

**Júnia Pacheco Teixeira**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, GENOTÍPICA E AVALIAÇÃO  
POR PCR DO POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO DE *Staphylococcus  
aureus* EM AMOSTRAS DE LEITE CRU REFRIGERADO.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Nivaldo da Silva

Co-orientador Prof. Leorges Moraes da Fonseca

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária  
2013**

T266c Teixeira, Júnia Pacheco, 1975-

Caracterização fenotípica, genotípica e avaliação por PCR do potencial enterotoxigênico de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite cru refrigerado / Júnia Pacheco Teixeira. – 2013.

69p : il.

Orientador: Nivaldo da Silva

Co-orientador: Leorges Moraes da Fonseca

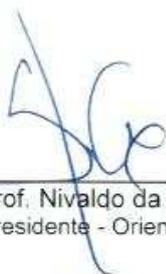
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Leite – Análise – Teses. 2. Estafilococos áureos – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. 4. Enterotoxinas – Teses. I. Silva, Nivaldo. II. Fonseca, Leorges Moraes da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD - 637

Tese defendida e aprovada em 28 de maio de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:



---

Prof. Nivaldo da Silva  
Presidente - Orientador



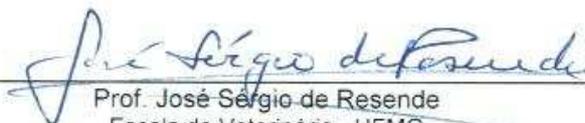
---

Prof. Geraldo Marcio da Costa  
Universidade Federal de Lavras



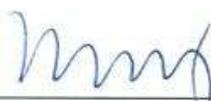
---

Dr. Luiz Simeão do Carmo  
Fundação Ezequiel Dias



---

Prof. José Sérgio de Resende  
Escola de Veterinária - UFMG



---

Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins  
Escola de Veterinária - UFMG



---

Dr. Ricardo Souza Dias  
Fundação Ezequiel Dias



## AGRADECIMENTOS

À Deus, que está sempre comigo.

Ao Prof. Dr. Nivaldo da Silva, pela orientação, dedicação, respeito e confiança.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, dedicação e incentivo.

Ao meu marido Jorge e à minha filha Nina pelo amor e cumplicidade.

Aos meus irmãos pela amizade e companheirismo.

A minha amiga Érica Leandro M. Vieira por estar sempre presente.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e à Escola de Veterinária da UFMG.

Aos colegas do DMVP, André Almeida Fernandes, Antônio Benjamin de Paula, Eduardo Nunes Nogueira, Nádia Maria da Silva, Nelson Éder Martins e Sônia Rita do Nascimento pelo convívio, respeito, incentivo e ombro amigo.

Ao laboratório Aquavet.

Ao Laboratório de Bacterioses (Anaeróbios).

Ao laboratório de Pesquisa em Virologia Animal.

Ao CNPq pelo financiamento e incentivo à pesquisa, especialmente a este trabalho (sob o número 578407/2008-6), que faz parte do Projeto Integrado de Pesquisa em Qualidade do Leite.

Aos coordenadores do Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG (Lab UFMG) pelas amostras cedidas.

### Agradecimentos



Universidade Federal de Minas Gerais



---

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. LITERATURA CONSULTADA.....</b>	<b>15</b>
2.1 Leite.....	15
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
2.3 Enterotoxinas estafilocócicas.....	19
2.4 PCR multiplex e enterotoxinas estafilocócicas.....	23
2.5 Gene <i>femA</i> .....	24
2.6 Gene <i>mecA</i> .....	25
2.7 Resistência aos antimicrobianos.....	27
<b>3. HIPÓTESES.....</b>	<b>31</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
4.1 Objetivo geral.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
5.1 Local de realização do experimento.....	31
5.2 Amostras de leite.....	31
5.2.1 Colônias isoladas a partir das amostras de leite.....	32
5.2.2 Extração de DNA.....	33
5.3 Utilização de reação em cadeia da polimerase – PCR.....	34
5.3.1 Detecção do gene <i>femA</i> pela técnica da PCR.....	34
5.3.1.2 Detecção do gene <i>femA</i> em colônias isoladas a partir do leite.....	34
5.3.1.3 Detecção do gene <i>femA</i> diretamente do leite.....	35
5.3.1.4 Sensibilidade do método de PCR para detecção do gene <i>femA</i> .....	35
5.3.2 Detecção do gene <i>mecA</i> em colônias isoladas a partir do leite.....	35
5.3.3 PCR bplex e detecção dos genes <i>femA+mecA</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. isolados a partir do leite.....	36
5.3.4 Detecção dos genes codificadores para as enterotoxinas estafilocócicas.....	36
5.3.5 Visualização dos produtos amplificados.....	37
<b>6. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR.....</b>	<b>37</b>

<b>7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....</b>	<b>38</b>
7.1 Diluição dos antimicrobianos e preparação das soluções de trabalho.....	39
7.2 Preparação das placas com antimicrobianos.....	39
7.3 Preparação do inóculo e execução do teste de CIM.....	41
<b>8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>41</b>
<b>9. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>41</b>
9.1 Isolamento de micro-organismos.....	41
9.2 Sensibilidade da técnica de PCR para o gene <i>femA</i> .....	41
9.3 Detecção do gene <i>femA</i> .....	42
9.3.1 Gene <i>femA</i> em colônias de <i>S. aureus</i> isoladas a partir do leite.....	42
9.3.2 Detecção do gene <i>femA</i> diretamente de amostras de leite.....	44
9.4 Detecção do gene <i>mecA</i> .....	45
9.4.1 Detecção do gene <i>mecA</i> em colônias de <i>S. aureus</i> isoladas a partir do leite.....	45
9.4.2 PCR bplex para detecção dos genes <i>femA</i> + <i>mecA</i> das colônias isoladas a partir das amostras de leite.....	46
9.5 PCR Multiplex para detecção dos genes das enterotoxinas estafilocócicas.....	48
<b>10. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO DE DISCO EM ÁGAR.....</b>	<b>51</b>
<b>11. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM.....</b>	<b>55</b>
<b>12 – CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>
<b>14. ANEXO I - PRANCHA DE FOTOS.....</b>	<b>69</b>

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1	Sequência de primers utilizados para detecção do gene <i>femA</i> para identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> , sequência de oligonucleotídeos e tamanho esperado do produto de PCR.....	34
Tabela 2	Sequência de primers utilizados para detecção do gene <i>mecA</i> para resistência à meticilina.....	35
Tabela 3	Sequência de primers utilizados para detecção dos genes das enterotoxinas estafilocócicas.....	36
Tabela 4	Normas interpretativas do teste de disco-difusão em ágar para <i>Staphylococcus</i> spp., de acordo com Methods, 2009.....	38
Tabela 5	Normas interpretativas do teste de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) para <i>S. aureus</i> e <i>Staphylococcus</i> spp., de acordo com Performance, (2010).....	41
Tabela 6	Presença do gene <i>femA</i> em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. das amostras de leite cru e sua distribuição pelas mesorregiões do Estado de Minas Gerais, 2010.....	43
Tabela 7	Presença do gene <i>mecA</i> em <i>S. aureus</i> isolados de amostras de leite cru refrigerado de bovinos provenientes de cinco mesorregiões do Estado de Minas Gerais, 2010.....	46
Tabela 8	Presença dos genes <i>seA</i> , <i>seB</i> e <i>seC</i> em <i>S. aureus</i> isolados de amostras de leite cru refrigerado de bovinos provenientes de cinco mesorregiões do Estado de Minas Gerais, 2010.....	49
Tabela 9	Concentração inibitória mínima-CIM das amostras de <i>S. aureus</i> e respostas de susceptibilidade às diferentes concentrações dos agentes antimicrobianos testados.....	56
Tabela 10	Concentração inibitória mínima-CIM das amostras de <i>Staphylococcus</i> spp. e respostas de susceptibilidade às diferentes concentrações dos agentes antimicrobianos testados.....	56

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1	<i>Staphylococcus aureus</i> em microscopia (cachos) e seu aspecto na placa de ágar sangue.....	16
Figura 2	Regiões de origem das amostras de leite.....	32
Figura 3	Replicador de Steer - Parte superior (A) e inferior (B) do replicador. (C) ilustração do esquema de aplicação nas placas de ágar Mueller Hinton -	

	MH, (D) vista superior da placa com os inóculos. Adaptado de Carvalho, 2005.....	40
Figura 4	Produtos de PCR obtidos com DNA extraído a partir de diluições seriadas de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 utilizando iniciador femA(132pb).....	42
Figura 5	Reação em cadeia pela polimerase –PCR para detecção do gene femA (132pb) em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. das amostras de leite cru.....	43
Figura 6	Reação em cadeia pela polimerase –PCR - para detecção do gene femA (132pb) diretamente das amostras de leite cru.....	44
Figura 7	Reação biplexPCR - para detecção dos genes femA (132pb) e mecA (533pb) em colônias de <i>S. aureus</i> isoladas de amostras de leite bovino.....	46
Figura 8	PCR convencional e multiplex para detecção dos genes seA com 120 pb, seB com 478 pb e seC com 257 pb, de <i>S. aureus</i> produtores de enterotoxinas estafilocócicas.....	48
Figura 9	PCR multiplex para detecção dos genes seA (120 pb), seB (478 pb) e seC (257 pb), nos isolados de <i>S. aureus</i> estudados em leite cru refrigerado....	49
Figura 10	Isolado experimental de <i>S. aureus</i> e visualização de halos de inibição (por mensuração do diâmetro em milímetros) pelo método de disco-difusão em Agar.....	52
Figura 11	Perfil de susceptibilidade frente aos antimicrobianos testados das colônias de <i>S. aureus</i> isoladas a partir de leite cru de cinco mesorregiões do Estado de Minas Gerais, 2010.....	52
Figura 12	Perfil de susceptibilidade frente aos antimicrobianos testados das colônias de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas a partir de leite de cinco mesorregiões do estado de Minas Gerais, 2010.....	53
Figura 13	Susceptibilidade dos isolados de <i>S. aureus</i> pelo teste CIM frente a um dos antimicrobianos testados.....	55

