

1636.089 69  
C268i  
1999

Heleno Fernandes Teles Cardoso

Identificação de fatores de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite bovino em Minas Gerais

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



14469901 0400

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

02/03/2006

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Nivaldo da Silva

Belo Horizonte  
UFMG-Escola de Veterinária  
1999

0263-13060

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

16/04/99

144699-01

C268i Cardoso, Heleno Fernandes Teles, 1966-

1999 Identificação de fatores de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite bovino em Minas Gerais / Heleno Fernandes Teles Cardoso. - Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 1999. 88p.: il.

Dissertação (Mestrado)-UFMG-Escola de Veterinária

1. Leite - Análise - Teses.
  2. Toxinas bacterianas - Teses
  3. Virulência - (Microbiologia) - Teses.
  4. Mastite - Teses.
- I. Título.

CDD: 636.214.089.69

Dissertação defendida e aprovada em 26/02/99, pela Comissão Examinadora constituída por:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Nivaldo da Silva  
Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Francisco Carlos Faria Lobato

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Antônio de Pinho Marques Júnior

  
\_\_\_\_\_  
Prof. José Britto Figueiredo

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Jacques Robert Nicoli

## DEDICAÇÃO

À Deus.

À minha mãe (*in memoriam*).

À minha família, especialmente à minha querida avó Elza.

À minha esposa.

Aos meus verdadeiros amigos.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Nivaldo da Silva pela amizade, pelos ensinamentos e por acreditar no meu trabalho.

Ao Dr. Luiz Simeão do Carmo pelo inestimável apoio e pela orientação da parte experimental no tocante às toxinas.

À Profa. Maria José de Sena e ao Prof. Geraldo Márcio da Costa pela grande ajuda na parte experimental.

Aos estagiários do laboratório da EV-UFMG e da FUNED pela ajuda na execução do experimento.

Aos professores, colegas e funcionários da EV-UFMG pela constante convivência e amizade.

À Nádia Maria da Silva pela amizade e ajuda na parte de informática.

Ao Hélder, Silene e funcionários do xerox, pela amizade e presteza na execução das fotocópias.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa.

À Fundação Mendes Pimentel.

À Fundação Ezequiel Dias.

À minha tia, Profa. Ana Maria Fernandes pela ajuda nos tempos de graduação e pelo exemplo de dedicação e competência.

Ao Dr. Sylo da Silva Costa pela ajuda nos tempos de segundo grau e pela grande amizade.

À tia Maria da Conceição de Oliveira Teles e primos por fazerem parte da minha vida.

*A sensação mais bela e mais profunda que podemos ter é a sensação do místico. É a precursora da verdadeira ciência. Aquele para quem esta emoção é desconhecida, está praticamente morto. A convicção profundamente emocional, da presença de um poder de raciocínio superior, que se revela no universo incompreensível, representa minha idéia de Deus.*

Albert Einstein

*Se fizeres o teu ouvido atento à sabedoria e inclinares teu coração ao entendimento;  
Se clamares por conhecimento e por inteligência alçares a tua voz;  
Se como a prata a buscares e como a tesouros escondidos a procurares;  
Então entenderás o temor do Senhor e acharás o conhecimento de Deus.  
Porque o Senhor dá a sabedoria, da sua boca é que vem o conhecimento e o entendimento.  
Ele reserva a verdadeira sabedoria para os retos, como escudo para os que caminham na sinceridade.  
Então entenderás a justiça, a equidade e todas as boas veredas.*

Salomão (Pr. 2:2)

**SUMÁRIO**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
RESUMO.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 LITERATURA CONSULTADA.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4 RESULTADOS.....	49
5 DISCUSSÃO.....	59
6 CONCLUSÃO.....	71
7 SUMMARY.....	73
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Ilustração</b>	<b>Descrição</b>	<b>P.</b>
1- Figura 1	Mapa de Minas Gerais com divisão municipal. As áreas em vermelho indicam os municípios onde foram coletadas as amostras de leite bovino.	43
2- Figura 2	Foto da reação da TNase em lâmina pelo método da difusão metacromática em ágar TDA. Os poços das extremidades indicam reação positiva.	44
3- Figura 3	Esquema do método da membrana sobre ágar para extração das SE's e TSST-1.	45
4- Figura 4	Esquema do Moldê FRI usado para perfuração dos poços em ágar nobre (medidas dadas em mm).	46
5- Figura 5	Foto da precipitação das toxinas frente ao antissoro em placas de ágar nobre (Método OSP).	47
6- Figura 6	Gráfico da distribuição das hemolisinas em ágar sangue ovino com incubação a 37° C por 24-48h, entre as 127 amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de leite bovino em Minas Gerais de 1994-97.	51
7- Figura 7	Gráfico da distribuição de toxinas desprezando-se as combinações, entre as 127 amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de leite bovino em Minas Gerais de 94-97.	54
8- Figura 8	Gráfico da distribuição das amostras hemolíticas e a percentagem destas que produziram toxinas, entre as 127 amostras de <i>S. aureus</i> isoladas de leite bovino em Minas Gerais no período de 1994-97.	57
9- Figura 9	Gráfico da distribuição de SE's entre as amostras de <i>S. aureus</i> , TSST-1 positivas e negativas, isoladas de leite bovino em Minas Gerais de 1994-97.	58

- 10-Tabela 1 Limites para interpretação do antibiograma com zonas de inibição dadas em milímetros. 39
- 11-Tabela 2 Susceptibilidade aos antimicrobianos testados, das 127 amostras de *S. aureus* isoladas de leite bovino em Minas Gerais no período de 1994-97. 50
- 12-Tabela 3 Distribuição da produção de toxinas isoladamente ou em combinação, entre as 127 amostras de *S. aureus* isoladas de leite bovino em Minas Gerais no período de 1994-97. 53
- 13-Tabela 4 Distribuição da produção de toxinas, desprezando-se as combinações, entre as 83 amostras toxigênicas de *S. aureus*, isoladas de leite bovino em Minas Gerais no período de 1994-97. 55

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BHI: Infusão de cérebro-coração  
CDC: "Centers for Disease Control and Prevention" (EUA)  
CNS: *Staphylococcus* coagulase negativo  
CPS: *Staphylococcus* coagulase positivo  
Da: Daltons  
DNA: Ácido desoxirribonucléico  
FDA: "Food and Drug Administration" (EUA)  
FRI: "Food Research Institute" (EUA)  
FUNED: Fundação Ezequiel Dias  
IMI: Infecções intramamárias  
LPS: Lipopolissacarídeos  
MHB: Caldo Müller-Hinton  
NMC: "National Mastitis Council" (EUA)  
OSP: Sensibilidade ótima em placa  
pI: Ponto isoeletrico  
PMN: Leucócitos neutrofilicos polimorfonucleares  
RNA: Ácido ribonucléico  
SE's: Enterotoxinas estafilocócicas  
SEA: Enterotoxina estafilocócica tipo A  
SEB: Enterotoxina estafilocócica tipo B  
SEC: Enterotoxina estafilocócica tipo C  
SED: Enterotoxina estafilocócica tipo D  
TDA: Ágar azul toluidina  
TNase: Termonuclease  
TSST-1: Toxina-1 da síndrome do choque tóxico  
USDA: "United States Department of Agriculture" (EUA)  
V/V: Volume por volume  
W/W: Peso por peso

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* produz uma larga variedade de fatores de virulência, que são relacionados à sua patogenicidade, além de oferecer grande resistência aos antimicrobianos existentes. Este microorganismo participa como agente infeccioso em importantes doenças, dentre elas a mastite. Neste trabalho foram identificados e testados 127 biotipos isolados de amostras de leite bovino, quanto a atividade enzimática: produção de coagulase e termonuclease; a toxigenicidade: produção de hemolisinas alfa, beta e delta; enterotoxinas (SE's) A-D e toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1); além de testar a susceptibilidade *in vitro* frente a vários antimicrobianos. Todas as amostras testadas apresentaram reação positiva para coagulase e termonuclease (100%) pelo teste em tubo e difusão metacromática respectivamente. As amostras apresentaram um alto índice de toxigenicidade, 86,6% delas apresentaram algum tipo de hemólise ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha/\beta$ ), em placas de ágar sangue ovino; 42,5% produziram algum tipo de SE e 47,2% produziram TSST-1, detectadas pelo método de imunodifusão (OSP). Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, pelo método de difusão em discos, revelaram sensibilidade a cefotaxima (100%), enrofloxacina (98,4%) e gentamicina (98,4%). Por outro lado, verificou-se resistência à polimixina-B (72,3%), penicilina (64,9%) e ampicilina (62,7%).

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*. toxinas, susceptibilidade a antimicrobianos, leite bovino.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil produz em torno de 20 milhões de toneladas de leite ao ano com um plantel de aproximadamente 20 milhões de vacas, contrastando com países desenvolvidos como os EUA, que produzem em torno de 70 milhões de toneladas, com apenas 10 milhões de vacas. Além desta baixa produtividade, mesmo quando comparada com outros países da América Latina, existe ainda a baixa qualidade deste leite, devido às formas antiquadas de produção e à falta de controle rígido de qualidade pelas indústrias. A mastite aparece como a principal doença responsável pela queda na produtividade e na qualidade do leite em todo o mundo.

Nos países desenvolvidos não é raro o relato de intoxicações causadas pela ingestão de leite e derivados, contaminados por alguma enterotoxina estafilocócica (Bergdoll, 1989; Wieneke et al., 1993). No Brasil já foram registrados 593.212 casos de intoxicação alimentar no período de 1984-1997 (Brasil, 1998), porém sem especificar as enterotoxinas, os microorganismos ou fontes envolvidas. Em geral, é considerado arriscado, beber leite pasteurizado no Brasil (Bergdoll, 1989). Por outro lado, são poucos os trabalhos sobre caracterização da produção de enterotoxinas de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite bovino. Além disto não se tem ainda um levantamento criterioso e representativo da frequência de amostras enterotoxigênicas.

O controle das mastites, feito através de antibioticoterapia, nas vacas em lactação, pode também ser considerado como um dos problemas em saúde coletiva do país e é ainda relegado pelas autoridades e por grande parte da própria indústria de laticínios.

Os produtores lançam mão de tratamento com antibióticos em seus animais, na maioria das vezes sem nenhum acompanhamento ou critério técnico, com grande chance de insucesso e de perpetuamento do problema, na manutenção das mastites, no tratamento indiscriminado com antibióticos e no consumo de produtos lácteos com resíduos destas drogas, por parte da população.

O objetivo deste trabalho foi identificar alguns fatores de virulência como a produção de exotoxinas e algumas enzimas, além de testar a susceptibilidade frente a vários antimicrobianos, de 127 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite bovino, oriundo de 23 municípios do Estado de Minas Gerais.

## 2 LITERATURA CONSULTADA

### 2.1- Caracterização do agente

*Staphylococcus aureus* são cocos gram-positivos com 0,5-1 µm de diâmetro, anaeróbios facultativos, não esporulados, imóveis, catalase, coagulase e termonuclease positivos (Kloos & Lambe Jr, 1991). Estas bactérias, habitantes naturais da pele e mucosas de mamíferos, são causadoras de várias doenças no homem e nos animais. No homem, *S. aureus* está relacionado às infecções cutâneas e de mucosas, infecções septicêmicas que geralmente estão associadas a infecções viscerais ou ósseas (Anderson, 1983), além de ser a causa mais comum de intoxicações alimentares, pela presença de suas enterotoxinas em alimentos. (Bergdoll, 1996; Ichikawa et al., 1996). Sendo também freqüente em infecções hospitalares (Lee, 1996). Nos animais domésticos, além das doenças descritas para o homem, *S. aureus* está principalmente envolvido em infecções intramamárias (IMI) de fêmeas em lactação (Anderson, 1983; Owens et al., 1993).

### 2.2- Importância das mastites

A mastite é a doença mais importante dos rebanhos leiteiros em todo o mundo (Owens et al., 1993), responsável por grandes perdas na produção, acarretando sérios prejuízos aos produtores e a toda economia de um estado ou país. Estimativas de perdas apenas em produção de leite nos EUA são de aproximadamente dois bilhões de dólares ao ano (Well & Ott, 1996). As perdas na produção de leite alcançam de 03 a 46% do total da produção, de acordo com grau de intensidade do processo inflamatório e o estágio de

lactação no qual a infecção ocorre (Anderson, 1983). Além disso, as perdas na produção chegam a 70% do total dos custos com a mastite, onde também se incluem os gastos com antibióticos, descarte de leite, descarte prematuro de animais, trabalho extra, reposição de animais e o decréscimo na qualidade do leite, causando sensíveis mudanças em sua composição, afetando as propriedades de processamento e a qualidade dos produtos lácteos. As mastites causam decréscimo de gordura, proteína, lactose, cálcio e magnésio; provocam aumento de ácidos graxos livres, contribuindo para rancificação do leite e seus produtos. O leite proveniente de mastite possui estabilidade ao calor e propriedade na manufatura de queijos alteradas (Munro et al., 1984). Por outro lado, a presença de *S. aureus* e suas toxinas no leite usado pelas indústrias e laticínios representa sério problema em saúde pública (Dorella Filho, 1982; Bergdoll, 1989, Ichikawa et al, 1996).

