infections and intoxications*. Academic Press, New York. p. 85-106.

Blaiotta G, Ercolini D, Pennacchia C,; Fusco V, Casaburi A, Pepe O, Villani F 2004. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of *seG* and *seI* in *S. aureus* AB-8802. *J. Appl. Microbiol.* 97, 719-730.

Brasil 2001. Ministério da Saúde. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução-RDC, nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 2 de janeiro de 2001. Seção I, p. 45-53.

Brasil 2003. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 18 de setembro 2003. Seção I, p. 21-32; 40-43;51-67.

Buyser MLD, Dufour B, Maire M, Lafarge V 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.

Cabral KG, Lämmle C, Zschöck M,; Langoni H, De Sá MEP, Victória C, Da Silva AV 2004. Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo state, Brazil. *Can. J. Microbiol.* 50, 901-909.

Carmo LS, Dias RS, Linardi VR, Sena MJ, Santos DA, Faria ME, Pena AEC, Jett M, Heneine LG 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.* 14, 9-14.

Cardoso L, Araújo WMC 2003. Parâmetros de qualidade em queijos comercializados no Distrito Federal no período de 1997-2001. *Higiene Alimentar.* 17, 32.

Chen TR, Chiou CS, Tsen HY 2004. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 189-197.

Cremonesi P, Luzzana M, Brasca M, Morandi S, Lodi R, Vimercati C, Agnellini D, Caramente G, Moroni P, Castiglioni B 2005. Development of multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol. Cell. Probes.* 19, 299-305.

Ercolini D, Blaiotta G, Fusco V, Coppola S 2004. PCR-based detection of enterotoxin *Staphylococcus aureus* in the early stages of raw milk cheese making. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1090-1096.

Gelli DS, Martins MC 1986. *Staphylococcus aureus* produtor de termonuclease em alimentos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 46, 103-109.

Hoffmann FL, Silva JV, Vinturim TM 2002. Qualidade microbiológica de queijos tipo “Minas Frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. *Higiene Alimentar*. 16, 69-76.

Holecková B, Holoda E, Fotta M, Kalinacová V, Gondol J, Grolmus J 2002. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann. Agric. Environ. Med.* 9, 179-182.

Huang X, Maddan A 1999. Cap3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9, 68-877.

Jablonski LM, Bohach GA 1997. *Staphylococcus aureus*. In Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. American Society of Microbiology Press, Washington. p. 353-375.

Jorgensen HJ, Mork T, Hogasen HR, Rorvik LM 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *J. Appl. Microbiol.* 99, 158-166.

Loguercio AP, Aleixo JAG 2001. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. *Cienc. Rural*. 31, 1063-1067.

Loncarevic S, Jorgensen HJ, Lovseth A, Mathisen T, Rorvik LM 2005. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. *J. Appl. Microbiol.* 98, 344-350.

Maniatis T, Frisch E, Sambrook J 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

Martín MC, Fueyo JM, González-Hevia MA, Mendoza MC 2004. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 279-286.

Nájera-Sánchez G, Maldonado-Rodríguez R, Olvera PR, Garza LM 2003. Development of two multiplex polymerase chain reactions for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *J. Food Prot.* 66, 1055-1062.

Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Mioni R, Scuota S, Bolzoni G, Di Giannatale E, Salinetti AP, LaSalandra G, Bartoli M, Zucconi F, Pirino T, Sias S, Parisi A, Quaglia NC, Celano GV 2005. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 73-79.

Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S, Shinagawa K 2002. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh* or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* 40, 857-862.

Omoe K, Hu DL, Omoe HT, Nakane A, Shinagawa K 2005. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 191-198.

Pereira ML, Do Carmo LS, Dos Santos EJ, Pereira JL, Bergdoll, MS 1996. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. *J. Food Prot.* 59, 559-561.

Pereira KS, Pereira JL 2005. Estafilococos coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos. *Higiene Alimentar.* 19, 32-34.

Peresi JTM, Graciano RAS, Almeida IAZC, Lima SI, Ribeiro AK, Carvalho IS 2001. Queijo minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. *Higiene Alimentar.* 15, 63-70.