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American type culture collection
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
CIM	Concentração inibitória mínima
CS	Células somáticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
femA	Gene para identificação fenotípica de <i>S. aureus</i>
IIM	Infecções intramamárias
IN62	Instrução normativa 62
mecA	Gene de resistência à meticilina
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NCCLS	National committee for clinical laboratory standards
pb	Pares de base
PBP	“Penicillin-binding proteins” ou proteínas de ligação à penicilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
SEs	Enterotoxinas estafilocócicas
SUT	Sulfametoxazole + trimetoprim
UFC	Unidade formadora de colônia

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* tem sido associado a surtos de origem alimentar, em virtude da capacidade de produzirem enterotoxinas. Dentre os alimentos envolvidos nestas intoxicações estão o leite e seus derivados, em decorrência de contaminação por estes patógenos que são os principais causadores da mastite bovina. Neste trabalho foi realizada a identificação de *S. aureus* e a avaliação do seu potencial enterotoxigênico, a partir de amostras de leite cru refrigerado de bovinos, obtidas do Laboratório de Análise da Qualidade de Leite da Escola de Veterinária da UFMG (LabUFMG), no período de Julho de 2009 a Março de 2010. Foram analisadas 251 amostras de leite de tanque de expansão e destas, foram obtidos 278 isolados de *S. aureus* (86,06%) e 45 isolados de *Staphylococcus coagulase negativas-SCN* (13,93%), pelos métodos microbiológicos de rotina. Estes isolados foram avaliados, por PCR convencional e bplex, para amplificação dos genes *femA* e *mecA*, e por PCR multiplex para pesquisa dos genes que codificam as enterotoxinas estafilocócicas. O percentual de 82,06%, para a presença do gene *femA*, entre os isolados de *S. aureus*, sugere o uso desta ferramenta para a identificação desta bactéria a partir do leite. Em 12 isolados, 4,31% deles apresentaram o gene *mecA*, identificando a presença de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), nas amostras de leite trabalhadas. Entre as enterotoxinas estafilocócicas predominaram a seA e seB (1,07% cada). As presenças de genes de enterotoxinas e de amostras de MRSA evidenciam o potencial enterotoxigênico dos *S. aureus* isolados do leite originado de animais com mastites, e os riscos que isto pode apresentar para a saúde pública. *S. aureus*, avaliados pelo método de disco-difusão em ágar, apresentaram susceptibilidade à gentamicina (94%) e resistência à penicilina (90%) e a enrofloxacina (58%). Ao teste de concentração inibitória mínima–CIM, os isolados de *S. aureus* apresentaram susceptibilidade à enrofloxacina (92,54% e CIM<sub>90</sub> 4 µg/mL) e gentamicina (80% e CIM<sub>90</sub> 16 µg/mL) e resistência à penicilina G (18,47% e CIM<sub>90</sub> 64 µg/mL).

**Palavras-Chave:** leite bovino, mastite, *Staphylococcus aureus*, *femA*, *mecA*, MRSA, enterotoxinas estafilocócicas, PCR multiplex, concentração inibitória mínima.

## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* has been associated with foodborne outbreaks, due to the ability to produce enterotoxin. Among the foods involved in these poisonings are milk and its derivatives, due to contamination by these pathogens that are the main cause of bovine mastitis. This work was performed to identify *S. aureus* and assessing their enterotoxigenic potential, from refrigerated raw milk samples of cattle, obtained from the Laboratory of Analysis of Quality of Milk Veterinary School, UFMG (LabUFMG) in the period July 2009 to March 2010. 251 samples were analyzed for bulk tank milk and these were obtained 278 strains of *S. aureus* (86.06%) and 45 isolates of coagulase-negative SCN (13.93%), by routine microbiological methods. These isolates were analyzed by PCR and conventional biplex for amplification of the *mecA* and *femA* genes and for investigation of multiplex PCR for genes encoding enterotoxins. The percentage of 82.06%, for the presence *femA* gene among isolates of *S. aureus* suggests the use of this tool for the identification of the bacteria from milk. 12 isolates showed 4.31% of the *mecA* gene, identifying the presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), in milk samples worked. Among the staphylococcal enterotoxin SEA and SEB (1.07% each) were predominant. The presence of enterotoxin genes and samples of MRSA have highlighted the potential of enterotoxigenic *S. aureus* isolated from milk originating from animals with mastitis, and the risks that this may present to public health. *S. aureus* evaluated by disk-agar diffusion were susceptible to gentamicin (94%) and resistance to penicillin (90%) and enrofloxacin (58%). The test of minimum inhibitory concentration-MIC, the isolates of *S. aureus* were susceptible to enrofloxacin (92.54% and MIC<sub>90</sub> 4 mg/mL) and gentamicin (80% MIC<sub>90</sub> 90 and 16mg/mL) and resistance to penicillin G (18.47% and MIC<sub>90</sub> 64 mg / mL).

**Keywords:** bovine milk, mastitis, *Staphylococcus aureus*, *femA*, *mecA*, MRSA, staphylococcal enterotoxin, multiplex PCR, minimum inhibitory concentration.

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de leite foi de 30,7 milhões de toneladas em 2010, chegando a 32 milhões em 2011. O país ficou em 5º lugar após EUA, Índia, China e Rússia (Produção..., 2012). Deste total, cerca de 21 milhões são inspecionadas (Leite..., 2012) sendo que o Estado de Minas Gerais, com produção de 8,3 milhões em 2010, foi o maior produtor nacional (Ranking..., 2012). Quanto à distribuição de produtores de leite por região, na região sudeste, os Estados de Minas Gerais e São Paulo são os maiores representantes; na região centro-oeste é o Estado de Goiás; na região nordeste, Alagoas, Ceará e Sergipe e da região sul, estão Paraná e Rio Grande do Sul (Distribuição..., 2012). Existem laboratórios que pertencem à Rede Brasileira de Qualidade do Leite-RBQL, distribuídos em áreas geográficas de abrangência estratégica, com a finalidade de monitorar e, dessa forma, contribuir para o aperfeiçoamento de estratégias para melhorar a qualidade do leite, tão presente na alimentação humana. Existem oito unidades operacionais credenciadas junto ao MAPA tais como: Serviço de Análise de Rebanhos Leiteiros na Universidade de Passo Fundo/RS, Associação Paranaense de Criadores de Bovinos de Raça Holandesa na Universidade Federal do Paraná/ PR, Laboratório de Controle da Qualidade do Leite em Concórdia (SC), Clínica do Leite na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-UNESP-SP, Laboratório de Qualidade do Leite na Embrapa, em Juiz de Fora/MG, Qualidade do Leite da Universidade Federal de Goiás/GO, Laboratório de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG/MG e Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros na Universidade Federal Rural de Pernambuco/PE, dentre outros. (Regimento..., 2009).

A mastite bovina é uma das mais importantes doenças endêmicas em vacas

leiteiras e é responsável por perdas econômicas para os produtores, assim como para a indústria leiteira (Roberson et al., 1994b; Cardoso et al., 2000a). Microorganismos como *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Mycoplasma spp.*, *Corynebacterium bovis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Enterococcus spp.*, dentre outros, cuja transmissão pode ser ambiental ou através da ordenha (Fonseca e Santos, 2000) podem ser associados à etiologia da mastite bovina e dentre estes, *Staphylococcus aureus*, representa 95% dos isolados relacionados a este quadro. Uma vez no interior da glândula mamária, fixa-se às células epiteliais e estabelece infecção por diversos mecanismos patogênicos. Inicialmente, causa destruição dos tecidos próximos à cisterna da glândula, alcança o sistema de dutos e se estabelece profundamente nos alvéolos, podendo formar abscessos e tecido cicatricial. As células alveolares e dutos podem sofrer degeneração, levando à involução dos mesmos e até perda de função. Este processo, repetido continuamente, pode atingir outras áreas da glândula mamária, sendo reversível somente em estágios iniciais da infecção. Caso o processo seja crônico, abscessos poderão se formar dentro das áreas ocluídas comprometendo toda a glândula até a perda total de sua função (Silva, 2004). Dentro dessa perspectiva, é importante salientar a necessidade de se conhecer um pouco mais os *S. aureus* causadores de mastite e qual sua relevância, quando presente em leite bovino, nos casos de intoxicação alimentar em humanos (Roberson et al., 1994b; Cardoso et al., 2000a).

A contaminação microbiológica dos alimentos tem sido objeto de preocupação constante em diversos países. No Brasil, de acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde (Dados..., 2011) os surtos alimentares, distribuídos de acordo com a notificação dos casos, aparecem na região

Sul (42,1%); na região Sudeste (37,3%); na região Nordeste (12,0%) e com menor representação nas regiões Centro-Oeste (5,2%) e Norte (3,5%). Dentre os alimentos mais envolvidos em casos de surtos alimentares entre os anos 2000 e 2011 estão os alimentos mistos (1502 surtos); ovos e produtos a base de ovos (909 surtos); doces e sobremesas (490 surtos) e água (470 surtos). Leite e seus derivados fazem parte da classe de alimentos responsável por 350 surtos no mesmo período de estudo. Quanto aos agentes etiológicos identificados por surto estão ranqueados *Salmonella* spp. (1660 casos), *S. aureus* (799 casos), *Escherichia coli*, sem especificação se EHEC, EPEC, EIEC ou ETEC (411 casos), *Clostridium perfringens* (190 casos), dentre outros (Dados..., 2011).