### 2.3- Comportamento do patógeno frente a antimicrobianos

Além de ser o principal patógeno envolvido em mastites, *S. aureus* produz infecções de difícil tratamento através da antibioticoterapia. A média de insucesso nas terapias varia de 03 a 92% durante a lactação (Owens et al, 1997). Conseqüentemente, o descarte de vacas infectadas que não respondem aos tratamentos, é ainda considerado o meio mais efetivo de reduzir o nível de infecção de mastites por *S. aureus* em um rebanho. No entanto esta opção não é prontamente aceita por alguns fazendeiros, por isto o tratamento com antimicrobianos, continua sendo utilizado como uma das principais estratégias de controle da doença. A pobre resposta das mastites por *S. aureus* à antibioticoterapia tem sido foco de larga variedade de estudos no esforço de determinar os fatores responsáveis por falhas na terapia, de modo que os tratamentos sejam mais efetivos no futuro. Uma série de interações entre o patógeno e o hospedeiro têm sido identificados como fatores que influenciam negativamente no sucesso da terapia. Dentre eles pode-se incluir a baixa penetração da droga no tecido infectado (Owens

et al., 1993), a localização intracelular da bactéria, inclusive em leucócitos (Craven & Anderson, 1984), inatividade metabólica da bactéria (Eng et al., 1991), atividade reduzida do antibiótico no leite (Louhi et al., 1992) e a própria resistência bacteriana frente aos antibióticos (Myllys et al., 1992). Recentemente, Ali-Vehmas et al. (1997) assinalaram que a união desta bactéria aos glóbulos de gordura seria mais um fator negativo a influenciar nos resultados da antibioterapia. Por outro lado, a ação dos antimicrobianos envolvem mecanismos específicos. Assim, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, tais como as penicilinas e cefalosporinas, inibem a síntese da parede celular ao inibir a polimerização do peptidoglicano, enquanto que a vancomicina combina com os substratos da parede celular. As polimixinas rompem a membrana plasmática, causando perda de material do citoplasma bacteriano, enquanto as quinolonas se unem ao complexo do DNA e DNA girase, bloqueando a replicação do DNA. As nitroimidazoles produzem danos ao DNA; já a rifampicina bloqueia a síntese do RNA inibindo a ação da RNA polimerase. Os aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e clindamicina, interferem com as funções dos ribossomos; sulfonamidas e trimetopim bloqueiam a síntese do ácido fólico, necessária para a replicação do DNA. Fatores de resistência por parte das bactérias podem ser codificados em plasmídeos e cromossomos. A resistência pode envolver um decréscimo na entrada da droga, alterações de receptores para as drogas ou inativação metabólica das mesmas. Dentre estes mecanismos, o mais comum é a produção da enzima  $\beta$ -lactamase mediada por plasmídeos. Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como a penicilina e as cefalosporinas, são frequentemente utilizados para o tratamento das IMI e um dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelo *S. aureus* é a produção da enzima  $\beta$ -lactamase. Segundo Jones & Heath (1985), 66,1% das amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina foram positivas para a produção da  $\beta$ -lactamase, indicando serem as mesmas resistentes aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Apesar disso, Owens & Watts (1988) reportaram que apenas 7% das amostras de *S. aureus* isoladas de

IMI foram resistentes à penicilina, muito embora fossem todas produtoras da  $\beta$ -lactamase. Estudos sobre a susceptibilidade de *S. aureus* envolvidos em IMI foram realizados em diversos países. Swartz et al. (1984) trabalhando com 93 sorotipos de *S. aureus* e 13 antimicrobianos diferentes na África do Sul, encontraram uma alta sensibilidade das amostras frente aos antimicrobianos trabalhados. As amostras apresentaram 100% de susceptibilidade para cefalotina, meticilina e novobiocina, 99% para cloranfenicol, clindamicina, lincomicina, neomicina e oleandomicina; os piores resultados foram com ampicilina e penicilina G, de 68% e 67% respectivamente. Por outro lado, Mackie et al. (1988) trabalhando com 800 amostras de *S. aureus* e oito antimicrobianos diferentes, durante um período de quatro anos na Irlanda, encontraram uma sensibilidade de 100% destas amostras para a cefaloridina e a cloxacilina. Em outro trabalho, Horovitz & Ziv (1988) analisaram a susceptibilidade de 121 sorotipos de *S. aureus* frente a 16 drogas em Israel e encontraram baixos índices de sensibilidade das amostras. Os melhores desempenhos foram apresentados pelo cloranfenicol, cefalotina, oxitetraciclina e eritromicina com 75%, 69%, 69% e 56% de sensibilidade respectivamente. Os piores resultados foram ampicilina, neomicina, penicilina G e polimixina-B, apresentando 1%, 2%, 2% e 6% respectivamente de sensibilidade das amostras. Vale salientar ainda, a gentamicina com um fraco desempenho, de 31% de sensibilidade das amostras testadas. Trabalhando no Brasil, Riedner et al. (1987) testaram 174 amostras de *S. aureus* frente a 12 antimicrobianos diferentes e encontraram um alto índice de resistência contra ampicilina, penicilina G e tetraciclina todas próximas de 100%. A resistência à eritromicina, nitrofurantoína, cloranfenicol, lincomicina e sulfazotrim, variou de 10 a 30%. A resistência à gentamicina e bacitracina foi inferior a 8%. Ainda no Brasil, Schocken-Iturrino et al. (1996) testando 10 amostras de CPS, evidenciaram que a nitrofurantoína (68,2%) e a penicilina (0%), foram os princípios ativos que apresentaram maior e menor eficiência respectivamente. Também no Brasil, Lange et al. (1996) testaram 100 amostras de

*S. aureus* isolados de mastite bovina em pequenas propriedades no Rio Grande do Sul e encontraram sensibilidade de 100% das amostras à gentamicina, sulfazotrim e tiamulin; já a lincomicina, oxacilina, cloranfenicol e novobiocina ficaram na faixa de 99-90%; a kanamicina, tetraciclina, cefacetril e neomicina evidenciaram entre 89-80% de sensibilidade das amostras; a estreptomina 79%; a nitrofurantoína 69%; a amoxicilina 53%; a penicilina e ampicilina 49%. Em outro experimento, Langoni et al. (1996) testaram 1.753 amostras de *S. aureus* isolados de mastite, no estado de São Paulo e encontraram as seguintes percentagens de sensibilidade das amostras frente aos antimicrobianos: gentamicina 88,3%; cefalosporina 87,4%; nitrofurantoína 79,8%; cloranfenicol 78,5%; neomicina 74,8%; eritromicina 62,1%; sulfazotrim 58,7%; lincomicina 51,5%; kanamicina 48,3%; ampicilina 39,5%, tetraciclina 35,7%; estreptomina 17,3% e penicilina G 12,8%. Os tratamentos das infecções da glândula mamária, baseados nos resultados dos testes de susceptibilidade, devem seguir alguns critérios. Entre eles pode-se citar que os melhores resultados das terapias das mastites, são obtidos pela infusão intramamária de suspensões contendo drogas específicas, para serem usadas por esta via em um determinado período, no caso o período seco. Outro critério, que foi apresentado por Davidson (1980) ao NMC (EUA), após 5 anos de estudos, é que os tratamentos de mastite, baseados na percentagem de susceptibilidade dos patógenos frente aos antimicrobianos, devem seguir os seguintes padrões: 100-80% de sorotipos susceptíveis, são consideradas sem resistência, 79-45%, resistência parcial e de 44-0% resistentes. Por outro lado as possibilidades de combinações entre antimicrobianos, desde que não tenham ações antagônicas e que apresentem diferentes mecanismos de ação, apresentam amplas vantagens a serem aproveitadas no campo prático. Assim, combinações de antibióticos como a penicilina e a novobiocina são correntemente usadas para tratamento das IMI. Segundo Thornsberry et al (1997) estes dois antibióticos combinados potencializam a atividade bactericida, fato comprovado por Watts & Salmon (1997) ao testarem a combinação

destas drogas, tanto em *S. aureus*  $\beta$ -lactamase positivos e negativos. Do mesmo modo, associação entre aminoglicosídeos (gentamicina) e quinolonas (enrofloxacina) apresentam um sinergismo importante para o controle das mastites produzidas por *S. aureus* (Silva et al., 1998).

#### 2.4- Fatores de virulência

##### 2.4.1- Coagulase

A coagulase é uma enzima produzida por *S. aureus* que converte o fibrinogênio em fibrina, causando a coagulação do plasma sanguíneo (Easmon & Adlam, 1983). Esta coagulação plasmática é considerada como identificação positiva de *S. aureus* (Rayman et al., 1975). O papel da coagulase na virulência de *S. aureus* tem sido estudado principalmente em camundongos. Injeções intramamárias de coagulase purificada em camundongos, causaram um fluxo de PMN para dentro dos alvéolos secretores e hiperplasia do epitélio mamário (Anderson, 1977). Kinsman et al (1981) obtiveram uma série de sorotipos mutantes de *S. aureus* coagulase negativos provenientes de sorotipos parentais produtores de alfa toxina. A perda da produção de coagulase ocasionou um decréscimo de virulência para a glândula mamária do camundongo, sorotipos mutantes coagulase negativos causaram uma alteração mamária moderada, enquanto os sorotipos parentais causaram uma necrose generalizada. Como a coagulase não tem atividade necrosante (Anderson, 1977), estas observações sugerem um efeito sinérgico entre a coagulase e alfa toxinas. Apesar disto, o papel da coagulase em infecções intramamárias de bovinos, ainda permanece obscuro. É notável que a grande maioria dos *S. aureus* causadores de mastites também coagulam o plasma bovino (Hajek & Marsalek, 1976), entretanto a relação entre estes achados *in vitro* e o atual papel da coagulase durante as infecções intramamárias ainda não foi estabelecido.

#### 2.4.2- *Termonuclease (TNase)*

A Tnase é uma desoxinuclease extracelular que possui atividade de desoxirribonuclease e ribonuclease ou seja, provoca a hidrólise do DNA e do RNA celular, requerendo a participação do cálcio para estas atividades e especialmente para ser termoestável. Esta enzima a qual é produzida pela grande maioria dos *S. aureus*, possui várias denominações, a mais comum é nuclease estafilocócica. Por causa da relativa simplicidade de sua estrutura, ela tem servido como um sistema de modelo para estudos com estrutura de proteínas e funções enzimáticas. A TNase consiste de um peptídeo de cadeia simples de 149 resíduos de aminoácidos. Não contém grupos sulfídricos ou ligações dissulfídicas. Possui peso molecular, baseado na composição de aminoácidos de 16.800 Da, pI = 9,62 (Arvidson, 1983). Diferentes autores estudaram a estabilidade ao calor da nuclease estafilocócica. Lachica et al. (1969) mostrou que a atividade da nuclease estafilocócica foi estável ao calor em 96% das amostras isoladas. Rayman et al. (1975) demonstrou que a correlação entre a produção de TNase e coagulase foi cerca de 96% das 91 amostras de *S. aureus* enterotoxigênicos. Barry et al. (1973) sugeriram que ambos os testes de TNase e coagulase podem ser usados para identificação de *S. aureus*. Quando aplicada em 728 CPS e 307 CNS, Menzies, (1977) revelou que a TNase foi produzida por todos CPS e apenas por um CNS.

#### 2.4.3- *Hemolisinas*

*S. aureus* pode produzir diferentes tipos de toxinas hemolíticas: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ) e delta ( $\delta$ ). Duas delas, toxinas alfa e beta, aparecem como sendo um dos principais fatores de virulência desta bactéria. A hemolisina alfa é uma proteína extracelular de peso molecular igual a 33.000 Da, é um polipeptídeo com pI = 8,5; age como uma citolisina que se liga à membrana das células formando poros hexaméricos, levando a célula à morte, como consequência de um rápido egresso de componentes citoplasmáticos. Possui

propriedades hemolítica, dermonecrótica, citotóxica e letal (Kenny et al., 1992). Esta toxina causa hemólise do tipo completa, afetando eritrócitos de bovinos, ovinos e de coelhos, quase não possui propriedade hemolítica sobre eritrócitos de aves, eqüinos e humanos. Possui propriedade espasmolítica em musculatura lisa e causa distúrbios em membranas neuronais (Easmon & Adlam, 1983; Quinn et al. 1994). A hemolisina beta é uma esfingomielinase do tipo C, atua em membranas celulares ricas em fosfolipídios, por isto é que se explica a alta afinidade deste tipo de hemolisina com membranas eritrocitárias de ovinos e bovinos, que no caso destas espécies chega a 50% (w/w). A incubação a 37°C, de amostras produtoras de beta hemolisinas, em placas de ágar sangue ovino ou bovino, causa discreta hemólise (incompleta), no entanto pode vir a ser completa após estocagem das placas, a uma temperatura situada entre 4-15°C (*lise quente-fria*). A potencialização da hemólise parcial desta hemolisina é a base para o CAMP teste (Quinn et al. 1994). A hemolisina delta é um pequeno peptídeo com 26 resíduos de aminoácidos, possui efeito geral sobre estruturas da membrana, possivelmente associado à natureza hidrofóbica do seu peptídeo, é termoestável e considerada uma enterotoxina. Normalmente é inibida por fosfolipídios e lipoproteínas do soro. Possui efeito necrosante e letal para coelhos. Apresenta hemólise completa, com um largo espectro de ação sobre eritrócitos de várias espécies mas, possui grande especificidade por eritrócitos de eqüino ou de humano (Easmon & Adlam, 1983). Esta hemolisina migra mais lentamente através do ágar do que as alfa hemolisinas, portanto leva mais tempo para expressar seu efeito (Quinn et al., 1994). Em um estudo realizado por Refai et al. (1988), foram testadas 72 amostras de *S. aureus* isolados de vários alimentos, revelando 13,9% de positividade para alfa hemolisinas e 38,9% para beta. Por outro lado Matsunaga et al. (1993) encontraram percentagens mais altas principalmente nas alfa hemolisinas, na ordem de 74,1%, de 65,5% para beta hemolisinas e de 12,1% para delta hemolisinas, em 58 amostras isoladas de mastites super-agudas, agudas e crônicas bovinas. Do mesmo modo

Kenny et al. (1992), encontraram uma alta percentagem (94,3%) de alfa hemolisinas, entre 262 amostras de *S. aureus* isoladas de glândulas mamárias de bovinos. Entretanto, no trabalho realizado por Garcia et al. (1980) foram encontradas maiores percentagens de beta hemolisinas (90%), as alfa hemolisinas representaram 61% de 57 amostras isoladas de mastites clínica e subclínica bovinas. Na mesma linha, Takeshigue et al. (1983) encontraram 95,4% de beta, 69% de alfa e 66,6% de delta hemolisinas, entre 87 amostras isoladas de glândula mamária bovina, em abatedouros no Japão. Em um trabalho realizado por Coia et al. (1992), com isolamento de *S. aureus* em humanos, foram detectadas 60,7% de alfa, 21,9% de beta, 57,7% de gama e 50,2% de delta hemolisinas, em 201 amostras isoladas. Vale ressaltar neste trabalho, a pequena expressão das beta hemolisinas e a produção evidente de hemolisinas em combinação, pelas amostras trabalhadas. Alguns estudos demonstraram a imunogenicidade destas toxinas, através da vacinação sistêmica de ovelhas (Plommet & Legall, 1963), cabras e vacas (Derbyshire, 1960) com uma mistura de alfa e beta anatoxinas, induzindo a produção de anticorpos específicos no soro, para alfa e beta toxinas. Entretanto, a vacinação com anatoxinas não levou a uma eliminação de IMI por *S. aureus*, porém produziu um decréscimo da severidade clínica, especialmente nos pequenos ruminantes. Este efeito pode ser atribuído à neutralização da toxina pelos anticorpos antitoxigênicos os quais fluem do sangue para o leite durante a inflamação mamária (Adlam et al., 1981). Por outro lado, Le Gall & Plommet (1965) observaram que a severidade de IMI experimentais por *S. aureus* era dose dependente, ou seja quanto maior o volume de toxina, mais severa era o quadro clínico de mastite. Em coelhos, duas formas diferentes de IMI por *S. aureus* ocorrem: uma forma crônica com abscessos mamários e uma forma gangrenosa, que foi muitas vezes letal (Ward et al., 1979), estes autores relataram que, a injeção de toxina alfa purificada causou necrose hemorrágica da glândula mamária, a injeção de toxina beta purificada induziu a inflamação da glândula, com edema e um fluxo de PMN para os

ductos e alvéolos glandulares e que a injeção simultânea de ambas as toxinas teve o mesmo efeito que a injeção de toxina alfa purificada sozinha. O papel de alfa e beta toxinas na virulência de *S. aureus* foi investigada em modelo de camundongo com mutante desta bactéria. Alguns estudos demonstraram que o sorotipo mutante, alterado na expressão de alfa toxina por mutagênese química, foi menos virulento para a glândula mamária do camundongo do que o sorotipo produtor de alfa toxina (Kinsman et al., 1981; Jonsson et al., 1985). Dos produtores de alfa e beta toxinas, Bramley et al. (1989) isolaram sorotipos defectivos em alfa toxina, beta toxina ou em ambas com expressão por mutagênese direta. Os sorotipos mutante e parental foram injetados na glândula mamária dos camundongos para estudar o crescimento bacteriano e lesões patológicas *in vivo*. Foi concluído que a necrose da glândula mamária e a alta taxa de mortalidade nos camundongos (60%) após a inoculação do sorotipo parental, foi devido à alfa toxina. Ambas alfa e beta toxinas promoveram crescimento bacteriano na glândula mamária. No entanto, beta toxina parece contribuir pouco para a patogênese de mastite aguda no modelo de camundongo. No caso de sorotipo defectivo em alfa/beta, PMN e arquitetura celular de alvéolos glandulares não foram alterados, enquanto sorotipos defectivos em beta (produtores de alfa) acusaram lise de PMN, destruição de epitélio secretor e necrose. A inoculação de *S. aureus*, após indução de inflamação por injeção intramamária de LPS de *E. coli*, causou IMI crônica com todos os sorotipos, independente da expressão de toxina. Os LPS causaram um precoce recrutamento de PMN, que reduziu o crescimento bacteriano e portanto a produção de toxinas no leite. Esta situação, já descrita (Anderson, 1977), pode representar a IMI crônica natural de *S. aureus*, comumente observada em vacas.