Rapini LS, Teixeira JP, Martins NE, Guimarães MP, SLMP, Cerqueira MMOP 2003. Perfil antimicrobiano de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas do leite cru de cabra, queijo e manipuladores. *Higiene Alimentar.* 17, 162.

Rapini LS, Teixeira JP, Martins NE, Cerqueira MM, Souza MR, Penna CFAM. 2004. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56, 130-133.

Ribeiro De Sá MA, Silveira EA, Lagares DPB, Santos SE 2003. Perfil microbiológico do queijo minas frescal comercializado no município de Uberlândia-MG. *Higiene Alimentar*. 17, 169.

Ritter R, Santos D, Bergmann GP 2001. Análise da qualidade microbiológica de queijo colonial, não pasteurizado, produzido e comercializado por pequenos produtores, no Rio Grande do Sul. *Higiene Alimentar*. 15, 51-55.

Rodrigues LA, Solino L, Diaz M, Bergdoll MS 1993. Selective enterotoxin production in foods by *Staphylococcus aureus* strains that produce more than one enterotoxin. *J. Food Prot.* 56, 538-540.

Rosec JP, Gigaud O 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.* 77, 61-70.

Santos EC, Nogueira NAP, Cunha GMA 1995. Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza, CE. *Boletim CEPPA*. 13, 31-36.

Sena MJ, Cerqueira MMOP, Santos DA, Leocradio Filho G, Dias RS 1999. Salmonelas isoladas de queijos tipo coalho: caracterização sorológica e resistência a agentes antimicrobianos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 58, 13-17.

Sena MJ 2000. *Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus sp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE*. 75p Tese de Doutorado. Escola Veterinária: Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte, 2000.

Silva ER, Carmo LS, Silva N 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.

Su YC, Wong ACL 1997. Current Perspectives on Detection of Staphylococcal Enterotoxins. *J. Food Prot.* 60, 195-202.

Un Lee S, Quesnell M, Fox LK, Won Yoon J, Ho Park Y, Davis WC, Flak D, Deobald CF, Boahch GA 1998. Characterization of staphylococcal bovine mastitis isolates using the polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* 61, 1384-1386.

Veras JF, Santos DA, Carmo LS, Fernandes TMG, Azali C, Silva MCC, Martins RT, Cerqueira MMOP 2003. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. *Higiene Alimentar.* 17, 218.

Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Prevost G, Lapeyre C, Bes M, Brun Y, Fleurette J 1996. Enterotoxin production by coagulase – negative staphylococci isolated from goat's milk and cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 271-280.

Witte W 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *Int. J. Antimicrobiol. Agents*. 14, 321-325.

6 – CONCLUSÕES GERAIS

A mastite subclínica foi mais prevalente nos rebanhos leiteiros da região Agreste do Estado de Pernambuco em relação à mastite clínica;

Staphylococcus spp. e *Corynebacterium* spp. foram os microrganismos mais prevalentes isolados de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica na região Agreste do Estado de Pernambuco;

Os antibióticos mais eficazes para as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica foram vancomicina e enrofloxacin e o menos eficaz foi a penicilina;

Houve alto índice de multiresistência entre as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica na região Agreste do Estado de Pernambuco;

Foram encontrados dois perfis genotípicos através da técnica de PCR-RFLP entre as cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina subclínica na região Agreste do Estado de Pernambuco;

A tipagem molecular permitiu compreender o padrão de dispersão dos *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina;

Um alto percentual de amostras de queijos de coalho, comercializadas no Estado de Pernambuco, estavam fora dos padrões estabelecidos pela legislação vigente em relação à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva.

As cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de queijos de coalho comercializadas no Estado de Pernambuco apresentaram baixo percentual de resistência aos antibióticos, porém alta multiresistência;

A presença dos genes *sec*, *sed*, *tst*, *seg*, *sei* e *sej* foi detectada em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de queijos de coalho comercializadas no Estado de Pernambuco;

7 – ANEXOS

ANEXO 1

Original Message -----

From: [elizabeth oliveira da costa](#)

To: [Cristina](#)

Sent: Wednesday, October 26, 2005 4:31 PM

Subject: Re: Ref NAPGAMA: Estudo Epidemiológico Molecular de *Staphylococcus aureus* associados à Mastite bovina provenientes do estado de Pernambuco, Brasil.