Dentre os alimentos já citados, mais especificamente, o leite cru e seus derivados são considerados a principal fonte de *S. aureus*, que por sua vez, destaca-se como um dos agentes etiológicos mais frequentemente associados à mastite bovina. Este fato representa sério risco para a saúde pública, uma vez que esta inflamação pode causar decréscimo de vários componentes do leite tais como gordura, proteína, lactose, cálcio e magnésio (Cardoso et al., 1999b; Silva e Silva, 2005) além do potencial enterotoxigênico deste micro-organismo presente nos alimentos contaminados (Zecconi e Hahn, 2000).

*S. aureus* pode contaminar os alimentos pelas mãos dos manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos, e pelos animais, principalmente do gado leiteiro com mastite (Proft e Fraser, 2003). No homem, *Staphylococcus* spp. é encontrado na superfície da pele, onde é mais frequente, nas mãos, braços, rosto e feridas. Também estão no conduto nasal, nos olhos, na garganta e no trato gastrointestinal (Santana et al., 2006). Nos bovinos o principal reservatório deste agente é o quarto mamário infectado (Raimundo et al., 1999).

No gênero *Staphylococcus*, existem 42 espécies, as quais têm sido classificadas como coagulase positivas (SCP) ou coagulase negativas (SCN), conforme o resultado do teste de coagulase em tubo. O grupo dos SCP inclui *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* e *S. delphini* (Koneman et al., 2001). Dentre estes, *S. aureus* destaca-se como um dos patógenos mais frequentemente isolados (Costa, 2008). Esta bactéria pode estar presente na matéria-prima alimentar, como o leite cru e, por contaminação cruzada, pode chegar aos alimentos já processados e caso haja condições favoráveis pode produzir enterotoxinas (SEs) que, por serem termotolerantes, podem permanecer no produto final após o processamento térmico. Para a produção de enterotoxinas são necessárias condições semelhantes às proporcionadas para o cultivo da bactéria. As enterotoxinas são proteínas de peso molecular entre 26.000-29.000 Daltons, ponto isoelétrico entre 5,7-8,6 e resistentes à ação de enzimas proteolíticas como pepsina e tripsina (Bergdoll, 1989; Carmo, 2001) resistindo dessa forma à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais mantendo sua atividade no trato digestivo após ingestão (Luz, 2008); são higroscópicas e facilmente solúveis em água e soluções salinas. Para o desenvolvimento de *S. aureus* são necessárias condições de temperatura (35-40°C), pH (6,0-7,0), atividade de água (>0,99) e atmosfera de aeração.

A presença de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) é o um dos principais fatores de intoxicação de origem bacteriana no homem e têm sido relatadas em vários surtos de doenças transmitidas por alimentos-DTAs (Nader et al., 2007). O período de incubação da intoxicação estafilocócica é curto, variando de 15 minutos a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado. Os sintomas variam de acordo com a susceptibilidade individual, sendo mais grave em recém-nascidos, idosos e pessoas acometidas de doenças crônicas

imunossupressoras (Cliver, 1998). O restabelecimento ocorre geralmente em período de um a dois dias (Bergdoll, 1989).

A provável presença de *S. aureus* e/ou suas enterotoxinas em leites crus, queijos e leite pasteurizado, contaminado após-processamento térmico (Borges et al., 2008) representa sério risco ao consumidor (Cardoso, 1999a). Dentro dessa perspectiva, é importante salientar a necessidade de se conhecer um pouco mais os *S. aureus*, sua capacidade em produzir enterotoxinas e qual sua relevância nos casos de intoxicação alimentar em humanos. Espera-se que os dados obtidos a partir deste trabalho possam contribuir como ferramenta para diagnóstico rápido da presença de enterotoxinas em leite.

## 2. LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 Leite

O leite é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (Regulamento..., 2011). É um produto altamente perecível que deve ser refrigerado a 4°C o mais rápido possível após a coleta. Altas temperaturas, acidez (pH) ou contaminação por micro-organismos podem rapidamente diminuir a sua qualidade (Wattiaux, 2011). Esta matéria-prima alimentar possui lipídios, proteínas, lactose, aminoácidos, vitaminas e minerais. O leite e seus derivados desempenham um papel nutricional importante para a nutrição humana, particularmente nos primeiros anos de vida, uma vez que fornecem proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais necessários ao desenvolvimento do organismo. Um litro de leite possui em média, 32g de proteína por litro e, se ingerido em quantidades suficientes pode suprir as necessidades protéicas diárias de crianças com até seis anos de idade e mais de 50% do conteúdo de proteínas requisitado pelos adultos. Deve-se considerar que de

acordo com Macronutrientes... (2013) as recomendações de ingestão diária de proteínas variam de 9g ao dia, para crianças a 60g ao dia em adultos. Em relação ao cálcio, as recomendações de ingestão diárias variam de 200mg/dia, para crianças e de 1200mg/dia para adultos. O consumo de um litro de leite diário supre 100% das necessidades diárias de cálcio, já que se obtém 250mg deste mineral a cada 200 mL de leite. É de se esperar, portanto, uma grande preocupação em assegurar a integridade e a qualidade intrínseca do leite e dos produtos lácteos destinados ao consumo humano. São frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos com leite contaminado com micro-organismos patogênicos (Fagundes e Oliveira, 2004).

O leite tem uma composição de natureza dinâmica que varia de acordo com estágio de lactação, raça, idade, nutrição e estado de saúde do animal. O valor nutricional do leite como um todo é maior do que o valor dos seus ingredientes individualmente (Haug et al., 2007). Existe uma legislação específica para controle da qualidade do leite produzido no país. A Instrução Normativa 62 (Regulamento, 2011), define os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, leite pasteurizado e do leite cru refrigerado. Esta norma tem o objetivo de promover a melhoria da qualidade do leite no Brasil por meio de um controle rígido da matéria-prima. De acordo com a IN 62, os leites crus refrigerados devem apresentar dentre outros aspectos, ausência de resíduos de antimicrobianos, contagem bacteriana total (CBT) no máximo de  $1,0 \times 10^5$  ufc/mL e contagem de células somáticas (CCS) no máximo de  $3,6 \times 10^5$  cs/mL (Regulamento, 2011).

A CBT indica o padrão higiênico-sanitário da retirada e do armazenamento do leite. Quanto mais higiênica for a ordenha e a limpeza dos utensílios e quanto mais rápido

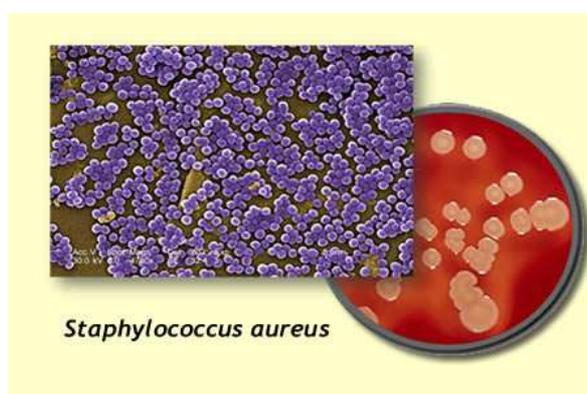
for o resfriamento do leite, menor será a contaminação e a taxa de multiplicação das bactérias no leite. A condição de higiene da pele dos tetos e úbere é considerada a principal fonte de bactérias do ambiente para a glândula mamária, podendo causar mastite e, para o leite, podendo causar aumento da CBT (Dias, 2010). Já as CCS, oriundas da descamação normal do tecido secretor da glândula mamária ou de células de defesa do organismo, indicam a sanidade da glândula mamária e da qualidade do leite. Células somáticas no leite não afetam o valor nutricional. Elas são apenas significativas como indicadores de outros processos que podem estar ocorrendo no tecido mamário, incluindo inflamação. Na ocorrência de infecção, o número de células aumenta (Dados..., 2011).

A garantia da qualidade do leite, principalmente para evitar veiculação de agentes infecciosos ao homem, se inicia com o atestado sanitário da vaca, do ordenhador, das condições sanitárias do ambiente em que as vacas são ordenhadas, do equipamento usado na coleta e transporte do leite. Depende ainda das condições higiênico-sanitárias durante a ordenha, do tratamento térmico, da temperatura de armazenamento do leite na propriedade, durante o transporte até a indústria, assim como os cuidados na

rede de distribuição e no consumo (Luz, 2008). Para ser considerado de qualidade, o leite precisa ter qualidade sensorial, nutricional e físico-química, bem como contagem reduzida de células somáticas e baixa carga microbiana (Barreto, 2012).

Dos 32 bilhões de litros de leite produzidos no país em 2011, o Estado de Minas Gerais foi o principal produtor com 8.767.932 litros. Das mesorregiões produtoras de leite no Estado, destacam-se a região Central Mineira, onde foram produzidos 704.051 mil litros; a região Metropolitana de Belo Horizonte produziu 635.053 mil litros, seguida pelo Vale do Rio Doce 620.730 mil litros. Na região Noroeste de Minas foram 529.876 mil litros e na região Norte de Minas/Vale do Mucuri de onde foram obtidos 511.997 mil litros de leite em 2011, além do Triângulo Mineiro e do Sul de Minas (Estatísticas..., 2012). Tais regiões contribuem e muito na produção estadual, consolidando-o em primeiro lugar na produção nacional.