#### 2.4.4- Enterotoxinas Estafilocócicas (SE's)

Segundo Bergdoll (1989) os sorotipos de *S. aureus* produtores de enterotoxinas foram identificados originalmente por testes de

ingestão em macacos. Sorotipos que produziam substância emética e que não reagiam com anticorpos específicos foram considerados produtores de enterotoxinas não identificáveis. Nove diferentes enterotoxinas já foram identificadas (A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D, E, G e H). A primeira enterotoxina identificada foi nomeada SEB. Quando a nomenclatura foi estabelecida, a segunda enterotoxina identificada foi chamada SEA, porque foi a principal enterotoxina isolada de intoxicações alimentares em humanos. Todas as enterotoxinas foram identificadas primariamente nos EUA. As enterotoxinas B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, E e H foram identificadas por pesquisadores do FRI, enquanto as enterotoxinas A e D foram identificadas por pesquisadores do FDA. As enterotoxinas podem ser classificadas em duas categorias baseadas em suas características de produção:

- 1) SEB e SEC podem ser produzidas em grandes quantidades e a quantidade produzida é dependente das condições de incubação.
- 2) SEA e SED são produzidas em quantidades relativamente pequenas e suas produções não são estimuladas por condições de incubação, mas sim pelo crescimento do próprio microorganismo.

As enterotoxinas são polipeptídeos de cadeia simples com quantidades relativamente grandes de lisina, ácidos glutâmico e aspártico. São proteínas de peso molecular relativamente baixo (26.000-29.000 Da), ponto isoelétrico entre 7,0-8,6 e resistentes a ação de enzimas proteolíticas como pepsina e tripsina; são higroscópicas e facilmente solúveis em água e soluções salinas, a dose emética para macacos é de 5-20 µg/animal, via intragástrica e de 0,02-0,5 µg/kg, via endovenosa. A dosagem mínima, causadora de vômito e diarreia para todas as SE's em humanos, é de 0,05 µg/kg, no entanto foram observados sintomas em 50% dos voluntários que receberam 0,01 µg/kg de SEA. As enterotoxinas estafilocócicas são, em muitos aspectos, mais estáveis do que a maioria das proteínas, podendo inclusive resistir a fervura por até 30 minutos sem perder suas atividades toxigênicas, sua estabilidade frente ao calor é maior ainda quando aquecidas em alimentos do que quando aquecidas em soluções salinas (Bergdoll, 1989). A maioria das intoxicações resulta da ingestão de alimentos nos quais

a enterotoxina foi produzida após o cozimento ou aquecimento do mesmo. No entanto algumas intoxicações são resultantes da ingestão de alimentos que foram aquecidos após a produção das enterotoxinas. Isto é de particular importância para a indústria de alimentos porque a maioria dos alimentos processados são aquecidos de alguma maneira durante a sua produção. Por exemplo, a pasteurização do leite pode destruir os *staphylococci* mas não inativa as enterotoxinas que porventura poderão estar presentes (Bergdoll, 1989). No Reino Unido Wieneke et al. (1993) relataram a ocorrência de 359 casos de intoxicação alimentar devido a enterotoxinas estafilocócicas durante 21 anos de pesquisa (1969-1990), somente em dois casos não havia presença de bactérias viáveis e em ambos os casos as SE's foram detectadas em queijo. Dos 359 casos apenas oito por cento foram devidos ao leite e derivados contaminados. No Brasil temos apenas dados relativos às intoxicações alimentares, sem especificar quais as enterotoxinas, os agentes e as fontes envolvidas. Os dados do DATASUS (Brasil, 1998) revelam 593.212 casos de intoxicação alimentar no período de 1984-1997. Em um trabalho realizado no Egito por Refai et al. (1988), foram encontradas 53% de amostras enterotoxigênicas entre 72 amostras de *S. aureus* isoladas de várias fontes de alimentos, sendo os tipos de SE's que predominaram foram SEA e SED nesta ordem. Em um estudo na Escócia, Coia et al. (1992) encontraram 57,2% de 201 amostras isoladas de humanos, com predominância de SEA e SEC, respectivamente. Nos Estados Unidos, Kenny et al (1993) trabalhando 262 amostras isoladas de glândula mamária bovina, encontraram 27% de sorotipos produtores de enterotoxinas com predominância da SED e SEC. Bergdoll (1989) encontrou positividade em 31,5% de 276 amostras isoladas de leite achocolatado embalado em caixinhas Tetra-Pak®, com pequenas concentrações de SEA. No Japão, Matsunaga et al. (1993), trabalhando com amostras isoladas de mastites super-agudas, agudas e crônicas, acharam 34,5% de amostras positivas para enterotoxinas entre 58 sorotipos testados, com predominância da SEC e SEB. Takeshigue et al. (1983) encontraram 33,3% de 87

amostras, isoladas de glândula mamária bovina em abatedouros, sendo a SEC a mais predominante, Ichikawa et al. (1996) trabalhando com amostras isoladas de bovinos e humanos, acharam 51,7% de amostras enterotoxigênicas em 290 amostras isoladas de bovinos e 68,7% em 131 amostras isoladas de humanos, as SE's predominantes para ambas as fontes foram SEC e SEB. Kato & Kume (1980) encontraram 34,4% de amostras enterotoxigênicas em 1056 amostras isoladas de mastite subclínica, sendo SEC e SEA as mais predominantes. Os estudos realizados na Espanha por Garcia et al. (1980), revelaram enterotoxigenicidade na ordem de 7% entre 57 amostras isoladas de mastite clínica e subclínica, tendo a predominância de SEC e SED. Em Trinidad, Adesiyun (1994) encontrou 7,7% de amostras enterotoxigênicas, entre 117 amostras coletadas em tanques de expansão, com predominância de SEA e SEB. Na Argentina, Bogni et al. (1997) encontraram 4,7% de amostras enterotoxigênicas em 43 amostras isoladas de mastites clínicas e subclínicas, com predominância de SEC. Em um estudo realizado no Brasil por Lopes et al. (1990) também foram encontradas 4,7% de amostras positivas entre 127 amostras isoladas de mastites subclínicas, com predomínio de SEC e SEA. Também no Brasil, Soares et al. (1997) encontraram positividade para 28,6% de 91 amostras isoladas de humanos, tendo como predominantes a SEC e SEA. Aarestrup et al. (1995) na Dinamarca, não encontraram uma amostra enterotoxigênica sequer (0%), entre 106 amostras isoladas de mastite bovina.

#### 2.4.5- Toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1)

A toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) é uma importante toxina produzida por *Staphylococcus aureus* e tem sido reconhecida como a principal causa da síndrome do choque tóxico (TSS) em humanos, que é caracterizada por febre, hipotensão, congestão em vários órgãos e choque letal (Bergdoll & Chesney, 1991). O primeiro relato de detecção de TSST-1 produzida por *staphylococci* de origem animal, foi feito por Jones & Wieneke

(1986), onde foram isolados *S. aureus* de casos severos de mastite bovina. TSST-1 é um polipeptídeo de cadeia simples, com peso molecular de 22.000 Da e pI = 7,2. TSST-1 tem muitas propriedades biológicas em comum com outras exotoxinas pirogênicas, dentre elas pode-se incluir a capacidade de induzir febre (Igarashi et al., 1986), de aumentar a letalidade do choque endotóxico (Fast et al., 1988), de estimular a proliferação inespecífica de células T (Ikejima et al., 1988), de induzir a produção de interleucina-1 (Micusan et al., 1989), gama interferon e fator alfa de necrose tumoral (TNF) (Ellis et al., 1993). Matsunaga et al. (1993) descrevem que *S. aureus* produtores de TSST-1 e SEC estão relacionados com mastite clínica super-aguda, possivelmente pela alta contribuição destas substâncias com as respostas inflamatórias. Em um estudo recente, Takeuchi et al. (1998) testaram 272 amostras e encontraram altas percentagens de *S. aureus* produtores de TSST-1, que foram isolados de mastite subclínica (76,7%), de mastite clínica (58,1%) e de tanques de expansão (75,4%), a TSST-1 geralmente era produzida em associação com SEC. Em outro estudo, Kenny et al. (1992) ao testarem 262 amostras, demonstraram que 20% dos isolados produziram a TSST-1, porém em associação com a SED. Na Argentina, Bogni et al. (1997) encontraram apenas uma amostra TSST-1 positiva entre 46 testadas e que também estava associada a SEC. Na mesma linha Matsunaga et al. (1993) testando 58 amostras, encontraram 27,6% de positividade para TSST-1 que geralmente estava associada a SEC. Em um relato de caso de mastite severa em quatro caprinos, Morgan et al. (1986) relataram o isolamento de *S. aureus* produtores de TSST-1 associada com SEC. Da mesma forma Jones & Wieneke (1986) relataram quatro casos de mastite severa em bovinos, onde foram isolados, pela primeira vez, *S. aureus* produtores de TSST-1 de origem animal e SEC. Outro autor, Igarashi et al. (1986) testando 41 *S. aureus* isolados de pacientes humanos encontraram 56% de produtores de TSST-1, em geral associada à SEA. Entretanto, Ichicawa et al. (1996) estudando *S. aureus* isolados de bovinos e humanos, acharam 57,2% de

positividade para TSST-1 entre 290 amostras isoladas de bovinos, geralmente associadas a SEC e entre as 131 amostras isoladas de pacientes humanos, foram encontradas 85,5% de amostras produtoras de TSST-1 que também estavam geralmente associadas à SEC.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- Local

O experimento foi realizado em duas etapas, a primeira no Laboratório de Pesquisas em Bacterioses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG e a segunda no Laboratório de Referência em *Staphylococci* do Instituto de Pesquisas Octávio Magalhães da FUNED.

#### 3.2- Amostras

Foram utilizados 127 biotipos de *Staphylococcus aureus*, isolados de amostras de leite bovino, obtidas de 23 municípios do Estado de Minas Gerais (Figura 1): Alvinópolis, Bambuí, Belo Horizonte, Bom Despacho, Campos Altos, Codisburgo, Conselheiro Lafaiete, Contagem, Curvelo, Divinópolis, Esmeraldas, Inhaúma, Itabirito, Jordânia, Lagoa Santa, Martinho Campos, Matozinhos, Pará de Minas, Passos, Pedro Leopoldo, Ribeirão das Neves, São José da Varginha e Sete Lagoas. As coletas foram realizadas no período de outubro de 1994 a outubro de 1997. As amostras foram isoladas após semeadura em ágar sangue desfibrinado de ovino a 5% (v/v) com incubação em estufa a 37°C, por um período de 24-48 horas. As amostras foram mantidas em ágar fosfatado a 4°C e em caldo BHI Oxoid® com glicerol a 50 % em temperatura de 80°C negativos, até a realização dos testes.

### 3.3- Identificação

Foram realizadas várias provas de identificação das amostras: coloração de Gram, fermentação de glicose e manitol em aerobiose e anaerobiose, produção de pigmento, semeadura em ágar seletivo (Staph.110 Difco<sup>®</sup>), prova de acetoina, prova de catalase, prova de coagulase e prova de termonuclease segundo Bier (1984), Bergdoll (1989), Kloos & Lambe (1991), Varnam & Evans (1991), Quinn et al. (1994).

### 3.4- Susceptibilidade *in vitro* frente a antimicrobianos

Foi realizada pelo método de difusão de antibióticos em disco, conforme técnica descrita por Bauer et al. (1966). As amostras previamente identificadas foram repicadas em caldo Müller-Hinton (MHB) Oxoid<sup>®</sup> e foram incubadas por 6 horas a 37°C. Após a incubação em MHB, as amostras passaram por padronização da diluição, através de escala bacteriológica de MacFarland, à turbidez de 0,5 (Bier, 1984). Após a padronização foram feitas as semeaduras das amostras em ágar Müller-Hinton Oxoid<sup>®</sup> com *swabs* estéreis, seguida de pré-incubação a 37°C por 10 minutos. Logo após a pré-incubação fez-se a deposição dos discos antimicrobianos CECON<sup>®</sup> das seguintes bases: ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefoperazona (30 µg), cefotaxima (30 µg), cloranfenicol (30 µg), enrofloxacina (10 µg), eritromicina (15 µg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), lincomicina (2 µg), neomicina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), novobiocina (30 µg), oxacilina (5 µg), penicilina-G (10 Un), polimixina-B (300 Un), rifampicina (5 µg), tetraciclina (30 µg) e sulfazotrim (25 µg). A leitura foi realizada após 24 horas de incubação em estufa a 37°C. As zonas de inibição foram medidas em milímetros e o biotipo classificado como resistente, intermediário ou sensível ao antimicrobiano testado, conforme tabela descrita pelo laboratório fabricante dos discos antimicrobianos (Tabela 1).

**Tabela 1-** Limites para interpretação do antibiograma com zonas de inibição dadas em milímetros

<b>Droga</b>	<b>[c]</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>S</b>
Ampicilina	10 µg	≤ 20	21-28	≥ 29
Cefalotina	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefoperazona	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxima	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cloranfenicol	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Enrofloxacina	10 µg	≤ 12	13-16	≥ 17
Eritromicina	15 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
Estreptomicina	10 µg	≤ 11	12-14	≥ 15
Gentamicina	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Lincomicina	2 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Neomicina	30 µg	≤ 12	13-16	≥ 17
Nitrofurantoína	300 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Novobiocina	30 µg	≤ 17	18-21	≥ 22
Oxacilina *	5 µg	≤ 9	10-13	≥ 14
Penicilina-G	10 Un.	≤ 20	21-28	≥ 29
Polimixina-B	300 Un.	≤ 8	9-11	≥ 12
Rifampicina	5 µg	≤ 24		≥ 25
Sulfazotrim	25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16
Tetraciclina	30µg	≤ 14	15-18	≥ 19

[c] = Concentração, R = Resistente, I = Intermediário, S = Sensível.

\* Resultados obtidos com a oxacilina são aplicáveis à meticilina, cloxacilina, dicloxacilina e nafcilina ( $\beta$ -lactâmicos que são  $\beta$ -lactamase resistentes).

### 3.5- Identificação dos fatores de virulência

#### 3.5.1- Coagulase

Foi utilizado o teste da coagulase em tubo. Foram realizados cultivos das amostras em caldo BHI Oxoid<sup>®</sup> em estufa a 37°C por 24 horas, seguidos de pipetagem de 0,5mL de cada cultura para tubos de hemólise previamente esterilizados. Foi feita a adição de 0,25 mL de plasma estéril de coelho seguida de incubação a 37°C, segundo Quinn et al. (1994). A leitura foi realizada após 2, 4, 6, 18 e 24 horas de incubação para visualização da formação de coágulos. Foram considerados positivos os testes que apresentaram reação 2+, 3+ ou 4+ segundo Bergdoll (1989).