São Paulo 26 de outubro de 2005

Prezada Dra Tereza Cristina Leal-Balbino

Acusamos o recebimento de seu e-mail e aproveitamos a oportunidade para comunicar que o referido trabalho já foi submetido à apreciação do corpo editorial da revista Napgama e recebeu parecer favorável de ambos referees que o analisaram, estando portanto aceito para a publicação. Esclaremos que por ocasião da publicação será atendida a correção quanto aos nomes dos autores e inclusão do autor: Isabelle da Silva Luz - Pibic/Fiocruz.

Sem mais reiteramos nosso apreço,

Elizabeth Oliveira da Costa

Editora Científica da Revista Napgama

ANEXO 2

Veterinary Microbiology**Guide for Authors****Types of contribution**

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor
5. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal. Of particular interest are topical, short (Mini) Reviews in areas of current interest. Instructions for the preparation of such articles are available from the Reviews Editor J. Glenn Songer (gsonger@u.arizona.edu). Prior to submitting Review papers, authors should discuss the proposed content with the Reviews Editor.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 6 printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editor-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old.

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Microbiology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetmic>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to: AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the

review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Microbiology*.

Any new nucleotide or amino acid sequence data will be deposited in publically accessible databases, such as GenBank, and the accession numbers will be included in the manuscript (Methods section) before it is finally accepted for publication. In addition, it is expected that any plasmids, transposons, viruses, microbial strains, or cell lines described for the first time in the paper will made available to scientists for non-commercial purposes at reasonable cost following publication.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: [Elsevier's Author Gateway](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions http://authors.elsevier.com/terms_and_conditions.html?dc=TANDC.

2. Manuscripts should have **(numbered lines)** with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered.** However, in the text no reference should made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and E-mail of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3 - 6 items. Please refer to the cumulative index.

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s))

4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

5. SI units should be used.

6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

Manuscripts of original research papers should include a structured Abstract of 250 or fewer words, organised under the sections: Problem addressed; Objective; Methods and approach; Results; Conclusions. Do not actually include section headings, but use this structure for the Abstract.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.

5. Each table should have a brief and self-explanatory title.

6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.

2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.

3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible, any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.

5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.

6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a

separate sheet of the manuscript.

7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.

8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.

10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL:

<http://www.authors.elsevier.com/artwork>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect:

<http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit the [journal's home page](#) and click on the right-hand side link to the Author Gateway.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. For original research papers, the list should not exceed 35 references (it may be longer for review articles).

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed- if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp.12-16)".

3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates -publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals

Chin, J.C., Dai, Y., Watts, J.E., 1995. Antibody response against *Pseudomonas aeruginosa* membrane proteins in experimentally infected sheep. *Vet. Microbiol.* 43, 21-32.

b. For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical

Caffrey, J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R., Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), *Bovine Tuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 1-4.

c. For books

Armitage, P., Berry, G., 1987. *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 94-100, 411-416.

d. For multi-author books

Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), *The Ruminant Immune System*, Plenum Press, New York, pp. 3-55.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references; according to the *International List of Periodical Title Word Abbreviations*. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Microbiol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .

6. Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .

7. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.

2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Philadelphia, PA, USA: phone (+1) 215 239 3804, fax (+1) 215 239 3805, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/locate/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy.

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Proofs

One set of proofs will be sent by e-mail to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. **Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication.** Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints

1. Twenty-five offprints will be supplied free of charge (100 for Review Articles).
2. Additional offprints can be ordered on an offprint order form, which is included with the proofs.
3. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra offprints.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs, should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's Author Gateway. For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Veterinary Microbiology has no page charges

ANEXO 3

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Objetivos e política editorial](#)
- [Formato e estilo](#)
- [Checklist para os manuscritos](#)

Objetivos e política editorial

As **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** são uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão só quando solicitados. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são aparecem como suplementos.

Os artigos apresentados devem ser escritos preferencialmente em inglês. Quando neste idioma, devem ser checados por alguém que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, seja um cientista da área.

A submissão de um manuscrito às **Memórias** requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação.