## 2.2 *Staphylococcus aureus*



Fonte: <http://www.google.com.br/imgres?q=staphylococcus+aureus&start=31&num=10&hl=pt->

Figura 1– *Staphylococcus aureus* em microscopia (cachos) e seu aspecto na placa de ágar sangue

O gênero *Staphylococcus* spp. (do grego “staphyle” = cachos e “cocos” = grão), pertence a família Staphylococcaceae, é composto por micro-organismos imóveis, Gram positivos, produtores de catalase, que se agrupam em massas irregulares ou sob a forma de cachos de uva e podem estar associados a uma ampla variedade de infecções oportunistas em seres humanos e em animais. Diferenciam-se do gênero *Micrococcus* por serem oxidase negativos, possuírem ácido teicóico como constituinte da sua parede celular e DNA com conteúdo de ácidos nucleicos do tipo “G e C” de 30 a 39% (Filho, 2007). Dentre as características fenotípicas, suportam altas concentrações salinas (10-20%), fermentam a glicose, maltose e manitol e geralmente formam colônias com pigmentação (Santana et al., 2006). *S. aureus* apresenta-se como um patógeno oportunista presente no meio ambiente e está presente na pele e mucosas de seres humanos e outros mamíferos. É classificado como micro-organismo mesófilo, porém, pode apresentar crescimento entre 7,0 e 47,8°C. Pode produzir desde lesões cutâneas superficiais até severas infecções sistêmicas em diversas espécies animais (Filho, 2007). Em seres humanos, pode causar lesões superficiais, tais como abscessos de pele e infecções de feridas; infecções profundas e sistêmicas, tais como osteomielite, pneumonia, endocardite e bacteremia (Jarraud et al., 2002).

Entre as três principais espécies de cocos Gram positivos patogênicos para o homem estão incluídos *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* (Chaves, 2012). Dentre os *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), *S. aureus* é mais freqüentemente associado a surtos de intoxicação alimentar, devido à produção de enterotoxinas. Sabe-se que o grupo dos SCP inclui, além de *S. aureus*, outras espécies tais como *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi subsp. schleiferi* e *S. delphini* (Koneman et al., 2001). Além

destas, foram propostas a inclusão no grupo SCP das espécies *Staphylococcus lutrae* e *Staphylococcus pseudointermedius* (Costa, 2008).

*S. aureus* pode produzir mais de 30 fatores de virulência que contribuem para o estabelecimento e manutenção de infecção. A base molecular de patogenicidade do *S. aureus* é multifatorial e dependente de genes reguladores que têm impacto no comportamento bacteriano (Kropec et al., 2005). As alfa-hemolisinas, são muito ativas contra eritrócitos de algumas espécies animais. Esta hemolisina apresenta ação necrosante em pequenos vasos e induz a formação de poros, alterando a permeabilidade da membrana celular. A cápsula, por exemplo, é uma camada de polissacarídeo mais estável, está intimamente associada com a célula bacteriana e não é removível com lavagens sucessivas. Esta estrutura protege a bactéria contra a fagocitose e pode apresentar polissacarídeos capsulares (CP), tais como CP5 e CP8. Também estão presentes os mediadores da resistência aos antibióticos, proteases, lipases e proteínas de captação de ferro (Jarraud et al., 2002). Proteínas que se ligam à fibronectina, ao colágeno e ao fibrinogênio funcionam como adesinas favorecendo a fixação e colonização da bactéria no organismo do hospedeiro. O fator Clumping (agregação) liga-se ao fibrinogênio (através do seu receptor) sendo utilizado para marcador de diagnóstico laboratorial. Outro fator de virulência é a presença de exopolissacarídeo na camada mais externa da bactéria que inibe a opsonização e a fagocitose da mesma, além de reduzir a susceptibilidade aos antibióticos. A coagulase, um fator de virulência enzimático, causa coagulação do fibrinogênio do soro, resultando no acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas, isolando a área infectada e dificultando a ação de mecanismos de defesa do hospedeiro. Outro fator, a leucocidina

apresenta ação destrutiva direcionada a neutrófilos e macrófagos, permitindo que a bactéria saia ileso da fagocitose. *S. aureus* possuem também nucleases termorresistentes. As nucleases em geral, têm a função de hidrolisar o DNA e a produção desta enzima é uma importante característica de identificação desta bactéria com especificidade de 98%. Também podem ser encontradas proteínas bacterianas, que se ligam às matrizes extracelulares, tais como a proteína A e o polissacarídeo de superfície N-acetilglucosamina (NAG). O peptidoglicano e os ácidos teicóicos estão associados com a ativação da via alternativa do complemento, estímulo da produção de citocinas e adesão às células epiteliais. A proteína A (“SpA” do inglês “*Staphylococcus* protein A”) é uma proteína espécie-específica ancorada covalentemente à parede celular do *S. aureus* e tem a habilidade de se ligar à porção Fc de muitas subclasses de IgG em mamíferos. A expressão dessa proteína torna a bactéria menos susceptível à fagocitose por neutrófilos. Quando a proteína A se liga ao fragmento Fc da IgG e impede a opsonização regular da bactéria (Filho, 2007).

Ainda sobre os fatores de virulência do *S. aureus*, sabe-se que estes podem produzir enterotoxinas estafilocócicas (SEs) que são relatadas em casos de intoxicação alimentar em surtos de DTAs (Jarraud et al., 2002). A intoxicação alimentar estafilocócica tem como causa a ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento, contaminado através da manipulação humana ou da matéria-prima obtida de animais. Os sinais clínicos observados incluem náusea, vômito, diarreia, dores abdominais, cefaléia, cólica abdominal, câibra muscular, queda de pressão sanguínea, prostração e aparecem de uma a seis horas após a ingestão do alimento. Tais sintomas podem variar com o grau de susceptibilidade do indivíduo, com a concentração e quantidade da enterotoxina no alimento ingerido. Quadros febris são

incomuns e, quando presentes, normalmente estão associados à ingestão de grandes quantidades de enterotoxina. O período de incubação varia de 30 minutos a 8 horas, sendo em média 2 a 4 horas. A cura espontânea é comum, ocorrendo após 24 horas e a recuperação completa entre 1 e 3 dias. Os sintomas muitas vezes se confundem com os de outros patógenos causadores de DTAs, como é o caso de *B. cereus* que também causa um quadro intenso de vômito (Santana et al., 2010).

Casos de intoxicação alimentar e prevalência de *S. aureus* em diferentes tipos de alimentos como frutos do mar, leite e derivados, carne e derivados foram relatados principalmente nos países da América, Europa e Ásia. No Brasil, a notificação de casos de intoxicação alimentar estafilocócica não é compulsória e, devido à sintomatologia geralmente branda e de curta duração, somente os grandes surtos chegam ao conhecimento das autoridades sanitárias (Luz, 2008) e mesmo assim, a intoxicação por estafilococos constitui a causa mais freqüente de surtos de DTAs em muitos países, inclusive no Brasil (Borges et al., 2008). A presença de isolados toxigênicos de *S. aureus* no leite não implica, necessariamente, na ocorrência de intoxicações em seres humanos, porém o risco existe. A percepção de risco é aumentada, principalmente, ao se considerar que esse micro-organismo é o mais envolvido nas infecções intramamárias ou mastite de rebanhos leiteiros, com prevalência de isolados com elevado potencial toxigênico.

A mastite na sua forma subclínica representa maior prevalência nos rebanhos leiteiros que a forma clínica, e se caracteriza por não apresentar mudanças visíveis no aspecto do leite. Entretanto, alterações em sua composição podem ocorrer sendo possível o isolamento de micro-organismos patogênicos. Já a mastite clínica apresenta sinais evidentes na glândula mamária como

edemas, enrijecimento e dor à apalpação; no leite podem ser observadas as presenças de grumos ou pús. O principal micro-organismo isolado das mastites clínicas e subclínicas é o *Staphylococcus aureus*, responsável por 50% entre os micro-organismos causadores da mastite clínica e 42% entre os causadores de mastite subclínica. A presença de lesões em quartos mamários favorece a permanência da bactéria e podem aumentar, em até duas vezes, o desenvolvimento de mastite crônica que, além de demonstrar baixa taxa de cura pode acarretar grande perda na produção leiteira. Altamente contagioso, o *S. aureus* é capaz de causar infecções por mais de 30 dias habitando feridas de tetos, mãos de ordenhadores (Oliveira, 2011) e na glândula mamária de vacas infectadas (Bandoch, 2011).

Além dos aspectos econômicos que envolvem a mastite, o leite e seus derivados têm sido relacionados como importantes causas de intoxicações alimentares, sendo que diversos desses micro-organismos comumente envolvidos na etiologia das infecções intramamárias estão frequentemente associados com as patologias gastrointestinais humanas (Andrade, 2012).

Embora sejam variáveis as frequências de isolamento de *S. aureus* em amostras de leite de vacas com mastite, esse agente pode ser considerado mundialmente como o de maior significado na etiologia dessa enfermidade (Sá et al., 2004). A transmissão dos patógenos da mastite e suas toxinas, pelo leite e produtos lácteos, correspondem a um risco à saúde do consumidor. Além da sua importância em saúde pública, fatores como perdas de produção leiteira, custos de tratamento dos casos clínicos, descarte e morte prematura dos animais somada aos prejuízos da indústria por redução na qualidade e rendimento na fabricação de derivados são responsáveis pelos elevados impactos econômicos das mastites (Martins

et al., 2010). Este fato, aliado ao elevado índice de cepas enterotoxigênicas, deve merecer atenção especial dos órgãos oficiais de inspeção e de vigilância sanitária, uma vez que pode representar sério risco potencial para a saúde pública, pois as enterotoxinas secretadas no leite podem permanecer estáveis nos produtos oferecidos ao consumo (Lamaita et al., 2005). De maneira geral, os leites crus e seus derivados, produtos cárneos e seus derivados, cremes e produtos à base de ovos estão envolvidos em surtos alimentares causados por este patógeno em questão (Santana et al., 2010).