#### 3.5.2- Termomuclease (TNase)

Foi utilizado o método descrito por Bergdoll (1989), sendo o teste realizado em lâminas de ágar DNA azul toluidina (TDA). As amostras de *S. aureus* inoculadas em caldo BHI Oxoid<sup>®</sup>, foram incubadas a 37°C por 24 horas e depois submetidas a aquecimento em banho-maria a 100°C por 20 minutos. Em seguida foram pipetados 50 µL das culturas aquecidas e distribuídas em poços de 3 mm de diâmetro, perfurados em lâminas de ágar Bacto Difco<sup>®</sup>, com 0,03 % de DNA e 0,0083 % de azul toluidina. As lâminas foram colocadas dentro de câmara úmida e levadas para incubação a 37°C por 4 horas. A presença de halos róseos com 1 mm ou mais de distância dos poços foi considerada como reação positiva para TNase (Figura 2).

#### 3.5.3- Hemolisinas ( $\alpha$ , $\beta$ , $\alpha\beta$ , $\delta$ )

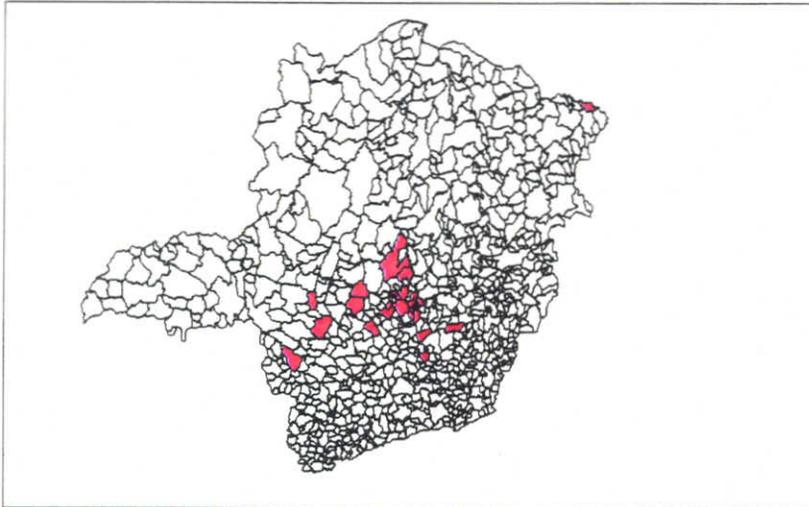
A detecção de toxinas hemolíticas foi feita em placas de ágar sangue a 5% (v/v) de sangue ovino. Os tipos de hemolisinas produzidas pelas amostras (alfa, beta e alfa/beta) foram determinadas pela leitura das hemólises nas placas de ágar sangue,

após 24 e 48 horas de incubação a 37°C (NMC, 1987). Foram consideradas alfa hemolisinas, quando a hemólise apresentava halos bem claros e mais próximos das bordas das colônias, caracterizando uma lise completa dos eritrócitos. As hemolisinas beta foram assim denominadas, quando se apresentavam formando halos mais distantes das bordas das colônias e de coloração avermelhada, caracterizando uma lise parcial ou incompleta dos eritrócitos presentes. Foram consideradas alfa/beta quando a mesma colônia apresentava ambas as hemolisinas descritas acima. A detecção das delta hemolisinas foi feita em placas de ágar sangue eqüino a 5% (v/v) com incubação a 37°C e leitura com 24 e 48 horas. Foram consideradas delta hemolisinas quando a hemólise apresentava-se do tipo completa após 48 horas de incubação (Quinn, 1994).

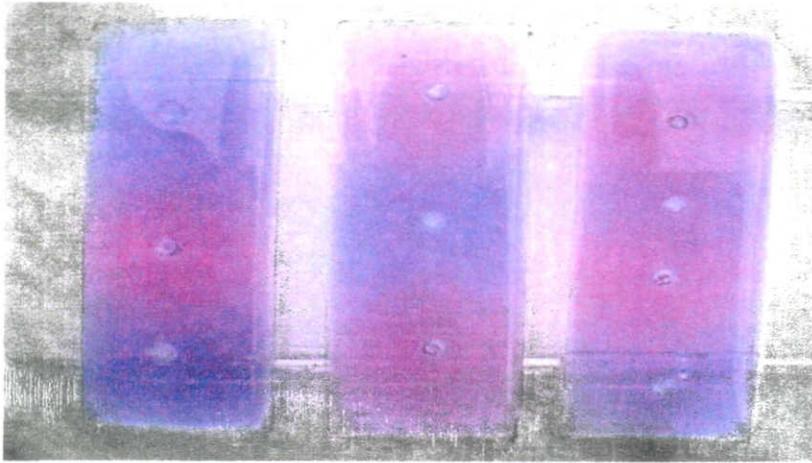
#### *3.5.4- Enterotoxinas estafilocócicas (SE's) e toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1)*

As amostras a serem testadas, já isoladas e identificadas, foram inoculadas em 2 mL de caldo BHI Oxoid® e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Para se proceder a extração das toxinas, foi empregado o método da membrana sobre ágar (Robbins et al., 1974). As placas de Petri foram preparadas com 20 mL de ágar BHI Oxoid®, acrescido de 1 % de extrato de levedura e 0,1 % de fosfato di-básico, recobertas com disco de membrana de diálise Spectra/Por® (Spectrum Labs, USA) de 100 mm para proteínas de 6.000-8.000 Da, ajustadas ao diâmetro das placas. Após a acomodação cuidadosa da membrana sobre o ágar, com o auxílio de uma alça de Drigalsk, um inóculo de 0,5 mL da cultura foi espalhado na superfície da membrana (Figura 3), as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Os cultivos assim obtidos foram lavados, com 2,5 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 0,02 M e pH 7,4; em duas etapas. A primeira utilizando 1,5 mL e a segunda, logo após a primeira, com 1,0 mL do tampão. Os lavados das culturas foram transferidos, com o auxílio de pipeta de Pasteur, para tubos de

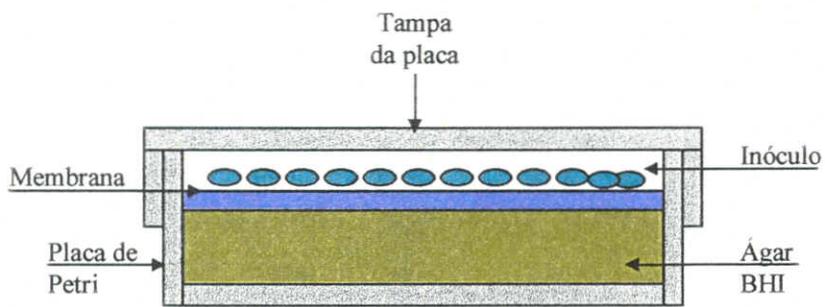
policarbonato de 10 mL de capacidade e centrifugados a 10.000 g a 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram transferidos para frascos de vidro com tampa e acrescidos de 20 µL de timerosal 1:1000 como conservante. A verificação da produção de enterotoxinas e TSST-1, foi realizada pela técnica de sensibilidade ótima em placa (OSP) descrita por Robbins et al. (1974), normalmente recomendada para análises qualitativas de toxigenicidade ou seja, determinar se um sorotipo ou linhagem é produtora ou não de toxinas. Neste método 3 mL de ágar preparado com 1,2% de ágar nobre em tampão PBS a 0,02M e pH 7.4 foi adicionado de 1,0 mL de timerosal como conservante e colocado em placas de Petri de 50 x 12 mm. Após a solidificação foram feitos 7 orifícios no ágar, utilizando um molde padronizado pelo FRI, sendo 5 furos de 8,3 mm e dois medindo 6,7 mm (Figura 4). Nos dois orifícios menores foram colocados 4 µg/mL de uma toxina padrão e no orifício central um antissoro específico de título conhecido (1:24) - tanto as toxinas padrões como os antissoros foram gentilmente cedidos pelo Dr. Luiz Simeão do Carmo, chefe do Laboratório de Pesquisas em *Staphylococci* da FUNED - de forma que as linhas de precipitina, formadas pela reação antígeno-anticorpo, se situem na metade da distância entre este e cada um dos orifícios menores. Os sobrenadantes das culturas a serem testadas, foram colocados nos quatro orifícios restantes e as placas transferidas para uma câmara úmida e incubadas a 37°C por 24 horas. As reações positivas foram determinadas pela formação de linhas de precipitina dos sobrenadantes das culturas teste com os antissoros controle (Figura 5).



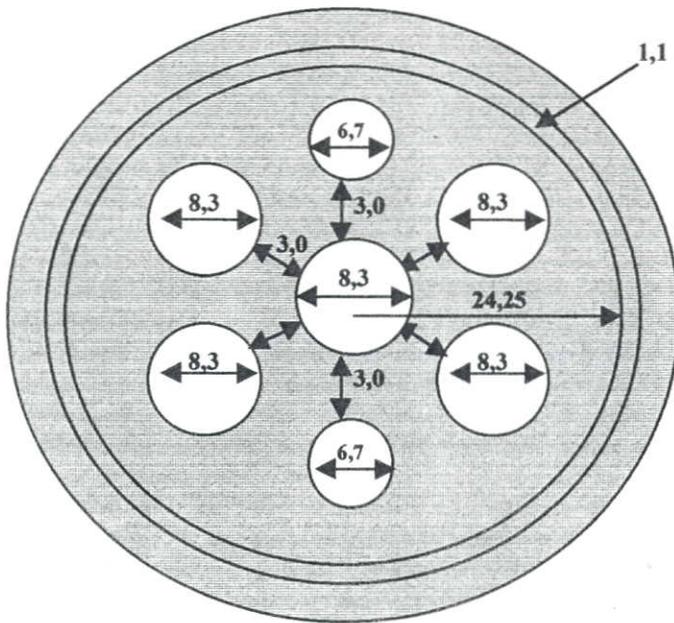
**Figura 1-** Mapa de Minas Gerais com divisão municipal. As áreas em vermelho indicam os municípios onde foram coletadas as amostras.



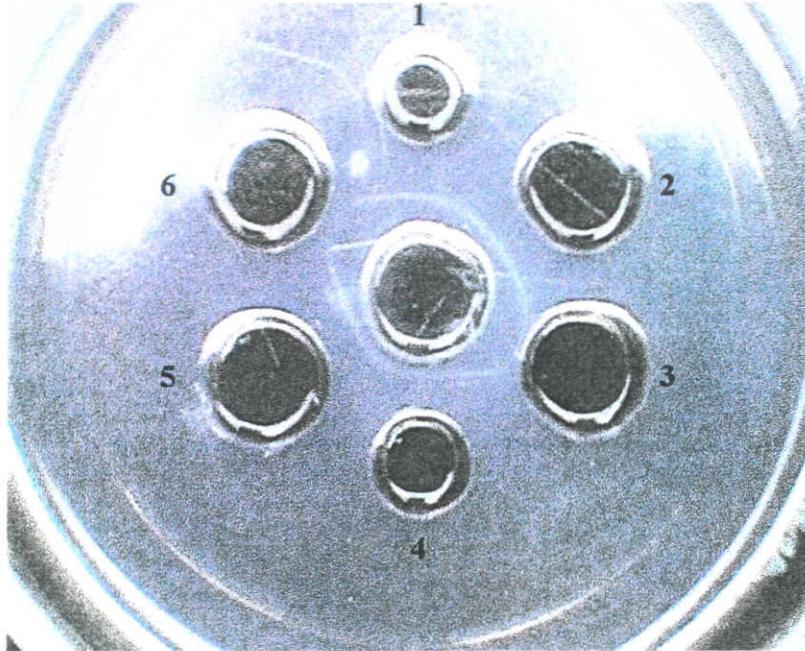
**Figura 2-** Foto da reação da TNase em lâminas, pelo método da difusão metacromática em ágar TDA. Os halos róseos em torno dos poços indicam reação positiva.



**Figura 3-** Esquema do método da membrana sobre ágar para extração das SE's e TSST-1.



**Figura 4-** Esquema do molde FRI usado para perfuração dos poços em ágar nobre (medidas dadas em mm).



**Figura 5-** Foto da precipitação das toxinas frente ao antissoro (poço central) em placas de ágar nobre (Método OSP). Reação positiva dos controles (poços 1 e 4) e das amostras testadas (poços 2 e 5). Reação negativa das amostras testadas (poços 3 e 6).

## 4 RESULTADOS

### 4.1- Coagulase e termomonuclease

Todas as amostras (100%) foram positivas para ambas as provas.

### 4.2- Susceptibilidade das amostras frente aos antimicrobianos

O resultado da prova de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado pelas amostras de *S. aureus* encontra-se na Tabela 2. Os antimicrobianos mais efetivos ou seja, aqueles que conseguiram inibir o crescimento de 100% a 95% das amostras testadas foram: cefotaxima (100%), enrofloxacina (98,4%), gentamicina (98,4%) e rifampicina (96,1%), ressaltando-se que nenhuma das amostras apresentou resistência aos três primeiros. Outros antimicrobianos, como a cefalotina (92,1 %), cloranfenicol (90,4 %), cefoperazona (89,8 %), oxacilina (87,4 %), sulfazotrim (86,6 %) e novobiocina (85,8 %), apresentaram bons resultados frente as amostras de *S. aureus* testadas. Por outro lado, os antimicrobianos de menor desempenho quanto a sensibilidade das amostras foram: polimixina-B (8,7 %), ampicilina (28,6 %), penicilina (29,1 %) e estreptomomicina (53,5%). Os demais antimicrobianos demonstraram valores intermediários entre as porcentagens descritas acima para as drogas de maior e menor desempenho quanto a sensibilidade das amostras testadas. Estas drogas situaram-se no intervalo compreendido entre 80-65%, foram elas: neomicina (79,5%), nitrofurantoína (77,2%), lincomicina (72,4%), tetraciclina (68,5%) e eritromicina (66,9%).

**Tabela 2-** Suscetibilidade aos antimicrobianos testados, das 127 amostras de *S. aureus* isoladas de leite bovino em Minas Gerais no período de 1994-97.

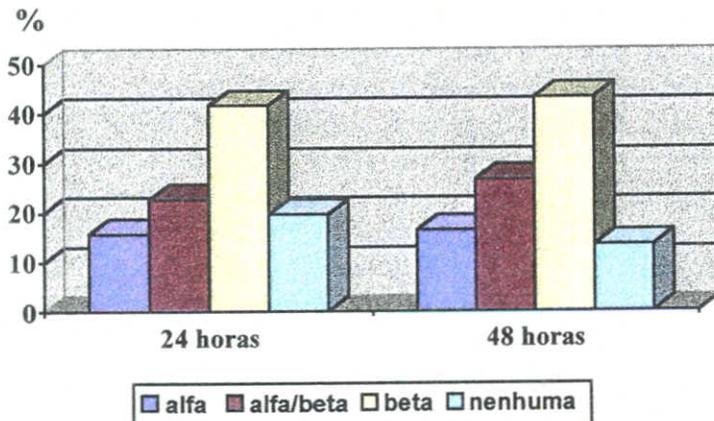
N.º	Droga	S	%	I	%	R	%
1	Cefotaxima	127	100,0	0	0,0	0	0,0
2	Enrofloxacina	125	98,4	2	1,6	0	0,0
3	Gentamicina	125	98,4	2	1,6	0	0,0
4	Rifampicina	122	96,1	0	0	5	3,9
5	Cefalotina	117	92,1	4	3,0	6	4,9
6	Cloranfenicol	115	90,6	8	6,0	4	3,4
7	Cefoperazona	114	89,8	10	8,0	3	2,2
8	Oxacilina	111	87,4	3	2,0	13	10,6
9	Sulfazotrim	110	86,6	3	2,0	14	11,4
10	Novobiocina	109	85,8	1	1,0	17	13,2
11	Neomicina	101	79,5	22	17,0	4	3,5
12	Nitrofurantoína	98	77,2	20	16,0	9	6,8
13	Lincomicina	92	72,4	18	14,0	17	13,6
14	Tetraciclina	87	68,5	6	5,0	34	26,5
15	Eritromicina	85	66,9	24	19,0	18	14,1
16	Estreptomicina	68	53,5	11	9,0	48	37,5
17	Penicilina	37	29,1	8	6,0	82	64,9
18	Ampicilina	36	28,3	11	9,0	80	62,7
19	Polimixina B	11	8,7	24	19,0	92	72,3

S = Sensível , I = Sensibilidade intermediária , R = Resistente.