Todo o material deve ser enviado para a Produção Editorial, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Av. Brasil 4365, Pavilhão Mourisco, sala 308, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ,

Brasil.

Os manuscritos que não estiverem de acordo com estas instruções serão imediatamente devolvidos.

Ao encaminhar um manuscrito para a revista, os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as **Memórias**. A revista não recusará as solicitações legítimas dos autores para reproduzir seus trabalhos.

Favor providenciar e checar cada item abaixo antes de submeter seu manuscrito para as **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**:

- Carta de submissão do trabalho, assinada por todos os autores, especificando o autor de contato, bem como endereço, telefone, fax e e-mail.
- Quatro cópias completas do artigo, incluindo as ilustrações e um disquete contendo o texto, tabelas, gráficos e fotografias digitalizadas.
- O manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, impresso em papel padrão e paginado. As margens devem ser de pelo menos 3 cm.
- A seqüência do artigo deve ser: **título resumido** (com até 40 caracteres - letras e espaços), **título** (com até 250 caracteres), **autores** (sem títulos ou graduação), **afiliação institucional** (endereço completo somente do autor correspondente), **resumo**, **palavras-chave**, **notas de rodapé** indicando a fonte de financiamento ou mudanças de endereço, **introdução**, **material e métodos**, **resultados**, **discussão**, **agradecimentos** (os mínimos necessários), **referências**, **tabelas** (fora do texto e com título), e **figuras** (com legendas em folha separada).
- Só as referências citadas no texto devem aparecer nas lista e devem seguir o estilo do Index Medicus. Se a referência for de artigo ainda não publicado, mas já aceito, deverá ser apresentada carta da revista que publicará o manuscrito ou de outros autores autorizando a referida citação.

Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou entrar em contato com a Editoria Científica pelo telefone (+55-21-2598.4335), fax (+55-21-2561.1442 / 2280-5048), ou e-mail (memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br)

Formato e estilo

O manuscrito deve ser organizado de acordo com a seguinte ordem: título corrente, título, nomes dos autores, afiliações institucionais, resumo, palavras-chave, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, agradecimentos e referências. Patrocínios devem ser mencionados em nota de rodapé na primeira página.

Resumo: Com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves), o resumo deve apresentar os objetivos do estudo ou pesquisa, seus procedimentos básicos (seleção dos temas de estudo ou animais de laboratório; métodos analíticos ou de observação), as principais descobertas ou resultados (oferecendo dados específicos e seu significado estatístico, se possível), e as principais conclusões. Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: Devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do *Index Medicus*.

Introdução: Deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, e especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e métodos: Deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: Ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983. Não citar os nomes ou iniciais dos pacientes ou registros de hospitais, especialmente nos materiais ilustrativos. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais, ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: Devem oferecer uma descrição concisa das novas

informações descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: Deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: Devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: Devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do primeiro autor.

Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no *Index Medicus*. Consultar a List of Journals Indexed no *Index Medicus* publicada no número de janeiro do *Index Medicus* ou no website <http://www.nlm.nih.gov/serials/lii.html>.

- No texto, usar o sobrenome dos autores e a data:

Lutz (1910) ou (Lutz 1910).

Com dois autores, a forma é

(Lutz & Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912).

Quando há mais que dois autores, somente o primeiro é mencionado:

Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

- No final do trabalho, usar os seguintes estilos:

Artigo de revista

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da tripanosomiase americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 14: 15-61.

Livro ou Tese

Morel CM 1983. *Genes and Antigens of Parasites*. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Capítulo de livro

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, *The Prevention of Malaria*, John Murray, London. p. 390-398.

Ilustrações: As ilustrações devem ser limitadas ao mínimo necessário para exemplificar estruturas ou condições particulares, para sintetizar dados ou para registrar resultados quantitativos. Detalhes de resultados apresentados nessa forma não devem ser repetidos no texto. Figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

- **Figuras** devem ser apresentadas em uma folha de mesmo tamanho que as do manuscrito. As fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante. As fotografias e os desenhos devem ser marcados no verso com o nome do autor, o número da figura e uma seta indicando a parte de cima da ilustração. Se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (7 cm) ou na largura completa (14.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As legendas devem ser encaminhadas em uma folha separada. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Por outro lado, uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de **Memórias**, e os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa sem custos para

os autores.