### 2.3 Enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) compreendem uma família de enterotoxinas distintas que são nomeadas com as letras do alfabeto de acordo com a ordem cronológica de sua descoberta. Atualmente, são conhecidos dezoito tipos de enterotoxinas estafilocócicas, classificadas com base em suas diferenças antigênicas. Estas são denominadas seA, seB, seC, seD, seE, seG, seH, seI, seJ, seK, seL, seM, seN, seO, seP, seQ, seR e seU. Pertencem à família de enterotoxinas pirogênicas (podem causar febre), podem ser produzidas quando a bactéria é cultivada entre 10 e 46°C (Fagundes e Oliveira, 2004). São proteínas extracelulares de baixo peso molecular (25 a 30 Kdaltons), são solúveis em água, em soluções salinas e são secretadas no meio onde a bactéria se encontra (Longaray, 2007). A composição dos aminoácidos de seA, seD e seE são similares, o mesmo ocorrendo entre seB e seC. Estas proteínas são resistentes à tripsina, renina e pepsina, o que possibilita a sua passagem pelo trato gastrointestinal (Carmo, 2001; Argudin, 2010; Santana, 2010).

As enterotoxinas apresentam resistência ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos e às temperaturas de pasteurização lenta (65°C durante trinta minutos) e rápida (72 a 75°C,

durante 15 a 20 segundos). Também resistem à ultrapasteurização (130 a 150°C de 2 a 4 segundos), o que aumenta sua importância na indústria, devido à alta termoestabilidade. Isto implica que as atividades biológicas das enterotoxinas estafilocócicas permanecem sem alteração, mesmo após o processamento térmico dos alimentos (Andrade, 2009). As enterotoxinas B e C são inativadas após processamento térmico de 100°C por três horas e a enterotoxina A diminui sua toxicidade ao ser aquecida a 100°C por 15 minutos, configurando as duas primeiras com maior resistência térmica (Carmo, 2001). A contaminação de *S. aureus* nos alimentos está associada às falhas na manipulação ou conservação, aproveitamento de sobras e/ou equipamentos higienizados incorretamente e todos estes fatores são complementados com a presença de linhagens com características enterotoxigênicas. Manter o alimento em baixas temperaturas pode ser utilizado como controle, pois a multiplicação bacteriana diminui e a síntese de enterotoxinas é quase totalmente inibida em temperaturas inferiores a 7°C (Santana et al., 2010). A produção de enterotoxinas é influenciada pela temperatura, pH, atividade de água, tamanho do inóculo, fonte de carbono e nitrogênio, concentração de sal e condições atmosféricas do substrato, tornando-se detectável entre 4 a 6 horas (Bergoll, 1989) sendo que *S. aureus* pode produzir mais de um tipo de toxina (Longaray, 2007). As enterotoxinas A e D são produzidas nos alimentos, em condições amplas de pH e atividade de água. De acordo com Santana (2010), *S. aureus* é um dos principais agentes causadores de infecções na glândula mamária de vacas, sendo considerado o micro-organismo patogênico mais frequentemente isolado de leite cru e em quadros de mastite. As cepas produtoras de enterotoxina D são responsáveis pela maior parte dos surtos de intoxicação estafilocócica, principalmente aqueles onde o alimento envolvido é o leite. Nos casos de mastite, comprovadamente causada por *S.*

*aureus*, a enterotoxina C é mais encontrada. Por outro lado, ambientes com pH alcalino levam à diminuição da síntese das enterotoxinas B, C e D. Nos casos de mastite estafilocócica, a enterotoxina mais frequentemente produzida é a C (Borges et al., 2008b e Santana, 2010). A maioria das intoxicações alimentares é produzida principalmente pela ingestão das enterotoxinas A e D (Santana, 2010), sendo a primeira, responsável por mais de 75% dos surtos, seguida, em ordem decrescente de frequência, por D, C e B (Chaves, 2012). No quadro de intoxicação também podem ser observados alterações inflamatórias em várias regiões do trato gastrointestinal podendo aparecer lesões no estômago e na parte superior do intestino delgado. A diarreia pode ocorrer devido à inibição da reabsorção de água e eletrólitos no intestino delgado (Argudin, 2010).

Muitos isolados de *S. aureus* após 24 horas de incubação a 35°C podem produzir enterotoxinas que são detectáveis a partir de 0,5 µg/mL da toxina (Longaray, 2007) e podendo provocar uma intoxicação (Andrade, 2009; Santana, 2010; Dias, 2010).

As enterotoxinas funcionam não só como potentes toxinas gastrintestinais, mas também como superantígenos, ligando-se simultaneamente às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II e aos receptores de células T, independentemente de suas especificidades de ligação. Formam um complexo trimolecular, que induz a proliferação demasiada de linfócitos T e produção de interleucina 2 (IL-2), que em grande quantidade na corrente sanguínea, se ligam a neuro-receptores do trato intestinal que estimulam o centro do vômito no cérebro, causando os sintomas característicos (Silva, 2004; Longaray, 2007; Dias, 2001; Chaves, 2012).

Os genes que codificam as enterotoxinas estafilocócicas já foram estudados, e suas

denominações iniciam com as letras “se” (Orwin et al., 2003 e Freitas et al., 2009). Em relação à forma de aquisição dos genes sabe-se que seD e seJ são carregados por plasmídios, ao contrário de seA e seE que são carregados por bacteriófagos. Por outro lado, seB, seC, seG, seH, seI, seK, seL, seM, seN, seO, seP e seU são encontrados no cromossomo (Longaray, 2007; Ângelo, 2010; Argudin, 2010, Dias, 2010). São conhecidos pelo menos quatro sistemas regulatórios que afetam a expressão de proteínas extracelulares ou de superfície celular. O principal sistema regulatório dos fatores de virulência no *S. aureus* é o gene acessório regulador (*agr*), que atua em combinação com o acessório regulador estafilococal (*sar*), envolvidos em um complexo sistema global regulatório.

O gene seA, que codifica a enterotoxina A, é composto de 120pb e codifica uma proteína de 27,1 KDa. Esta enterotoxina pode produzir sintomas mesmo em baixas concentrações (100-200ng), é relatada como a mais envolvida em intoxicações alimentares seguida pelas enterotoxinas D e B (Luz, 2008; Dias, 2010). O gene seA é transportado por uma família polimórfica de bacteriófagos sendo inserido no cromossomo bacteriano e se comporta como parte do genoma bacteriano (Schelin et al., 2011). Os genes seB, seC e seD têm sido demonstrados como *agr*-dependentes, enquanto os genes seA e seJ como *agr*-independentes. seA, por exemplo, é produzido principalmente durante o crescimento exponencial, ao passo que seB, seC, seD, aparecem em meios de cultura mais próximos à fase estacionária de crescimento. Desse modo, os fatores ambientais são de grande importância na expressão toxigênica (Tseng et al., 2004; Chaves, 2012).

*Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN) também podem produzir enterotoxinas e já foram relatados em casos de surtos de intoxicação alimentar (Cunha et al., 2006 e

Borges et al., 2008b). Neste grupo estão incluídos *S. capitis*, *S. cohnii* subsp *cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. warneri*, *S. xylosus* e *S. chromogenes* (Lamaita et al., 2005 e Borges, 2008b).

Silva et al. (2010) relataram os agentes etiológicos isolados de diferentes alimentos suspeitos de causarem toxinfecções alimentares, na região de Ribeirão Preto, SP, no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2008. Do total de 116 amostras de alimentos, em 13 (11,2%) foram isolados micro-organismos potencialmente patogênicos sendo *S. aureus* mais frequentemente envolvido nestas toxinfecções.

No Brasil, em se tratando das intoxicações estafilocócicas, sua frequência real é desconhecida, devido a possíveis erros de diagnósticos. Isto se deve ao fato de serem similares a outras intoxicações como a causada por *Bacillus cereus*, por coletas inadequadas, exames laboratoriais impróprios ou investigações epidemiológicas inadequadas dos surtos, e por ser uma doença de notificação não compulsória. Dos casos onde o agente etiológico foram identificados nos surtos alimentares de 2000 a 2011, *S. aureus* foi o segundo micro-organismo mais envolvido, estando presente em 800 surtos. No Estado de São Paulo foram notificados 25 surtos por *S. aureus*, envolvendo quase 200 pessoas, nos anos de 2001 e 2002. Em Minas Gerais, entre os anos de 1995 a 2001 foram 12.820 pessoas intoxicadas, causando 17 mortes após ingerirem alimentos contaminados por SEs e, segundo o Instituto Panamericano de Proteção dos Alimentos e Zoonoses, nos anos de 1993 a 2002, foram notificados 18 surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo produtos lácteos (Chaves, 2012).

Merussi et al. (2012) realizaram levantamento de dados sobre a ocorrência de

surtos de gastrinterite relacionados ao consumo de leite e derivados no Estado de São Paulo. Estes dados correspondem ao período de 2000 a 2010, a partir dos registros de surtos de doenças transmitidas por alimentos, notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Os resultados mostraram que foram notificados 239 surtos envolvendo 2.418 casos relacionados ao consumo de laticínios no período estudado; em 79 surtos (33,0%) foram identificados os agentes etiológicos, dentre os quais prevaleceram bactérias (84,8%), com destaque para *S. aureus*.