#### 4.3- Identificação da produção de toxinas

##### 4.3.1- Hemolisinas

A distribuição das hemolisinas entre as 127 amostras testadas, após 24 horas de incubação a 37°C, era de 20 amostras (15,7%) apresentando alfa hemolisinas, 53 amostras (41,7%) apresentando beta hemolisinas e 29 amostras (22,8%) apresentando alfa e beta hemolisinas. Cerca de 25 amostras (19,7%) não apresentaram nenhuma das hemolisinas descritas acima. Após 48 horas de incubação esta distribuição se alterou para 21 amostras (16,5%) apresentando alfa, 55 amostras (43,3%) apresentando beta e 34 amostras (26,8%) apresentando alfa e beta hemolisinas. Após este período 110 amostras (86,6%) apresentaram algum tipo de hemolisina e apenas 17 amostras (13,4%) não apresentaram nenhum tipo das hemolisinas descritas acima (Figura 6).



**Figura 6-** Distribuição das hemolisinas em ágar sangue ovino com incubação a 37° C por 24-48h, entre as 127 amostras de *S. aureus* isoladas de leite bovino em Minas Gerais de 1994-97.

Em placas de ágar sangue eqüino, após 48 horas de incubação a 37°C, foram identificadas 22 amostras (17,3%) apresentando hemólise completa, sendo caracterizadas como delta hemolisinas.

#### 4.3.2- Enterotoxinas (A, B, C e D) e toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) por amostra

De um total de 127 amostras testadas, 83 (65,4%) apresentaram produção de pelo menos um tipo destas toxinas, revelando alto grau de toxigenicidade (Tabela 3). Destas 127 amostras, 54 delas (42,5%) apresentavam produção de alguma enterotoxina, mostrando percentual considerável de enterotoxigenicidade. Elas se apresentavam produzindo apenas um tipo de toxina ou em combinação, chegando a mesma amostra a produzir até quatro tipos diferentes de toxinas simultaneamente. Aqui são apresentados os dados referentes à toxigenicidade das amostras, levando-se em consideração quais os tipos de toxinas produzidas por cada amostra individualmente. Das 127 amostras testadas, 29 (22,8%) eram produtoras de TSST-1 isoladamente, outras porém apresentaram produção de TSST-1 em combinação com as enterotoxinas. Do total testado foram encontradas 09 amostras (7,1%) produtoras de SED isoladamente, 07 amostras (5,5%) foram produtoras de SEB, a terceira toxina mais produzida isoladamente; apenas 01 amostra (0,8%) produziu SEA isoladamente. Nenhuma amostra produziu somente SEC. Entre as amostras produtoras de mais de um tipo de toxina, podemos destacar aquelas produtoras de SED+TSST-1 com um total de 17 amostras (13,4%), seguida pela combinação de SEB+SED+TSST-1 com 05 amostras positivas (3,9%). Quatro amostras (3,1%) apresentaram produção de SEB+TSST-1, 03 amostras (2,4%) apresentaram produção de SEB+SED. As combinações com quatro toxinas como: SEA+SEB+SEC+TSST-1 e SEB+SEC+SED+TSST-1, foram representadas apenas por 02 amostras (1,6%) para cada uma destas combinações. As combinações SEA+SEC, SEC+SED, SEC+TSST-1 e SEB+SEC+SED, tiveram apenas uma amostra produtora (0,8%) para cada uma delas.

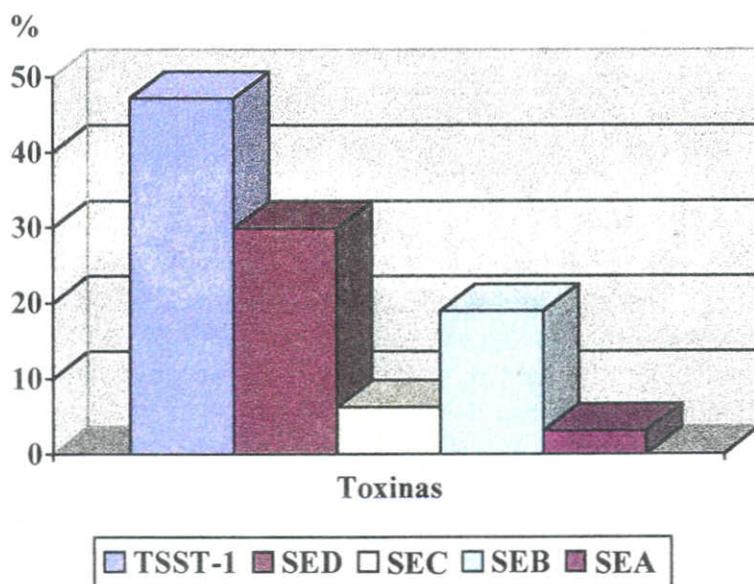
**Tabela 3-** Distribuição da produção de toxinas isoladamente ou em combinação, entre as 127 amostras de *S. aureus* isoladas de leite bovino em Minas Gerais no período de 1994-97.

<b>Toxinas</b>	<b>Nº de amostras</b>	<b>%</b>
SEA	1	0,8
SEB	7	5,5
SEC	0	0
SED	09	7,1
TSST1	29	22,8
SEA+SEC	1	0,8
SEB+SED	3	2,4
SEB+TSST1	4	3,1
SEC+SED	1	0,8
SEC+TSST1	1	0,8
SED+TSST1	17	13,4
SEB+SEC+SED	1	0,8
SEB+SED+TSST1	5	3,9
SEA+SEB+SEC+TSST1	2	1,6
SEB+SEC+SED+TSST1	2	1,6
Nenhuma	44	34,6
<b>TOTAL</b>	<b>127</b>	<b>100,0</b>

Pode-se notar que apenas 34,6% das amostras testadas foram negativas para qualquer tipo de toxina produzida isoladamente ou em combinação com outras toxinas, revelando o alto índice de toxigenicidade das amostras (65,4%). Ao se mostrar os resultados da produção de toxinas desprezando-se as combinações, veremos que as enterotoxinas D e B e especialmente a TSST-1 aparecem com uma intensidade ainda maior, do que está apresentado na tabela acima.

#### 4.3.3- SE's e TSST-1 desprezando-se as combinações

A distribuição da produção das toxinas isoladamente, desprezando-se as combinações, pode ser visualizada na Figura 6. A TSST-1 foi a toxina mais produzida entre as 127 amostras, sendo 60 amostras positivas, representando 47,2% do total, seguida pela SED, produzida por 38 amostras (29,9%), enquanto a enterotoxina C foi produzida por apenas 8 amostras representando 6,3%. A enterotoxina B, que foi a segunda enterotoxina mais produzida entre as amostras, apareceu 24 vezes, representando 18,9% do total e em último lugar apareceu a enterotoxina A com apenas quatro amostras produtoras, somando 3,1% do total testado.



**Figura 7-** Distribuição de toxinas desprezando-se as combinações, entre as 127 amostras de *S. aureus* isoladas de leite bovino em Minas Gerais de 1994-97.

#### 4.3.4- SE's e TSST-1 entre as 83 amostras toxigênicas

Os tipos de toxinas predominantes foram: TSST-1 com 61 amostras apresentando produção desta toxina, isoladamente ou em combinação com as enterotoxinas, representando 72,3% das amostras toxigênicas. Das enterotoxinas (SE's), o tipo predominante foi a SED com 39 amostras positivas representando 45,8% das amostras toxigênicas, seguida pela SEB com 24 amostras positivas representando 28,9%. Os outros dois tipos SEC e SEA tiveram pouca representatividade no contexto geral, apresentando 8 e 4 amostras positivas, sendo 9,6% e 4,8% respectivamente (Tabela 4).

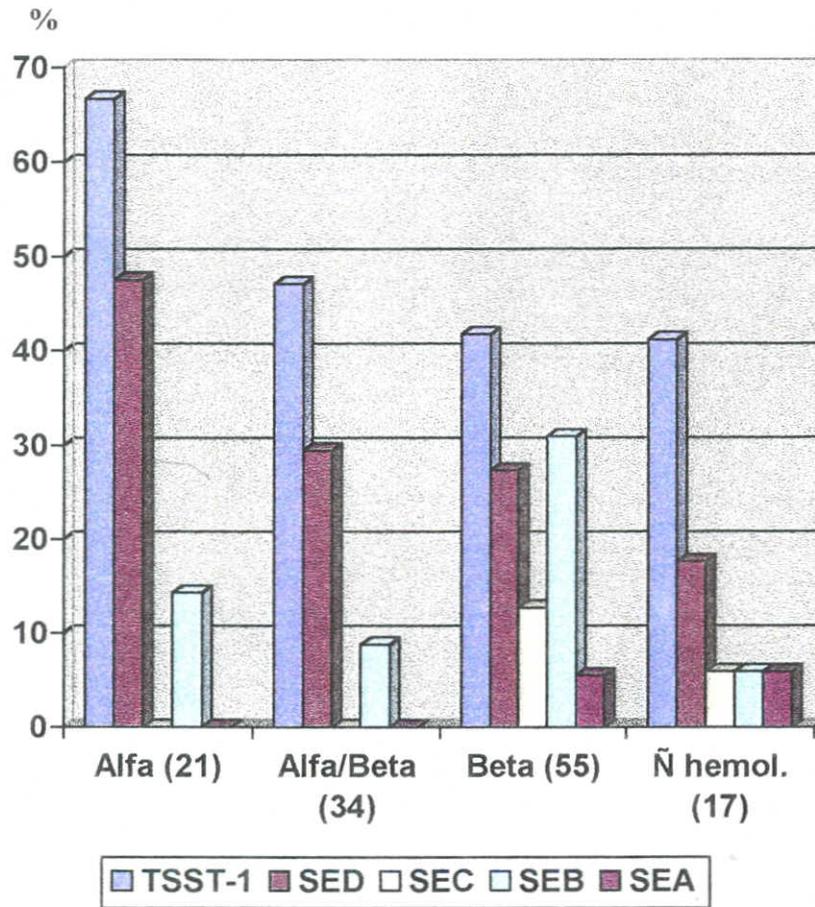
**Tabela 4-** Distribuição da produção de toxinas, desprezando-se as combinações, entre as 83 amostras toxigênicas de *S. aureus*, isoladas de leite bovino em Minas Gerais no período de 1994-97.

Toxina	n	%
TSST-1	60	72,3
SED	38	45,8
SEC	8	9,6
SEB	24	28,9
SEA	4	4,8

Pode-se notar o amplo domínio da toxina 1 da síndrome do choque tóxico e da SED. A SEB também apresentou expressividade entre as amostras toxigênicas, seguida pelas SEC e SEA respectivamente, que não foram tão expressivas quanto as demais, entre as amostras toxigênicas.

#### 4.3.5- Relação entre a produção de hemolisinas e toxinas

Os dados referentes à produção das hemolisinas e sua relação com as toxinas produzidas pelas 127 amostras testadas podem ser visualizados na Figura 10. Como foi dito anteriormente a semeadura em placas de ágar sangue ovino foi acompanhado de duas leituras com 24 e 48 horas. Nesta seção serão apresentados apenas os dados das hemólises referentes à leitura com 48 horas onde já se havia definido qual o tipo de hemolisina apresentada pela amostra correspondente e sua relação com o tipo de toxina produzida pela mesma. Das 21 amostras produtoras de hemolisinas alfa, 14 delas eram produtoras de TSST-1 representando 66,7%, 10 produziram SED (47,6%) e três produziram SEB (14,3%). Nenhuma delas produziu SEA ou SEC (0%). Das 34 amostras produtoras de hemolisinas alfa/beta, 16 delas eram produtoras de TSST-1 representando 47,1% destas amostras, 10 produziram SED (29,4%) e três produziram SEB (8,8%). Novamente nenhuma amostra produziu SEA ou SEC (0%). Das 55 amostras produtoras de beta hemolisinas, 23 delas produziram também a TSST-1 representando 41,8%, 15 delas eram produtoras de SED (27,3%), 07 eram produtoras de SEC (12,7%), 17 produziram SEB (30,9%), 03 produziram SEA (5,5%). Das 17 amostras não hemolíticas, 07 delas produziram TSST-1 (41,2%), 03 amostras (17,6%) foram produtoras de SED. Apenas uma amostra produziu SEC (5,9%), do mesmo modo para SEB e SEA, houve apenas uma amostra produtora para cada toxina (5,9%). Pode-se notar uma tendência de maior produção de enterotoxina D e TSST-1 (toxinas de maior frequência nas 127 amostras testadas) entre as amostras produtoras de hemolisinas alfa e alfa/beta do que entre as produtoras de beta hemolisinas e não hemolíticas.



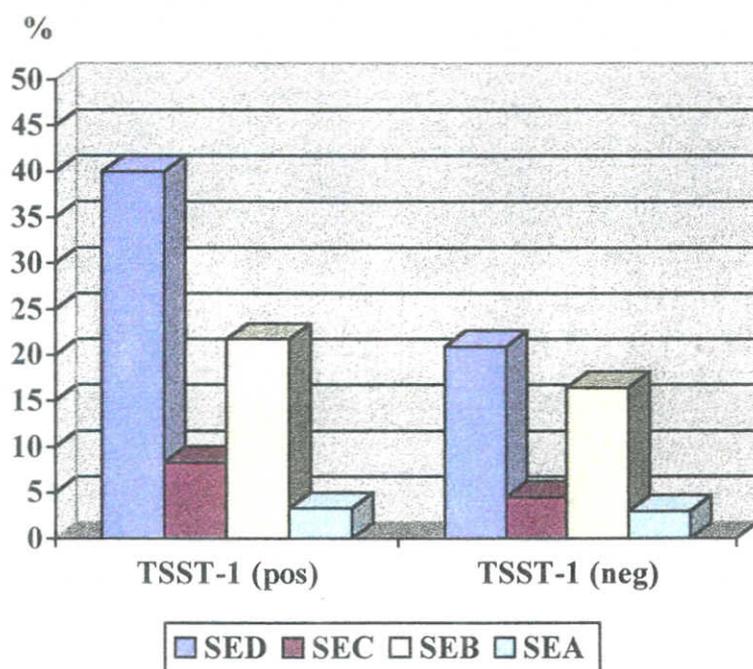
Ñ hemol. = amostras não hemolíticas

(n) = número de amostras positivas para a hemolisina

**Figura 8-** Distribuição das amostras hemolíticas e a percentagem destas que produziram toxinas, entre as 127 amostras de *S. aureus* isoladas de leite bovino em Minas Gerais no período de 1994-97.