- **Tabelas** devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas de rodapé (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

Comunicações breves devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que quatro páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do texto, usando o mesmo formato para artigos originais. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

Formato alternativo: Os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (*Annals of Internal Medicine* 1997; 126: 36-47, ou no website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>), sendo responsáveis por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções.

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

- um disquete contendo o texto completo da versão final aprovada do manuscrito (incluindo tabelas e gráficos), processado em um editor de texto como Word ou Word Perfect para Windows (formato Macintosh deverá ser convertido);

- uma declaração assinada por todos os autores afirmando que:

- (i) todos os dados contidos no trabalho são precisos;
- (ii) todos os autores participaram do trabalho de forma substancial e estão preparados para assumir responsabilidade pública pelo seu conteúdo;
- (iii) o manuscrito ora apresentado a essa revista não está sendo

publicado no todo ou em parte por outra revista, assim como não está sendo encaminhado para outra publicação. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração;

- uma declaração de copyright fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor responsável pela correspondência.

Taxas: A revista não cobra taxas para publicação.

Provas: Serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.

Separatas: Os autores receberão 30 separatas gratuitamente. Junto, um formulário de pedidos e uma lista de preços serão enviados aos autores, permitindo que novas separatas sejam solicitadas.

Checklist para os manuscritos

Os autores devem verificar cada um dos itens abaixo antes de enviar seus manuscritos a **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.

- Incluir uma carta de apresentação assinada por todos os autores, junto com o manuscrito, especificando o nome do autor que será responsável pela correspondência, assim como endereço, números de telefone e fax, e e-mail.
- Enviar quatro cópias do manuscrito (original mais três cópias), cada uma acompanhada de um jogo completo de ilustrações.
- Todo o manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser digitado em espaço duplo, usando fonte tamanho 12, e impresso em folhas de papel de tamanho padrão. Margens esquerdas e direitas devem ser de pelo menos 3 cm.
- As páginas devem ser numeradas a partir da página de rosto.
- A página de rosto deve incluir um cabeçalho com no máximo 40 letras e espaços, um título de no máximo três linhas impressas (250 letras e espaços), nomes dos autores (não citar títulos ou graus), afiliações institucionais, endereço completo do autor

responsável pela correspondência, e notas de rodapé indicando as fontes de recursos financeiros e mudanças de endereço.

- A ordem de apresentação do material em todos os manuscritos deve ser a seguinte: cabeçalho, título, autores, afiliações institucionais, resumo, palavras-chave, notas de rodapé, introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, agradecimentos, referências, tabelas, legendas para as figuras, e figuras.
- As referências devem ser citadas no texto entre parênteses, por exemplo, (Chagas 1909). As referências não citadas no texto não podem aparecer na seção de referências. As referências bibliográficas devem seguir o formato estabelecido pelo "Index Medicus and Biological Abstract" (veja exemplos em [Formato e estilo](#)).
- Se um trabalho não publicado de autoria de um dos autores do manuscrito for citado (ou seja, um artigo "in press"), será necessário incluir a carta de aceitação da revista que publicará o referido artigo.
- Se dados não publicados pertencentes a outros pesquisadores forem citados pelo manuscrito, será necessário incluir uma carta de autorização dos respectivos autores dos referidos dados.
- Incluir quatro impressões de cada figura em papel fotográfico ou produzidas por laser. Identificar todas as figuras com o nome do primeiro autor e o número da figura (por meio de uma etiqueta auto-adesiva datilografada e colada no verso da figura). Incluir uma legenda para cada figura. As legendas devem ser apresentadas em folha separada no final do manuscrito.
- As tabelas também devem ser apresentadas em folhas separadas no final do manuscrito. Um título breve e descritivo deve encabeçar cada tabela.

Para outras informações, consultar as **Instruções aos Autores** publicadas no primeiro número de cada volume da revista.

[\[Home\]](#) [\[Sobre a revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)

© 1997-2005 **Fundação Oswaldo Cruz**

Av. Brasil, 4365
21040-900 Rio de Janeiro RJ Brazil
Tel.: +55 21 2598-4335
Fax: +55 21 2280-5048 / 2561-1442