A enterotoxina estafilocócica B pode causar intoxicação alimentar e está associada com a síndrome do choque tóxico não menstrual e não relacionada com a toxina TSST-1. Sua ingestão induz vômitos e diarreia e mesmo em baixas concentrações séricas pode desencadear choque tóxico, hipotensão profunda e falência de órgãos (Cook et al., 2007). O gene seB consiste de 478pb, codifica uma proteína de 31,4 KDa sendo cromossomal em isolados clínicos de *S. aureus* envolvidos em intoxicação alimentar (Dias, 2010).

A enterotoxina C, mais comumente associada com produção leiteira bovina e ovina, é heterogênea sendo classificada em subtipos com base nas diferenças antigênicas e no hospedeiro animal ao qual está associada possuindo variantes designadas seC1, seC2, seC3, sendo que os dois últimos subtipos são os mais frequentes encontrados em surtos de intoxicação alimentar (Luz, 2008; Dias, 2010).

Cardoso et al. (1999b), caracterizaram a produção de enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D em 127 amostras de *S. aureus*, isoladas de amostras de leite proveniente de vacas com mastite no Estado de Minas Gerais. Das 127 amostras testadas, 24 produziram B (19%), 8 produziram C (6 %) e 4 produziram A (3 %).

Fueyo et al. (2005) avaliaram isolados de *S. aureus* recuperados a partir de amostras de leite de 84 vacas (um isolado por vaca) com mastite subclínica do norte da Espanha. Estes avaliaram a presença de genes para toxinas estafilocócicas por PCR, testados por aglutinação em látex e nenhum dos 84 isolados foi positivo para seA ou seD, apenas um isolado produziu seB e 11 produziram seC e TSST-1.

Ikeda et al. (2005) analisaram 11 amostras de leite em pó reconstituído a 10% (p/v), por PCR, para detecção de genes para as enterotoxinas estafilocócicas seA, seB, seC, seD, seE, seG, seH e seI. A presença dos genes seA e seH foi observada em 10 amostras (90%); de seG e de seI em 7 amostras (63%). Não foi observada a presença dos genes seB, seC, seD, seE.

Tollersrud et al. (2006) investigaram a produção de SeD em mastite bovina experimental por inoculação em 10 vacas, por via intramamária, de 1 mL de suspensão bacteriana de *S. aureus*, contendo 250 ufc/mL da cepa M60, produtora de enterotoxina D. Dois dias após a inoculação, foi detectado a presença da enterotoxina D, em apenas duas vacas, sendo detectadas com 5 e 10 ng/mL, respectivamente.

Nader et al. (2007) identificaram o predomínio de seA e seB em relação a seC, pesquisadas em 72 amostras de *S. aureus*, isoladas no leite de vacas com mastite em 10 propriedades rurais do Estado de São Paulo.

Ferreira et al. (2008) avaliaram 150 amostras de DNAs, extraídos de *S. aureus*, isolados do leite de vacas com mastite para a amplificação dos genes das enterotoxinas dos tipos A a D (seA, seB, seC e seD) e da toxina TSST-1 (tst), de uma propriedade rural, produtora de leite tipo B, pertencente ao Centro de Bovinos de Leite do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, Estado de São Paulo/Brasil. Os resultados obtidos foram 28 (18,7%) dos DNAs avaliados que

apresentaram pelo menos um gene para enterotoxina. Destes, 15 (53,6%) estirpes apresentaram o gene *seA*, 4 (14,3%) apresentaram *tst*, 3 (10,7%) apresentaram *seB* e outros 3 (10,7%) apresentaram o gene *seC*.

Dias (2010), após analisar 145 amostras de leite bovino que amplificaram o gene *femA*, constatou que 87 (60%) amplificaram *seA*, sendo este o gene mais prevalente, seguido por *seB* presente em 55 (37,91%) das amostras e, posteriormente *seC* presente em 10 (6,9%) amostras. Foi verificada também co-amplificação dos genes *seA* e *seB* em 42 (28,9%) amostras, *seA* e *seC* em 9 (6,2%) amostras, *seB* e *seC* em 3 (2,11%) amostras e co-amplificação dos três genes *seA*, *seB* e *seC* em 3 (2,11%) amostras.

#### 2.4 PCR multiplex e enterotoxinas estafilocócicas

Com a finalidade de se obter técnicas acuradas, rápidas e específicas para o diagnóstico da mastite bovina, métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), são úteis para diagnósticos microbiológicos. A PCR apresenta vantagens em comparação aos métodos tradicionais de diagnóstico, sendo altamente sensível, específica e rápida. Para se produzir diagnóstico positivo são necessárias poucas células e estas não precisam estar viáveis, dessa forma, amostras que foram inadequadamente preservadas podem ser utilizadas (Lange et al., 1999; Martínez et al., 2001; Phuektes et al., 2001).

Por outro lado, a reação em cadeia da polimerase de amplificação múltipla (PCR Multiplex) é uma modificação da PCR convencional, que permite a detecção simultânea de diferentes segmentos genéticos do mesmo ou de diferentes micro-organismos. Isso representa redução da quantidade de reagente utilizado e tempo requerido para a identificação de diferentes

genes em uma amostra (Phuektes et al., 2001; Gandra, 2006) sendo muito útil para identificação do potencial enterotoxigênico de amostras de *S. aureus* isoladas de leite em diferentes espécies (Silva e Silva, 2005; Silva, 2008; Zocche, 2008).

Sharma et al. (2000) realizaram PCR multiplex de 9 isolados ATCC de *S. aureus* e 1 isolado ATCC de *S. epidermidis*, para avaliar a presença de genes para enterotoxinas. Foram obtidos 4 isolados que apresentaram os genes *seA*, 2 isolados que apresentaram os genes *seB*, 2 isolados que apresentaram os genes *seC* e 1 isolado com os genes *seD*. Também foi observada a presença dos genes *seC* no isolado de *S. epidermidis*.

Mehrotra et al. (2000), ao avaliarem 107 amostras de *swabs* nasais de humanos através da PCR multiplex obtiveram entre outras, 21(19,6%) amostras positivas para *seA*, 6 (5,6%) amostras positivas para *seB*, 8 (7,5%) amostras positivas para *seC* e 2 (1,9%) amostras positivas para *seD*.

Phuektes et al. (2001) realizaram PCR multiplex diretamente de 117 amostras de leite de vacas com mastite, de fazendas do sul da Austrália, para detectar *S. aureus* envolvidos em infecções de glândula mamária bovina. Foram obtidas *S. aureus* (5,98%) e SCN (0,85%), dentre outros micro-organismos envolvidos em casos de mastite bovina.

Lovset et al. (2004), padronizaram um PCR multiplex para detecção dos genes *seA*, *seB*, *seC*, *seD*, *seE*, *seG*, *seH* e *seI*. Em 13 isolados estudados de *S. aureus* de origem bovina encontraram *seA* (15,38%), *seB* (15,38%) e *seC* (30,76%), indicando que grande parte dos isolados possuem potencial enterotoxigênico.

Silva (2004), ao analisar 100 amostras de *S. aureus* isoladas de leite de cabra (n=36) e de vaca (n=64), identificou maior presença dos

genes *seA* e *seB* em amostras de leite bovino. Esses isolados bovinos eram pertencentes a rebanhos localizados em 23 municípios do Estado de Minas Gerais. Foi realizado PCR multiplex com os iniciadores *femA*, *seA*, *seB*, *seC* e observou que das 64 amostras isoladas de mastite bovina, quatro (6,3%) co-amplificaram os genes *seA* e *seB* e 2 (3,1%) amplificaram o gene *seC*.

Zocche, (2008) avaliou 20 isolados de *S. aureus*, por PCR multiplex, oriundos de alimentos de origem animal, quanto à produção de enterotoxinas A, B, C e D, na Universidade Federal de Pelotas/RS. Foi observado 1 isolado *seA* (5%), 4 isolados *seB* (20%), 1 isolado *seA+seB* e 2 isolados *seD* (10%). Os isolados não apresentaram o gene *seC*.

Hwang et al. (2010) realizaram PCR multiplex de 44 *S. aureus* isolados de leite cru, de vacas com mastite, de 26 fazendas leiteiras de cinco províncias do Japão, com o objetivo de detectar os genes das enterotoxinas estafilocócicas *seA*, *seB*, *seC*, *seD* e *seE* destas amostras. Detectaram *seA* em 2 isolados (4,54%), *seB* em 1 isolado (2,27%) e não foram detectados *seC*, *seD* e *seE*.

Park et al., (2011) realizaram PCR multiplex para a pesquisa de genes para enterotoxinas em 263 *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) isolados de vacas com mastite. Os resultados mostraram a presença de *seA* (1,52%), *seB* (20,91%), *seC* (1,14%) e *seD* (2,28%) e sugeriram a importância da implementação de mais estudos sobre a presença de genes de toxinas em SCN.

## 2.5 Gene *femA*

A identificação genotípica do *S. aureus* pode ser realizada pela utilização do gene *femA*. Desde o trabalho de Maidhof et al. (1991) este gene é reconhecido como um fator codificado cromossomicamente que ocorre naturalmente em *S. aureus*, está envolvido

no metabolismo da síntese da parede celular bacteriana e tem como produto uma proteína de 48-50kDa (Kobayashi et al., 1994). Kobayashi et al. (1994) analisaram 198 amostras de *S. aureus*, isolados de espécimes clínicos de 194 pacientes internados um hospital em Sapporo, Japão e observaram a detecção dos genes *femA* em 89% de todos os isolados sugerindo que o produto de *femA*, indicando que este genes pode ser utilizado como marcador para identificar *S. aureus*.