#### 4.3.6- Enterotoxinas produzidas entre as amostras TSST-1 positivas e negativas

Analisando-se os dados da Figura 9, pode-se verificar que, das 60 amostras TSST-1 positivas, 24 amostras (40%) produziram a SED, cinco (8,3%) produziram SEC, 13 (21,7%) produziram SEB e duas (3,3%) produziram SEA. Das 67 amostras TSST-1 negativas apenas 14 delas (20,9%) produziram SED, três (4,5%) produziram SEC, 11 (16,4%) produziram SEB e duas (3%) produziram SEA.



**Figura 9-** Distribuição de SE's entre as amostras de *S. aureus*, TSST-1 positivas e negativas, isoladas de leite bovino em Minas Gerais de 1994-97.

## 5 DISCUSSÃO

### *5.1-Susceptibilidade das amostras frente aos antimicrobianos*

Em primeiro lugar deve-se salientar que os resultados apresentados foram de extrema importância pois, apesar das amostras serem advindas de várias bacias leiteiras do Estado de Minas Gerais, a maioria delas apresentou uma certa tendência de sensibilidade a determinados antimicrobianos, assim como resistência a outros. Os testes de susceptibilidade dos microrganismos frente aos antimicrobianos são de essencial importância para o controle terapêutico das mastites. Apesar da larga variedade genética entre os biotipos de *S. aureus*, existe uma possibilidade da predominância de alguns clones causarem infecções com maior frequência em animais, como foi observado por Musser et al. (1990), em humanos. Sendo assim, quanto maior o número de testes realizados em uma maior distribuição geográfica, pode-se visualizar melhor quais são os antimicrobianos indicados para o tratamento das mastites em uma região, estado ou país, além disto aumenta-se a possibilidade da detecção de amostras multi-resistentes. Existe porém alguns de fatores que contribuem negativamente para se alcançar este intento. Raramente o veterinário tem ao seu dispor a identificação dos agentes microbianos e sua susceptibilidade às drogas, como um guia inicial para as decisões sobre a terapia (Owens et al, 1997). Por este motivo, resultados como estes que aqui são descritos, servem como orientação para profissionais no momento de decidir qual o melhor antimicrobiano a ser indicado para o tratamento das IMI produzidas por estafilococos. Deve-se salientar entretanto, que a realização de antibiogramas é sempre recomendado, dado que a susceptibilidade

de *S. aureus* frente a antimicrobianos pode ser modificada ao longo do tempo dentro dos rebanhos, seja pela introdução de novos agentes bacterianos ou desenvolvimento de mutantes resistentes. Recentemente foi criado nos EUA o *Programa Nacional de Monitoramento da Susceptibilidade Antimicrobiana*, que foi inicialmente proposto pelo Centro de Medicina Veterinária do FDA, com posterior adesão do CDC e do USDA, com o intuito inicial de monitorar as mudanças ocorridas nas susceptibilidades antimicrobianas de patógenos isolados de casos clínicos animais e humanos em todo o país e de identificar amostras resistentes à maioria dos antimicrobianos existentes. É bem verdade que a despeito do contínuo problema das mastites de origem estafilocócica e dos diferentes esquemas para uso de antibióticos, tanto para tratamento como para prevenção das IMI, existe uma similaridade mundial no tocante aos padrões de sensibilidade destas bactérias frente aos antimicrobianos (Swartz et al., 1984; Riedner et al., 1987; Horovitz & Ziv, 1988; Mackie et al., 1988; Lange et al., 1996; Langoni et al., 1996; Schocken-Iturrino et al., 1996). Autores como Mackie et al. (1988) não encontraram evidências marcantes de alterações na sensibilidade dos *S. aureus* durante um período de quatro anos, contrastando com os resultados de Myllys et al (1998), que comprovaram alterações tanto na prevalência como no nível de resistência a antimicrobianos após dois levantamentos realizados com intervalos de sete anos. Neste trabalho entretanto, apesar dos microrganismos terem sido isolados entre 1994-1997, observa-se claramente que os padrões de sensibilidade das amostras frente a alguns antibióticos, se mantiveram os mesmos, com valores próximos de 100% como a cefotaxima, enrofloxacin e gentamicina, seguidos pela rifampicina e cefalotina. Seguindo-se os critérios propostos por Davidson (1980), os antimicrobianos que inibiram o crescimento de mais de 80% das amostras podem ser indicados para tratamento das IMI, principalmente porque existe uma alta correlação entre os resultados dos testes de susceptibilidade e os tratamentos (Hinckley et al, 1985). Por outro lado, estes resultados permitem a combinação de drogas a serem

utilizadas para o tratamento das infecções, uma vez que apenas uma delas demonstrou ser pouco efetiva (polimixina B). Assim, combinações como penicilina e novobiocina, gentamicina e enrofloxacina podem ser utilizadas como sugerem alguns autores (Owens et al., 1997; Silva et al., 1998), com amplas possibilidades de sucesso terapêutico. O fato de não determinar, entre as amostras trabalhadas, quais são produtoras ou não da enzima  $\beta$ -lactamase, não invalida esta sugestão, posto que existe discordância entre autores sobre a resistência de amostras de *S. aureus* aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Jones & Heath, 1985; Owens & Watts, 1988; Thornsberry et al., 1997; Watts & Salmon, 1997). Deve-se ressaltar, que embora 90,6% das amostras de *S. aureus* apresentem-se susceptíveis ao cloranfenicol, este antibiótico não está mais recomendado para tratamentos de infecções, tanto no homem como em animais, devido aos seus efeitos adversos.

### 5.2- Produção de hemolisinas

A produção de hemolisinas foi uma característica apresentada pela maioria das 127 amostras analisadas (86,6%). Estes resultados podem ser considerados normais em se tratando desta espécie de microorganismo, uma vez que os *S. aureus* isolados das IMI são classificados como hemolíticos (Bergdoll, 1989). Deve-se salientar entretanto, que o NMC (1987) considera que aproximadamente 5% das amostras de *S. aureus*, não são produtoras de hemólise. Este fato foi também constatado neste trabalho, onde 13,4% das amostras não produziram qualquer tipo de hemólise detectável, em placas de ágar sangue de ovino. Estas amostras no entanto, foram classificadas como *S. aureus* através de várias provas de identificação bioquímica, além da detecção da produção de enzimas como a coagulase e a TNase (Varnam & Evans, 1991; Quinn et al., 1994). Desta maneira a ausência ou presença de hemólise não pode ser considerada como prova classificatória para *S. aureus* isolados das IMI e sim apenas mais um dado a ser complementado. Deve-se ressaltar por outro lado, que a produção

de hemolisina é considerada fator de virulência e está diretamente relacionada aos quadros de mastite (Le Gall & Plommet, 1965; Ward et al. 1979). É importante salientar que estes microorganismos produzem outro tipo de hemolisina, a hemolisina delta, relacionada como fator de virulência por vários autores (Easmon & Adlam, 1983; Takeshigue et al., 1983; Coia et al., 1992; Matsunaga et al., 1993). Esta hemolisina pode ser considerada uma enterotoxina, por possuir ação patogênica no sistema digestivo, alterando a histologia do epitélio intestinal, quando administrada em altas doses (O'Brien & Kapral, 1976). No presente trabalho, as amostras foram avaliadas quanto aos seus respectivos comportamentos em placas de ágar sangue de equino, método recomendado para determinação da delta hemolisina (Quinn et al., 1994). Cerca de 17,3% das amostras que apresentaram hemólise completa neste substrato, foram consideradas como produtoras da delta hemolisina. Estes resultados são similares aos descritos por Matsunaga et al. (1993), que analisaram os fatores de virulência de 58 amostras de *S. aureus*, porém foram inferiores aos apresentados por Takeshigue et al. (1983) e Coia et al. (1992). Esta variação de resultados pode ser atribuída novamente, às diferentes origens destes microrganismos. Por outro lado, vale salientar, que apesar de constantemente detectada em amostras de *S. aureus*, existem poucos estudos relacionados à sua ação citotóxica sobre o epitélio mamário, mesmo sabendo-se que esta toxina possui ação citolítica (Easmon & Adlam, 1983). Deve-se destacar o fato da existência de amostras que apresentam os dois tipos de hemolisinas (alfa/beta) concomitantemente e que não é descrito por nenhum dos trabalhos consultados. Pelos resultados apresentados, pode-se observar que estas amostras são representativas (26,8%). Se for considerado o trabalho de Ward (1979) que descrevem serem os efeitos patogênicos das alfa/beta hemolisinas similares aos produzidos isoladamente pela alfa hemolisina, verifica-se que a soma de ambas representa a metade das hemolisinas produzidas pelas amostras de *S. aureus* isoladas neste experimento. Estes resultados são compatíveis com os descritos na literatura,

observando-se que existe uma variação nos achados de alfa e beta hemolisinas (Takeshigue et al., 1983; Kenny et al. 1992; Matsunaga et al., 1993). O importante é que estas exotoxinas são produzidas pela grande maioria das amostras de *S. aureus* como fator de virulência. O fato de terem sido feitas duas leituras se deve à característica de crescimento do próprio microrganismo, que leva de 24-48 horas de incubação (NMC, 1987) para expressar o aparecimento destas toxinas. Pode-se notar entretanto, que pequena parte das amostras expressou hemólise com 48 horas de incubação. O número de amostras hemolíticas aumentou e das não hemolíticas diminuiu. O fato de 6,3% das amostras apresentarem hemólise entre 24 e 48 horas de incubação, pode ser explicado pela baixa produção de hemolisinas por alguns sorotipos, levando um tempo maior para que a reação fosse visualizada, ou ainda, porque algumas amostras possuíam uma baixa concentração no inóculo. Desta maneira levaram mais tempo para atingir a fase logarítmica de crescimento e conseqüentemente de maior produção de toxinas. Todas as hemolisinas tipo delta se apresentaram entre 24-48 horas de incubação, isto se deve à sua lenta migração através do ágar como foi descrito por Quinn et al., 1994. Certo é que, de uma forma ou de outra, o número total de amostras que apresentou algum tipo de hemólise após incubação de 48 horas a 37°C, foi bastante expressivo e condizente com o que foi descrito na literatura até o presente momento, respeitando-se algumas variações.

### 5.3- Produção de toxinas (SE's & TSST-1)

A freqüência de amostras apresentando enterotoxigenicidade (42,5%) pode ser considerada alta comparando-se com os trabalhos descritos na literatura. Verifica-se uma grande variabilidade na freqüência de amostras produtoras de enterotoxinas (entre 0 e 35%) isoladas à partir de animais com IMI (Garcia et al., 1980; Kato & Kume, 1980; Takeshigue et al., 1983; Kenny et al., 1993; Matsunaga et al., 1993; Bogni et al., 1997) sendo poucos os relatos

de freqüências maiores (Ichikawa et al., 1996) que as descritas no presente trabalho. Entretanto no Brasil, Lopes et al., (1990) encontraram uma freqüência bem mais baixa, onde apenas 4,7% das amostras oriundas de vacas com quadros subclínicos de mastite, produziram algum tipo de SE. Estas diferenças de resultados podem ser, segundo Kenny et al. (1993), atribuídas à concentração das proteínas antes da imunodifusão ou refletir diferenças entre amostras de *S. aureus* de diferentes origens, sejam elas norte americanas, européias ou sul americanas. Desta maneira, Aarestrup et al. (1995) na Dinamarca, não encontraram nenhuma amostra enterotoxigênica entre 106 testadas, chegando à conclusão que o leite oriundo de vacas com mastite estafilocócica não apresenta, naquele país, riscos de causar intoxicações alimentares. Estes autores também consideram que esta diferença de resultados pode ser reflexo das diferentes fontes de contaminação extramamária nos diferentes países. Além disso, eles também ponderam que a produção de enterotoxinas parece não estar associada à capacidade de *S. aureus* em produzir mastite. Isto se torna óbvio ao primeiro contato com dados relativos à grande maioria dos trabalhos descritos, pois amostras não produtoras de enterotoxinas também são capazes de causar mastites. Deve-se considerar como fato importante, que estas toxinas são fatores de virulência expressados pela bactéria, portanto torna-se imperioso associar estas diferenças apresentadas nos trabalhos citados, ao tipo de mastite causada pelas amostras mais toxigênicas e menos toxigênicas. A participação destas toxinas na patogenicidade do agente causal, deve ser melhor investigada. O que se sabe é que existem diferenças entre as amostras de *S. aureus* causadoras de mastites super agudas e mastites agudas e crônicas (Matsunaga, 1993), porém estas diferenças não são óbvias entre as amostras isoladas de casos agudos e crônicos (Jonsson & Holmberg, 1981; Matsunaga et al., 1993). Em outras espécies como os caprinos, é citado na literatura a importância das enterotoxinas associadas às mastites estafilocócicas (Bezek & Hull, 1995). Analisando outros aspectos da produção de toxinas, Takeuchi et al., (1998) descrevem

altas percentagens (76,7%) de *S. aureus* produtores de TSST-1 isolados de mastites subclínicas, tanques de expansão (75,4%) e mastites clínicas (58,1%). Estes autores se dizem surpresos com a expressão dos números principalmente com aqueles encontrados nas mastites subclínicas e nos tanques de expansão. Por outro lado, Garcia et al. (1980) encontraram 7% de amostras enterotoxigênicas entre 58 testadas na Espanha e descreve que estes resultados indicam que o leite proveniente de vacas com mastites, pode ser fonte de intoxicação em humanos, salientam porém, que os riscos são relativamente baixos. No Brasil, Lopes et al. (1990) citam que a despeito das implicações em saúde pública, não têm sido realizados trabalhos epidemiológicos e sugerem, pelos dados encontrados, que as intoxicações alimentares podem ocorrer pelo uso de leite contaminado em nossa área geográfica. Estes autores assinalam entretanto, que a probabilidade de ocorrência destas intoxicações parece ser baixa, não representando um sério risco à saúde pública. Por outro lado, Takeshige et al. (1983) dizem ser de grande importância, sob o ponto de vista da saúde pública, a alta incidência de amostras de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas, isoladas a partir da glândula mamária. *S. aureus* isolados originalmente de casos de mastite podem ser agentes causadores de intoxicações alimentares. Neste sentido, Adesiyun (1993) e Ichikawa et al. (1996) descrevem os riscos do consumo de leite e derivados crus e também pasteurizados, posto que as enterotoxinas são termoestáveis. Entre estas enterotoxinas, deve-se citar a SEC que está freqüentemente relacionada às amostras de *S. aureus*, isoladas de leite oriundo de mastite bovina (Takeshigue et al., 1983; Lopes et al., 1990; Matsunaga, 1993; Ichikawa, 1996; Bogni et al., 1997), assim como de humanos infectados e portadores (Ichikawa et al., 1996; Soares et al., 1997). Por outro lado, amostras produtoras de outros tipos de toxinas (SEA e SEB) também são descritas (Adesiyun, 1994), SEA e SED (Refai et al., 1988). Verifica-se portanto, que existe uma grande variabilidade na apresentação das diferentes enterotoxinas por parte das amostras isoladas, principalmente daquelas isoladas à partir de várias fontes

diferentes (Aarestrup et al., 1995). Desta maneira, não se pode estabelecer um padrão de amostras toxigênicas causadoras de processos infecciosos em bovinos assim como em humanos, o que justifica plenamente os resultados aqui apresentados entretanto, a classificação das amostras isoladas de acordo com a toxina produzida e a fonte de infecção, tem sido objeto de discussão (Ichikawa et al, 1996). Bergdoll, (1989) sugere que normalmente, sorotipos estafilocócicos isolados de vacas produzem SEC ou SED, enquanto sorotipos isolados de humanos produzem primariamente SEA. Pela própria variabilidade dos dados aqui encontrados e de outros descritos na literatura, torna-se um tanto quanto simplista adotar a classificação das amostras pelo tipo de toxina produzida e a fonte isolada, mesmo porque na grande maioria dos trabalhos publicados, são encontradas todas as toxinas pesquisadas, variando-se apenas a frequência das mesmas. Deve-se salientar, que a detecção de amostras toxigênicas é de essencial importância para se evitar as intoxicações alimentares em humanos e para a produção higiênica do leite e derivados. Quanto maior for o número de amostras testadas, melhor será o perfil toxigênico levantado, assim como será melhor avaliada a relevância destas toxinas presentes no leite. Esta avaliação é vital em termos de saúde coletiva e da participação destas enterotoxinas, como fator de virulência sobre a glândula mamária dos animais. Neste sentido estudos epidemiológicos são sugeridos (Lopes et al., 1990; Matsunaga et al. 1993) assim como, estudos com a produção de antitoxinas para a terapia das mastites super-agudas (Bezek & Hull, 1995). O alto índice de amostras enterotoxigênicas deve ser considerado e melhor avaliado, principalmente em saúde pública, pois tratamentos térmicos do leite como a pasteurização, não são capazes de inativar estas SE's (Bergdoll, 1989), sendo um risco em potencial para os consumidores de bebidas lácteas. Vale ressaltar que não foram encontradas referências no que diz respeito à inativação de enterotoxinas pelo processo industrial de esterilização do leite. É bem verdade que a produção e quantidade das enterotoxinas estafilocócicas dependem das condições de incubação e do

crescimento do próprio microorganismo. Bergdoll (1989) cita que certas condições são necessárias para a enterotoxina estar presente no alimento: (a) o alimento deve ser um bom meio de crescimento para *S. aureus*; (b) sorotipos de *S. aureus* enterotoxigênicos devem estar presentes no alimento; (c) deve haver condições adequadas para o crescimento e a produção de enterotoxinas (tempo e temperatura suficientes). Assim a simples presença de amostras toxigênicas no leite não significa que irão ocorrer casos de intoxicações, porém o risco existe, principalmente se considerarmos que o *S. aureus* é o microorganismo mais envolvido nas IMI dos bovinos, que o leite é um excelente meio de crescimento para *S. aureus*, que a temperatura da glândula mamária é a ideal para a produção de enterotoxinas e que pequenas quantidades de enterotoxinas são necessárias para causar doença em humanos, principalmente em crianças. Das toxinas apresentadas no presente trabalho, houve amplo domínio da TSST-1 com 61 amostras (48,0%) e SED com 39 amostras positivas (30,4%), cujos resultados são similares aos descritos por Kenny et al. (1993). Alguns pesquisadores descrevem toxinas como a TSST-1 e a SEC como toxinas associadas às amostras causadoras de mastites super-agudas em bovinos (Jones e Wieneke, 1986; Matsunaga et al., 1993) e caprinos (Morgan et al., 1986; Bezek & Hull, 1995). Segundo estes autores, estas toxinas contribuem ativamente para a reação inflamatória que ocorre nas infecções estafilocócicas da glândula mamária. No entanto Takeuchi et al. (1998) descrevem altas percentagens de *S. aureus* (76,7%) produtores TSST-1 isolados de mastites subclínicas, uma explicação para estas diferenças estaria na quantidade de toxina produzida pelas amostras isoladas, necessárias para se causar mastites super-agudas ou subclínicas, é interessante ressaltar que não foram encontrados trabalhos que realizassem este tipo de investigação, ficando até como sugestão para futuros experimentos. Por outro lado uma mesma amostra de *S. aureus* pode produzir mais de um tipo de enterotoxina, como descrito neste trabalho. Resultados similares são descritos por outros autores acima citados, porém sem discutir

a importância de seus achados. Ressalta-se entretanto, que estes resultados são importantes, uma vez que a coprodução de diferentes tipos de toxinas serve para aumentar os efeitos toxigênicos destes antígenos, sendo sugerido que a coprodução de toxinas é importante na patogenia das infecções produzidas por este microorganismo (Soares et al. 1997). Do mesmo modo, Refai et al. (1988) demonstraram que existe uma associação entre a atividade enzimática específica, a enterotoxigenicidade e a resistência de *S. aureus* a vários antibióticos, principalmente naquelas amostras produtoras de mais de um tipo de enterotoxinas. Especificamente em relação à TSST-1 deve-se salientar que, em bovinos esta toxina ganhou notoriedade quanto aos aspectos patogênicos associados aos tipos super agudos de mastite (Jones & Wieneke, 1986). Como neste trabalho, a TSST-1 aparece frequentemente detectada em amostras causadoras de mastites bovinas, ovinas e caprinas, sendo muitas vezes relacionadas às infecções super agudas (Jones & Wieneke, 1986; Morgan et al., 1986; Matsunaga et al., 1993; Bezek & Hull, 1995). Parece ter grande importância na virulência das amostras de *S. aureus*, sendo sugerido estabelecer uma relação entre a produção desta toxina e a severidade dos casos de mastites (Matsunaga et al., 1993; Bezek & Hull, 1995). Neste trabalho não foi possível estabelecer este tipo de relação, uma vez que as amostras foram isoladas a partir de leite enviado ao Laboratório de Pesquisas em Bacterioses do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, para diagnóstico bacteriológico, não constando o histórico clínico ou a fase evolutiva do processo infeccioso da glândula mamária. Não foram encontrados dados na literatura brasileira sobre detecção de TSST-1 de origem animal, sugerindo que este trabalho aqui apresentado é o primeiro relato de detecção da TSST-1 produzida por *S. aureus* de origem animal, no Brasil. Assim como as enterotoxinas D e B, pois no trabalho realizado por Lopes et al., (1990) foram detectadas apenas as enterotoxinas A e C produzidas por amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina.

#### 5.4- Relação entre a produção de hemolisinas e toxinas

As amostras produtoras de hemolisinas alfa ou alfa/beta possuem maior poder patogênico, em comparação com amostras produtoras de beta hemolisinas (Ward et al., 1979; Bramley et al., 1989). Esta patogenicidade se vê aumentada pela produção concomitante de outras toxinas, como a TSST-1 e SED, que possuem propriedades altamente toxigênicas (Bergdoll & Chesney, 1991; Kenny et al., 1993). Assim, as amostras trabalhadas neste experimento, que foram produtoras de alfa hemolisinas, TSST-1 e SED, muito provavelmente são possuidoras de um alto grau de virulência. Por outro lado, um fato interessante é que a SEA, toxina normalmente isolada de alimentos, foi encontrada apenas nas amostras produtoras de beta hemolisinas e não hemolíticas, o mesmo ocorrendo com a SEC. Esta última porém, costuma ser descrita com frequência entre isolados de mastite (Kato & Kume, 1980; Takeshigue et al., 1983; Lopes et al., 1990; Kenny et al., 1993; Matsunaga et al., 1993), o que não ocorreu neste trabalho, onde a distribuição desta toxina entre as amostras foi relativamente pequena. Porém a SEB, a segunda mais encontrada entre os isolados, obedeceu a mesma ordem de distribuição que a SED ou seja, se concentrou entre as amostras produtoras de alfa e alfa/beta hemolisinas. São poucas as citações na literatura, que fazem referência às conseqüências destas associações de toxinas produzidas por *S. aureus*, sobre a glândula mamária. Tudo leva a crer, que a associação de determinados fatores de virulência por parte de diferentes amostras de *S. aureus* resultam em variados graus de patogenicidade destas bactérias. Como conseqüência, estes microrganismos induzem diferentes formas de apresentação clínica das IMI, que na maioria das vezes resultam em quadros clínicos muito severos. Portanto, amostras que possuem a capacidade de produzir mais de um fator de virulência e se estes fatores apresentarem um certo sinergismo, certamente os efeitos para a glândula mamária serão mais drásticos.

### *5.5- Produção de SE's pelas amostras TSST-1 positivas e negativas*

Foi possível perceber claramente na Figura 7, que houve uma maior produção das enterotoxinas entre as amostras TSST-1 positivas do que entre as amostras TSST-1 negativas. É importante citar que apenas um dos autores consultados (Matsunaga et al., 1993) fez este tipo de comparação e neste caso, apesar da distribuição da frequência das enterotoxinas ser diferente, a produção das mesmas foi do mesmo modo, mais expressiva entre as TSST-1 positivas do que entre as amostras TSST-1 negativas. Porém estes mesmos autores não descrevem em nenhum momento sobre qual a importância que existe sobre este fato, talvez isto se explique pelo modesto volume de estudos sobre as associações entre a produção destas toxinas e seus respectivos efeitos sobre o homem e os animais. A produção destes fatores de virulência envolvem complexos mecanismos que são codificados pelos genes e regulados por fatores intrínsecos e extrínsecos como mudança de temperatura e pH, entre outros. Possivelmente a biologia molecular possa desvendar quais os mecanismos que regem estas intrincadas expressões dos fatores de virulência destes microorganismos.

## 6 CONCLUSÕES

Existe grande variabilidade entre as amostras de *S. aureus* quanto a produção dos fatores de virulência pesquisados.

A TSST-1 e a SED são as principais exotoxinas produzidas por amostras de *S. aureus* isoladas de leite bovino em Minas Gerais.

Pela primeira vez foi descrito na literatura brasileira a detecção de TSST-1 produzida por amostras de *S. aureus* de origem animal.

O índice de amostras enterotoxigênicas encontrado foi considerado alto (42,5%), em comparação com a literatura científica consultada.

Existe risco considerável de intoxicações por enterotoxinas estafilocócicas através do leite de vaca em Minas Gerais.

Os antimicrobianos, Cefotaxima, Enrofloxacina, Gentamicina, Rifampicina, Cefalotina, Cloranfenicol, Cefoperazona, Oxacilina, Sulfazotrim, Novobiocina e Neomicina; são nesta ordem, os mais efetivos para o controle da mastite bovina, causada por *Staphylococcus aureus* em Minas Gerais.

### SUMMARY

*Staphylococcus aureus* has been isolated at high frequency from bovine milk. This microorganism produces a wide variety of virulence factors, which may contribute to the pathogenicity of this organism. In this study, 127 *S. aureus* strains isolated from bovine milk were examined for their productivity of virulence-associated factors and their susceptibility to antimicrobial drugs. The positive rates of the total isolates for various virulence factors were as follows: toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) (47,2%) and staphylococcal enterotoxins (SEA-D) (43,3%);  $\alpha$ -haemolysin (43,3%),  $\beta$ -haemolysin (43,3%) and  $\delta$ -haemolysin (17,3%); thermostable nuclease (TNase) and coagulase (100%). On the antimicrobial tests 127 (100 %) strains of *S. aureus* were susceptible to cefotaxime, 125 (98,4%) to gentamicin and enrofloxacin while resistance to ampicillin, penicillin and polymyxin B were most common with 80-82 (62 -64 %) of strains. The results provide evidence that these pathogens use different mechanisms to produce intramammary infections and their susceptibility to antimicrobial agents should be analyzed.

Key words: *Staphylococcus aureus*, toxins, antimicrobial drug susceptibility, bovine milk.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M., WEGENER, H.C., ROSDAHL, V.T. Lack of staphylococcal enterotoxin production among strains of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Denmark. **Acta Vet. Scan.**, v.36, p.273-275, 1995.
- ADESIYUN, A.A. Bacteriological quality and associated public health risk of pre-processed bovine milk in Trinidad. **Int. J. Food Microbiol.**, v.21, p.253-261, 1994.
- ADLAM, C., WARD, P.D., TURNER, W.H. ET AL. The role of toxins and antitoxins in staphylococcal mastitis. **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.**, supl.10, p.647-650, 1981.
- ALI-VEHMAS, T., WESTPHALEN, P., MYLLYS, V. et al. Binding of *Staphylococcus aureus* to milk fat globules increases resistance to penicillin-G. **J. Dairy Res.**, n.64, p.253-260, 1997.
- ANDERSON, J.C. Experimental staphylococcal mastitis in the mouse: the induction of chronic mastitis and its response to antibiotic therapy. **J. Comp. Pathol.**, v.87, p.611-621, 1977.
- ANDERSON, J.C., Veterinary aspects of staphylococci. In: EASMON, C.S.F., ADLAM, C. (eds) **Staphylococci and staphylococcal infections**. London: Academic Press, 1983. v.1, p.193-241.

- ARVIDSON, S.O. Extracellular enzymes of *Staphylococcus aureus*. In: EASMON, C.S.F., ADLAM, C. (eds) **Staphylococci and staphylococcal infections**. London: Academic Press, 1983, v.2, p.745-808.
- BARRY, A.L., LACHICA, R.V., ATCHISON, F.W. Identification of *Staphylococcus aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. **Appl. Microbiol.**, v.25, n.3, p.496-497, 1973.
- BAUER, A.W., KIRB, W.M.M., SHERRIS, J.C. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 45, p. 493-496, 1966.
- BERGDOLL, M.S., Detection of the staphylococcal toxins. **Adv. Exp. Med. Biol.**, n.391, p.465-479, 1996.
- BERGDOLL, M.S., *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M.P. (Ed.) **Foodborne Bacterial Pathogens**. New York: Inc. Marcel Dekker, 1989. p.464-523.
- BERGDOLL, M.S., CHESNEY, P.J. **Toxic Shock Syndrome**. Boston: CRC Press, 1991, 235 p.
- BEZEK, D.M., HULL, B.L. Peracute gangrenous mastitis and cheilitis associated with enterotoxin-secreting *Staphylococcus aureus* in a goat. **Can. Vet. J.** v.36, p.106-107, 1995.
- BHAKDI, S., TRANUM-JENSEN, J. Alfa toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiol. Rev.** n.55, p.733-751, 1991.
- BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**, 23<sup>a</sup> ed., São Paulo: Melhoramentos, 1984, 1234 p.

- BOGNI, C., RASPANTI, C., ODIERNO, L. et al. Síntesis de enterotoxinas y resistencia a antibióticos de estafilococos aislados de mastitis bovina. **Rev Med. Vet.**, v.78, n.4, p.236-239, 1997.
- BRAMLEY, A.J., DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: Mastitis control: progress and prospects. **J. Dairy Res.**, n.51, p.481-512, 1984.
- BRAMLEY, A.J., PATEL, A.H., O'REILLY, M. et al. Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of *Staphylococcus aureus* for the mouse mammary gland. **Infect. Immun.**, v.57, p.2489-2494, 1989.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria Executiva, SIH/SUS, DATASUS, Brasília-DF, 1998.
- CHOI, Y., KOTZIN, B., HERRON, L. et al. Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin superantigens with human T-cells. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA**, n.86, p.8941-8945, 1989.
- COIA, J.E., BROWNING, L., HAINES, L., et al. Comparison of enterotoxins and haemolysins produced by methicillin-resistant (MRSA) and sensitive (MSSA) *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, v.36, p.164-171, 1992.
- CRAVEN, N., ANDERSON, J.C. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action *in vitro* and *in vivo*. **J. Dairy Sci.**, n.51, p.513-523, 1984.
- DAVIDSON, J.N. Antibiotic resistance patterns in bovine mastitis pathogens. **Proceeding. 19th Annu. Meet. Natl. Mastitis Council**, 181-185, 1980.