No trabalho de Mehrotra et al. (2000) foram avaliadas 176 amostras de *swab* nasal para a aplicação de uma terapêutica adequada e controle de infecção durante surtos de *S. aureus*. O trabalho objetivou otimizar o tempo de identificação das amostras clínicas através da PCR multiplex e os resultados mostraram uma correlação de 100% entre a presença do gene *femA* e a presença de *S. aureus*.

Berger-Bachi (2002) também mostraram que o gene *femA* codifica parte da estrutura da parede celular de *S. aureus*. Segundo estes autores todos os chamados fatores “*fem*” desempenham um papel na biossíntese da parede celular e caso ocorra alguma mutação nestes fatores ou genes, o teor de glicina na parede da célula é afetado dando origem a uma estrutura “mais frágil” e incapaz de manter a estabilidade celular.

Segundo Souza (2005), o gene *femA* parece ser uma característica peculiar de *S. aureus*, não sendo encontrado em outras espécies de estafilococos. Os genes *femA* tem sido detectados em cepas de *Staphylococcus aureus* por meio de técnicas moleculares como a PCR. Esta técnica apresenta vantagens em relação às outras, pois oferece elevada eficácia e segurança, além de ser um método rápido e sensível.

Costa (2008) submeteu 360 isolados, identificados fenotipicamente como *S. aureus*, à PCR, para genotipagem pela

amplificação do gene *femA*. Destes isolados de casos de mastite clínica e subclínica, 352 (97,7%) foram genotipicamente confirmadas como *S. aureus*.

Andrade (2009) avaliou cepas de *Staphylococcus* spp. em 300 amostras de queijo coalho produzido no Ceará, e encontrou 95% de presença de *S. aureus* por meio da amplificação do gene *femA*. Segundo este autor, este gene é um marcador que tem sido estudado e explorado para a espécie *S. aureus* e codifica uma proteína essencial precursora da biossíntese do peptidoglicano nessa espécie.

Nos trabalhos de Dias (2010) e Dias et al. (2011) foram analisadas 200 amostras de leite, para o gene *femA*, na reação da PCR. Os resultados mostraram 145 (72,5%) amostras consideradas positivas para a presença de *S. aureus* e 55 (27,5%) amostras consideradas negativas para a presença desta bactéria.

Ângelo (2010) fez a identificação genotípica de *Staphylococcus* spp., isoladas de 168 leites de vacas com mastite, obtidos de diferentes rebanhos localizados nos Estados de Minas Gerais e do Rio de Janeiro, por PCR, com a pesquisa do gene *femA* e dentre elas foram identificadas 125 *S. aureus*.

## 2.6 Gene *mecA*

O gênero *Staphylococcus* engloba uma variedade de patógenos oportunistas de relevância variável em veterinária, sendo *Staphylococcus aureus* coagulase-positiva os mais importantes clinicamente. Uma característica importante deste gênero é sua capacidade de se tornar resistente à metilina devido à presença do gene *mecA*, o que pode tornar esta bactéria resistente às penicilinas e cefalosporinas (Arias, 2012).

Em trabalhos de Berger-Bachi et al. (1992), já se discutia a resistência de *Staphylococcus* à metilina. Esta resistência, segundo o

autor, era mediada por um determinante “*mec*”, que leva o gene estrutural *mecA*, que por sua vez, codifica uma proteína de ligação à penicilina (do inglês “protein binding penicilin” ou PBP). A base molecular da resistência a metilina é a síntese de proteínas de ligação à penicilina (PBPs) adicionais referidas como PBP2a. As PBPs possuem função de peptidoglicano-transpeptidases e atuam na “montagem” final do peptidoglicano da parede bacteriana (Silva, 2008).

Segundo Livermore (2000), o *S. aureus* normalmente possui três proteínas de ligação à penicilina, PBPs 1, 2, e 3 para catalisar a formação do peptidoglicano, sendo que os MRSA têm um componente adicional, o PBP2a, que tem uma baixa afinidade para  $\beta$ -lactâmicos, característica fundamental para a resistência a esta classe de antimicrobianos (Stapleton e Taylor, 2002). Ishihara et al. (2010) também concordam que os estafilococos resistentes à metilina produzem PBP codificada por *mecA* e que este gene pode ser usado como uma ferramenta para estudos de epidemiologia molecular para detectar estafilococos resistentes à metilina.

O uso indiscriminado dos antimicrobianos disponíveis no mercado e a alta capacidade adaptativa dos *S. aureus*, possibilitaram a seleção de resistência de alguns microorganismos a diversos antimicrobianos (Cardoso et al., 2000a). Atualmente, amostras de *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA) são reconhecidas como um dos principais problemas de infecção hospitalar no homem e em animais (Dias, 2010).

*S. aureus* resistente à metilina (MRSA) foram encontrados primeiramente em humanos. Mais tarde, eles foram detectados também em animais. Nos últimos anos, o aumento de estirpes que mostraram resistência à metilina tornou-se um sério problema clínico e epidemiológico. A

resistência do *S. aureus* pode ser causada pela transferência horizontal de determinantes, que pode acontecer em culturas mistas onde existam *S. epidermidis* que transferem plasmídeos para *S. aureus* sensíveis à metilina (MSSA) e estes, se tornam MRSA (Vyletelová et al., 2011).

Na rotina microbiológica, o diagnóstico para a espécie *S. aureus* resistente a metilina pode ser baseado em características fenotípicas e os métodos comumente utilizados são cultura bacteriológica com isolamento e identificação dos isolados, provas morfológicas e bioquímicas bem como provas de susceptibilidade a antimicrobianos. Estes métodos de identificação dependem do crescimento viável do micro-organismo e podem apresentar baixa sensibilidade (Phuektes et al., 2001) tornando necessário um teste genotípico e, para este fim, a detecção do gene *mecA* é considerada padrão ouro para o diagnóstico deste gene de resistência neste micro-organismo (Lee et al., 2004).

A identificação do gene de resistência à metilina em *Staphylococcus* é um indicador de resistência a outros antimicrobianos e de virulência dos isolados. Estirpes consideradas MRSA são frequentemente resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos, os macrolídeos, o cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas. O tipo de resistência do MRSA é denominado de resistência intrínseca, uma vez que não é devido à destruição do antibiótico por lactamases, e sim, por modificações na estrutura-alvo do antimicrobiano (Stapleton et al., 2007). Antes do surgimento e rápida disseminação de MRSA, os beta-lactâmicos foram a base para o tratamento de infecções estafilocócicas. A eficácia e segurança clínica desses antimicrobianos já são conhecidas, mas se tornou inversamente proporcional ao aumento da prevalência de infecções por MRSA (Sader et al., 2008).

Sousa e Lencastre (2003) detectaram mais de 3000 isolados de MRSA em estudo realizado em surtos de infecções hospitalares localizados na Europa, América Latina e Ásia, entre os anos de 1992-2001.

Mehrotra et al., (2000) avaliaram 19 estirpes obtidas a partir de amostras sabidamente MRSA. O resultado mostrou que 18 (94,73%) delas foram positivas para a presença do gene *mecA*, indicando que este é responsável pela resistência à metilina nessas estirpes.

O estudo de Al-Talib et al. (2009) otimizou um PCR para identificar espécies de *S. aureus* resistentes à metilina pela pesquisa do gene *mecA*. Dos 230 isolados clínicos, todos do gênero *Staphylococcus*, 82 isolados (35,65%) continham o produto do gene *mecA*, confirmando a resistência à metilina.

O trabalho de Sturenburg (2009) mostra que amostras clínicas podem conter estafilococos coagulase negativas (SCN) e *S. aureus*, sendo que, qualquer um destes pode transportar o gene *mecA*.

Tran et al. (2012) testaram a utilidade clínica da detecção de patógenos em sangue total em várias populações de pacientes através da PCR multiplex. Avaliaram cultura de sangue de 20 pacientes em tratamento para queimados através da PCR confrontando os dados com a cultura bacteriológica convencional. De um total de 13 micro-organismos isolados, dentre eles os *Staphylococcus* coagulase negativas, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, a PCR mostrou três (23%) isolados que foram identificados como MRSA. Outros três (23%) isolados identificados

como *S. aureus* e dois (15%) identificados como *Staphylococcus* coagulase negativas.

Aires-de-Souza et al. (2007) relataram que o conhecimento da distribuição de *S. aureus* em rebanhos leiteiros pode ajudar a formular estratégias para a redução da disseminação da infecção. Neste intuito, foram avaliadas 12 amostras de leite bovino, 16 de leite ovino, 18 de leite caprino e 33 leites de bubalino. Todos estes animais, avaliados previamente com mastite subclínica, eram pertencentes há áreas rurais do Rio de Janeiro/Brasil. Foram obtidos 30 isolados de *S. aureus* e nenhum deles apresentou o gene *mecA*.

Infecções mamárias por MRSA em bovinos leiteiros é um problema observado no campo (Lee et al., 2004) e a transmissão para alimentos, como o leite, é possível. Os MRSA representam um problema cosmopolita, sendo que o controle de sua disseminação tornou-se um importante desafio (Silva, 2008).

Dias et al. (2011), após analisarem 145 amostras de leite que amplificaram o gene *mecA*, observaram que entre as amostras analisadas, 16 (11,0 %) delas amplificaram este gene, identificando a existência de amostras de MRSA no leite produzido na microrregião de Sete Lagoas.

Vyletelová et al. (2011) coletaram 703 amostras de leite de tanque e 724 amostras de leites bovinos individuais, de vacas da raça holandesa, obtidos de animais com suspeita de mastite, de acordo com testes pré-definidos. Tanto nos isolados de *S. aureus* como nos SCN foi pesquisada a presença do gene *mecA*. Das amostras de tanque foram isolados 326 *S. aureus* e destes, 20 (6,1%) apresentaram o gene *mecA*. Foram encontrados oito isolados *S. epidermidis* e o gene *mecA* se apresentou em todos (100%). Das amostras de leites bovinos individuais foram encontrados 180 *S. aureus* e destes, apenas 3 (1,7%)

apresentaram o gene *mecA*. Foram obtidos quatro isolados de *S. epidermidis* e o gene *mecA* estava presente em um (0,3%) isolado.