- DERBYSHIRE, J.B. Studies in immunity to experimental staphylococcal mastitis in the goat and the cow. **J. Comp. Pathol. Ther.**, v.70, p.222-231, 1960.
- DONNELLY, R.P., ROGERS, T.J., Immunosuppression induced by staphylococcal enterotoxin B. **Cell. Immunol**, n.72, p.166-177, 1982.
- DORELLA FILHO, N. **Comparação analítica de termonuclease e o crescimento estafilocócico no leite e laticínios**. Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 1982, 60p. Dissertação (Mestrado).
- EASMON, C.S.F., ADLAM, C. **Staphylococci and staphylococcal infections**. vol.1-2, London: Academic Press, 1983, 827p.
- EASMON, C.S.F., GOODFELLOW, M. Staphylococcus and Micrococcus, in: **Principles in Bacteriology, Virology and Immunity**, v.2, 8th ed., Parker and Duerden eds., Edward Arnold, London, 1972, 543p.
- ELLIS, J.A., GODSON, D., CAMPOS, M. et al. Capture immunoassay for ruminant tumor necrosis factor-alpha: comparison with bioassay. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.35, p.289-300, 1993.
- ENG, R.H., PADBERT, F.T., SMITH, S.M. et al. Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and no growing bacteria. **Antimicrob. Agents Chemotherapy**. n. 35, p.1824-1828, 1991.

- FAST, D.J., SCHLIEVERT, P.M., NELSON, R.D. Nonpurulent response to toxic shock syndrome toxin 1-producing *Staphylococcus aureus*: relationship to toxin-stimulated production of tumor necrosis factor. **J. Immunol.**, v.140, p.949-953, 1988.
- FORSGREN, A. Pathogenicity of *Staphylococcus aureus* mutants in general and local infections. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. B.** v. 80, p. 564-570, 1972.
- GARCIA, M.L., MORENO, B., BERGDOLL, M.S. Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. **Appl. Environ. Microbiol.** v.39, p.548-553, 1980.
- GILMOUR, A., HARVEY, J. Staphylococci in milk and milk products. In: Jones, D., Board, R.C. (eds.). **Staphylococci. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Supl.**69, p.1475-1665, 1990.
- HAJEK, V., MARSALEK, E. Evaluation of classificatory criteria for staphylococci. **Zentralbl. Bakteriol. Hyg., suppl.**5, p.11-21, 1976.
- HARVEY, J., GILMOUR, A. Application of current methods for isolation and identification of staphylococci in raw bovine milk. **J. Appl. Bacteriol.** v.59, p.207-221, 1985.
- HINCKLEY, L.S., BENSON, R.H., POST, J.E., et al. Antibiotic susceptibility profiles for mastitis treatment. **J. Amer. Vet. Med. Assoc.**, v.187, p.709-711, 1985.
- HOROVITZ, C.T., ZIV, G. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* of bovine udder origin to antimicrobial drugs and heavy metals. **Isr. J. Vet. Med.**, v.44, n.2, p.119-123, 1988.

- ICHICAWA, M., ICHICAWA, T., MIZOMOTO, T. Productivity of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1, and coagulase type of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovines and humans in the same district. **Anim. Sci. Technol.**, v. 67, n. 09, p. 780-786, 1996.
- IGARASHI, H., FUJIKAWA, H., SHINGAKI, M. et al. Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1. **J. Clin. Microbiol.** v.23, p.509-512, 1986.
- IKEJIMA, T., OKUSAWA, J.W., VAN DER MEER, J.W.M. et al. Induction by toxic-shock-syndrome toxin-1 of a circulating tumor necrosis factor-like substance in rabbits and of immunoreactive tumor necrosis factor and interleukin-1 from human mononuclear cells. **J. Infect. Dis.**, n.158, p.1017-1025, 1988.
- JONES, T.O., HEATH, P.J.  $\beta$ -Lactamase production in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk. **Vet. Rec.**, v.317, p.340, 1985.
- JONES, T.O., WIENEKE, A.A. Staphylococcal toxic shock syndrome. **Vet. Rec.** v.25, oct., 1986.
- JONSSON, P., HOLMBERG, O. *Staphylococcus aureus* isolated from acute and chronic mastitis. Comparative studies on bacterial surface characteristics, biochemical properties and phage typing. in: **Staphylococci and Staphylococcal Infections**, Jeljaszewicz ed., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1981, 1483p.

- JONSSON, P., LINDBERG, M., HARALDSSON, I. et al. Virulence of *Staphylococcus aureus* in a mouse mastitis model: studies of alpha hemolysin, coagulase and protein A as possible virulence determinants with protoplast fusion and gene cloning. **Infect. Immun.**, v.49, p.765-769, 1985.
- KATO, E., KUME, T. Enterotoxigenicity of bovine staphylococci isolated from California Mastitis Test - positive milk in Japan. **Jpn J. Vet. Res.**, n.28, p.75-85, 1980.
- KENNY, K., BASTIDA, F.D., NORCROSS, N.L. Secretion of alpha-hemolysin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. **Can. J. Vet. Res.**, n.56, p.265-268, 1992.
- KENNY, K., REISER, R.F., BASTIDA-CORCUERA, F.D. et al. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, p.706-707, 1993.
- KINSMAN, O., JONSSON, P., HARALDSSON, I., et al. Decrease virulence of alpha haemolysin negative and coagulase negative mutants of *Staphylococcus aureus* in experimental mastitis in mice. **Zentralbl. Bakteriell. Mikrobiol. Hyg.,suppl.10**, 651-659, 1981.
- KLOOS, W.E., LAMBE, JR., D.W. *Staphylococcus*. in: BALOWS, A. Manual of clinical microbiology. 5th ed. Washington, D.C.: **Am. Soc. Microbiol.**, 1991. 1500p.
- LACHICA, R.V.F., WEISS, K.F., DEIBEL,R.H. Detection of nuclease activity in semisolid and broth cultures. **Appl. Microbiol.**, v.18, n.2, p.174-176, 1969.

- LANGE, C.C., CARDOSO, M.R.I., PIANTA, C. Susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*, isolados de mastite bovina em Porto Alegre, RS, Brasil. Anais do XV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias. Campo Grande-Brasil, 21-25 outubro, 1996.
- LANGONI, H., LISTONI, F.J.P., MERTENS, S.A., et al. Susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic milk samples, in São Paulo State. Anais do XV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias. Campo Grande - Brasil, 21-25 outubro, 1996.
- LE GALL, A., PLOMMET, M. Observations sur la croissance des staphylocoques et al réaction leucocytaire au cours des premières heures de al mammitte expérimentale de la brebis. **Ann. Biol. Anim. Boch. Biophys.**, v.5, p.113-130, 1965.
- LEE, J.C. The prospects for developing a vaccine against *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol.**, v.4, n.4, p.162-168, 1996.
- LOPES, C.A.M., MORENO, G., CURI, P.R. et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Brasil. **Br. Vet. J.**, n.146, v.05, p.443-446, 1990.
- LOUHI, M., INKINEN, K., MYLLYS, V. et al. Relevance of sensitivity testings (MIC) of *S. aureus* to predict the antibacterial action in milk. **J. Vet. Med.**, n.39, p.723-731, 1992.
- MACKIE, D.P., LOGAN, E.F., POLLOCK, D.A. et al. Antibiotic sensivity of bovine staphylococcal and coliform mastitis isolates over four years. **Vet. Rec.**, v.123, p.515-517, 1988.

- MATSUNAGA, T., KAMATA, S., KIKIICHI, N. et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **J. Med. Sci.**, v.55, n.02, p.297-300, 1993.
- MENZIES, R.E. Comparison of coagulase, deoxyribonuclease (DNase), and heat-stable nuclease tests for identification of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Pathol.**, v.30, n.7, p.606-608, 1977.
- MICUSAN, V.V., DESROSIERS, M., GOSSELIN, J. et al. Stimulation of T cells and induction of interferon by toxic shock syndrome toxin 1. **Rev. Infect. Dis.**, v.11, suppl.1, p.305-312, 1989.
- MILES, H., LESSER, W., SEARS, P. The economic implications of bioengineered mastitis control. **J. Dairy Sci.**, v.75, p.596-605, 1992.
- MORGAN, K.L., GRUFFYDD-JONES, E., WIENEKE, A.A., et al. Staphylococcal toxic shock syndrome. **Vet. Rec.**, v.29, nov., 1986.
- MULLIGAN, M.E., ARBEIT, R.D. Epidemiologic and clinical utility among typing systems for differentiating among strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.** n.31, p.2000-2003, 1991.
- MUNRO, G.L., GRIEVE, P.A., KITCHEN, B.J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **Australian J. Dairy Tech.** March, p.07-16, 1984.

- MUSSER, J.M., SCHLIEVERT, P.M., CHOW, A.W., et al. A single clone of *Staphylococcus aureus* causes de majority of cases of toxic shock syndrome. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.87, n.1, p.225-229, 1990.
- MYLLYS, V., ASPLUND, K., BROFELDT, E., et al. Bovine mastitis in Finland in 1988 and 1995 – Changes in prevalence and antimicrobial resistance. **Acta Vet. Scan.**, v.39, n.1, p.119-126, 1998.
- MYLLYS, V., LOUHI, M., ALI-BEHMAS, T. Comparison of penicillin-G susceptibility testing methods of staphilococci isolated from bovine mastitis. **J. Vet. Med.**, n.39, p.723-731, 1992.
- NADER FILHO, A., ROSSI JÚNIOR, O.D., AMARAL, L.A. et al. Sensibilidade dos *Staphylococcus aureus*, isolados em casos de mastites bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.38, n.4, p.581-588, 1986.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL RESEARCH COMMITTEE. **Laboratory and field handbook on bovine mastitis.** Fort Atkinson: Hoard & Sons Co., 1987. 208p.
- O'BRIEN, A.D., KAPRAL, F.A. Increase cyclic adenosine 3',5'-monophosphate content in guinea pig ileum after exposure to *Staphylococcus aureus* delta toxin. **Infect. Immun.**, v.13, p.152-162, 1976.
- OWENS, W.E. & WATTS, J.L. Antimicrobics susceptibility and  $\beta$ -lactamase testing of staphylococci isolated from dairy herds. **J. Dairy Sci.**, 71: 1934-1937, 1988.

- OWENS, W.E., RAY, C.H., WASHBURN, P.J. Effect of selected antibiotics on *Staphylococcus aureus* present in milk from infected mammary glands. **J. Vet. Med.**, n.40, p.508-514, 1993.
- OWENS, W.E., RAY, C.H., WATTS, J.L. et al. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility tests for bovine mastitis. **J. Dairy Sci.**, v.80, p.313-317, 1997.
- PINTO, M., TORTEN, M., BIRNBAUM, S.C. Suppression of the in vivo humoral and cellular immune response by staphylococcal enterotoxin B. **Transpl.**, n.25, p.320-323, 1978.
- PLOMMET, M., LE GALL, A. Mammite staphylococique de la brebis. III Recherches sur l'immunité antitoxique et antimicrobienne. **Ann. Inst. Pasteur**, v.104, p.779-796, 1963.
- POUTREL, B., CAFFIN, J.P. A sensitive microassay for the determination of haemolytic complement activity in bovine milk. **Vet Immunol. Immunopathol.**, n.05, p.177-184, 1983.
- QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B., et al. **Clinical Veterinary Microbiology**, London: Wolfe, 1994, 648 p.
- RAYMAN, M.K., PARK, C.E., PHILPOT, J. et al. Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *Staphylococcus aureus*. **Appl. Microbiol.**, v.29, p.451-454, 1975.
- REFAI, M., NIAZI, Z.M., YOUSSEF, S.A.H. et al. Correlation between antibiotic-resistance, enterotoxigenicity and enzymatic activities of *Staphylococcus aureus* recovered from foods. **Vet. Med. J.**, n.36, v.01, p.107-119, 1988.

- REID, W.B., WILSON, B.J. A study of the staphylococci associated with the bovine udder. **Am. J. Vet. Res.** v.20, p.825-831, 1959.
- RIEDNER, S., ALBUQUERQUE, A.J.D., BADKE, M.R.T., et al. Resistência de bactérias isoladas do leite de vacas frente a doze drogas antibacterianas. **Rev Centro de Ciências Rurais Santa Maria**, n.17, v.3, p.251-260, 1987.
- ROBBINS, R., GOULD, S., BERGDOLL, M.S. Detecting the enterogenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Appl. Microbiol.**, v.28, p.946-950, 1974.
- RUPP, M.E., HAN, J., GATERMANN, S. Hemagglutination by *Staphylococcus aureus* strains responsible for human bacteremia or bovine mastitis. **Med. Microbiol. Immunol.**, v.184, p. 33-36, 1995.
- SCHOCKEN-ITURRINO, R.P., NADER FILHO, R.P., ALMEIDA, G.P.C. et al. Sensibilidade dos *Staphylococcus coagulase positiva*, isolados em casos de mastite subclínica bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. Anais do XV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias. Campo Grande-Brasil, 21-25 outubro, 1996.
- SILVA, N., LOBATO, F.C.F., CARDOSO, H.F.T. et al. Success of antibiotic therapy for control of staphylococci mastitis in dairy herd. **J. Vet. Med. B**, 1998. (Submetido à publicação)
- SOARES, M.J.S., TOKUMARU-MIYAZAKI, N.H., NOLETO, A.L.S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of brazilian epidemic MRSA clone (III::B:A) among isolates from food handlers. **J. Med. Microbiol.**, v.46, p.214-221, 1997.

- SPIEGEL, M.R. **Schalm's outline of theory and problems of estatistics**. Schaum Publishing Co., USA, 1979, 580p.
- SUTRA, L., POUTREL, B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, v. 40, p. 79-89, 1994.
- SWARTZ, R., JOOSTE, P.J., NOVELLO, J.C. Antibiotic susceptibility patterns of mastitis pathogens isolated from bloemfontein dairy herds. **J. South African Vet. Assoc.**, v.55, n.4, p.187-193, 1984.
- TAKESHIGE, K., WATANABE, K., IGARASHI, H. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis and some characteristics with special reference to enterotoxin producibility and coagulase types isolates. **Jpn. J. Vet. Sci.**, n.45, v.03, p.355-362, 1983.
- TAKEUCHI, S., ISHIGURO, K., IKEGAMI, M. et al. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. **Vet. Microbiol.**, n.59, p.251-258, 1998.
- THORNSBERRY, C., BURTON, Y.C., YEE, J.L., et al. The activity of a combination of penicillin and novobiocin against bovine mastitis pathogens: development of a disk diffusion test. **J. Dairy Sci.**, v.80, p.423, 1997.
- VARNAM, A.H., EVANS, M.G., **Foodborne pathogens an illustrated text**. London: Wolfe, 1991. 557p.

- WARD, P.D., ADLAM, C., MCCARTNEY, A.C., et al. A histopathological study of the effects of highly purified staphylococcal alpha and beta toxins on the lactating mammary gland and skin of the rabbit. **J. Comp. Pathol.**, v.89, p.169-177, 1979.
- WATTS, J.L., SALMON, S.A. Activity of selected antimicrobiol agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce  $\beta$ -lactamase. **J. Dairy Sci.**, v.80, p,788-791, 1997.
- WELLS, S.J., OTT, S.L. Individual and bulk tank milk somatic cell count results: What's the quality of the U.S. supply? **Proc. 34<sup>th</sup> Ann. Meet. Natl. Mast. Council.**, 1996.
- WIENEKE, A.A., ROBERTS, D., GILBERT, R.J., Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-1990. **Epidemiol. Infect.**, n.110, v.3, p.519-531, 1993.