Zutic et al. (2012) avaliaram 212 bovinos de leite, com mastite subclínica, de duas fazendas no noroeste da Sérvia. Foram examinados todos os quartos mamários e foram retiradas amostras de leite daqueles que apresentavam testes positivos para a prova de CMT. Os 84 (39,6%) isolados de *S. aureus* obtidos destas amostras foram testados para a presença do gene *mecA*, por PCR, sendo confirmado em 12 (14,28%) dos isolados.

Soares et al. (2012) avaliaram 228 vacas com mastite subclínica de 25 fazendas, em seis cidades diferentes, pertencentes a uma região produtora de leite, do Estado do Rio de Janeiro/Brasil. Estes autores pesquisaram a presença do gene *mecA* em 100 amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), isolados destes leites e obtiveram quatro (4%), isolados positivos para este gene.

## 2.7 Resistência aos antimicrobianos

Por definição, antibiótico ou antimicrobiano são substâncias químicas que inibem o crescimento ou destroem o micro-organismo. Dentre as características gerais das drogas antimicrobianas estão a toxicidade seletiva, ou seja, atuar seletivamente sobre o patógeno sem provocar danos ao hospedeiro e ter um espectro de ação que refere-se à diversidade de organismos afetados pelo agente (Kyaw, 2011). Os antimicrobianos são produtos de enorme importância não apenas na área da saúde, como também na economia. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que mais de 50% das prescrições de antimicrobianos no mundo são inadequadas. Segundo o relatório do instituto IMS Health, apenas no Brasil, o comércio de antimicrobianos movimentou

em 2009 cerca de R\$ 1,6 bilhão (Controle..., 2011). Os antimicrobianos podem ser classificados em bacteriostáticos ou bactericidas. Se bacteriostático, causa apenas inibição do crescimento bacteriano, sem levar o micro-organismo à morte. Por outro lado, se for bactericida, destrói o micro-organismo. Podem também ser agrupados de acordo com a sua estrutura química e modo de ação. São utilizados na medicina humana, na medicina veterinária, agricultura, conservação de alimentos, controle de processos fermentativos e nas pesquisas básicas na área de biologia molecular, bioquímica, genética, microbiologia e farmacologia (Filho, 2007).

A resistência microbiana pode ser natural, por ausência da estrutura ou via metabólica alvo, pode ser adquirida através de mutações espontâneas e seleção ou por recombinação após transferência de genes. Dentre os principais mecanismos de resistência podemos citar impermeabilidade à droga, inativação da substância, modificação de enzima/estrutura alvo e bombeamento (efluxo da droga) para o meio extracelular (Kyaw, 2010). O *S. aureus* representa um grande risco para a saúde pública. Este micro-organismo é capaz de acumular mais de um mecanismo de resistência a vários compostos disponíveis clinicamente, incluindo a família dos beta-lactâmicos (penicilina, oxacilina, ampicilina, amoxicilina e outros), as recentes quinolonas anti-Gram-positivos (enrofloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina e outros), bem como as drogas de último recurso do grupo dos glicopeptídeos (vancomicina). *Staphylococcus* spp. podem criar mecanismos que irão minimizar a ação dos beta-lactâmicos por pelo menos dois mecanismos: secreção de penicilinas e a produção de beta-lactâmicos de baixa afinidade - PBP2a. As primeiras são enzimas que inativam o antimicrobiano e as PBP2a são utilizadas para montar a parede do peptidoglicano da bactéria enquanto a mesma disponibiliza outras PBPs de

“descarte” para se ligarem aos beta-lactâmicos e bloqueá-los. Desta forma acabam “fornecendo um falso sítio de ligação” para a droga (Vouillamoz et al., 2004).

A utilização de antimicrobianos para o tratamento da mastite clínica ou da mastite subclínica, no início do período seco e durante a lactação, é um componente importante dos programas de controle. A seleção do antimicrobiano apropriado é essencial, tanto do ponto de vista da saúde do animal, quanto da produtividade da glândula mamária e os resultados dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos ajudam o veterinário clínico na escolha do medicamento apropriado (Cardoso, 2000; Brito et al., 2001; Costa, 2008).

Os testes de susceptibilidade em ágar são indicados, com maior frequência, quando se acredita que o organismo causador da infecção pertence a uma espécie capaz de demonstrar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados tanto para tratamento na medicina humana quanto na medicina veterinária. O método de disco-difusão em ágar, ou antibiograma, descrito por Bauer et al. (1966), é uma metodologia de fácil execução e custo relativamente baixo (Neves, 2010) amplamente utilizada na prática laboratorial. A única desvantagem deste método é a determinação somente qualitativa (sensível, intermediário e resistente) do micro-organismo em relação ao antimicrobiano testado (Kalmus, 2011).

Langoni et al. (2000) ao avaliarem isolados de *S. aureus* em casos de mastites subclínicas e clínicas da cidade de Botucatu, obtiveram 83% de sensibilidade à enrofloxacina utilizada via intramamária.

Em Minas Gerais, Cardoso et al. (2000a), no período de 1994 a 1997, isolaram e submeteram ao antibiograma 127 amostras de *S. aureus* provenientes de 23 municípios. Os antibióticos mais efetivos foram

cefotaxima (100%), enrofloxacina (98,4%), gentamicina (98,4%), rifampicina (96,1%), cloranfenicol (90,4%), sulfazotrim (86,6%) e novobiocina (85,8%). Polimixina B, ampicilina e penicilina G formam as drogas menos efetivas de acordo com os testes *in vitro*, com percentuais de sensibilidade de 8,7%, 28,6% e 29,1%, respectivamente.

Marinho et al. (2002), avaliaram o perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de leite de vacas com mastite, pelo método de disco-difusão em ágar, utilizando o antimicrobiano enrofloxacina. O trabalho mostrou que, das 141 amostras de *Staphylococcus aureus*, 101 (71,63%) foram sensíveis, 26 (18,43%) foram intermediárias e 14 (9,92%) foram resistentes. Ao analisar os SCN, observaram que, das 96 amostras testadas, 71 (73,96%) foram sensíveis, 12 (12,50%) foram intermediárias e 14 (14,58%) foram resistentes.

Freitas et al. (2005) traçaram o perfil de sensibilidade antimicrobiana de 59 cepas de estafilococos coagulase positiva isolados de amostras de leite de vaca com mastite. Os testes de sensibilidade antimicrobiana foram realizados através da técnica de difusão com discos para 13 antibióticos, verificando-se que os mais eficazes foram a vancomicina com 100% e a norfloxacina com 96% dos isolados testados sensíveis. O menos eficaz foi penicilina G 10 UI com 20% dos isolados sensíveis.

O trabalho de Shittu e Lin (2006) de avaliação de isolados de amostras clínicas de um hospital no norte da África demonstrou que amostras de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva apresentaram 88,6% de resistência à penicilina.

Aires-de-Sousa et al. (2007) avaliaram 30 isolados de *S. aureus*, obtidos de leite de vacas, ovelhas, cabras e búfalas, com mastite subclínica, pelo método de disco-difusão em ágar, de 10 municípios do Estado do Rio de

Janeiro. Destes isolados, 10 (33%) foram resistentes a penicilina.

Costa (2008) observou um perfil de resistência acima de 80% aos antimicrobianos ampicilina, penicilina G e polimixina B em 352 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de bovinos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais.

Ferreira (2008b), ao avaliar 245 *S. aureus* isolados de leite de vacas com mastite, observou, pelo método de disco-difusão em ágar, resistência de 69% para a penicilina.

Neves et al. (2010) avaliaram a susceptibilidade dos agentes antimicrobianos em 83 cepas de *S. aureus* originados da superfície da pele dos tetos de 38 vacas mestiças lactantes de propriedades leiteiras do Estado de São Paulo. Utilizando o método de disco-difusão em ágar, os autores encontraram sensibilidade de 4% para penicilina, 88% para tetraciclina e 92% para gentamicina.

No estudo de Kalmus et al. (2011), foram analisadas 3.058 amostras de leite de vacas com mastite. Foram isolados *Streptococcus uberis* (18,4%), *Escherichia coli* (15,9%), *Streptococcus agalactiae* (11,9%), *Staphylococcus aureus* (20%) e estafilococos coagulase-negativa (SCN) (15,4%). Os isolados de *S. aureus* apresentaram, pelo método de disco-difusão em ágar, resistência aos antimicrobianos como à penicilina G 10 UI (61,4%), cefalotina (3,8%), tetraciclina (4,1%), SUT (3,4%) e gentamicina (6,8%). Também foram encontrados SCN, que apresentaram resistência aos antimicrobianos como à penicilina G 10 UI (34,4%), cefalotina (3,6%), tetraciclina (11,6%), SUT (2,6%) e gentamicina (1,4%).

Segundo o trabalho de Haran et al. (2012), a presença do *S. aureus* relacionado com mastite bovina é um motivo comum para uso

terapêutico e/ou profilático de antibióticos em propriedades leiteiras. O mesmo analisou 101 amostras de leites crus de 42 propriedades (coletados a partir do tanque, latas de leite e cubas de queijo). Dos 93 isolados de *S. aureus* MSSA, avaliados pelo método de disco-difusão em ágar, 16% eram resistentes à penicilina e tetraciclina, 17% à ampicilina e 1% à cefalotina.

Mesmo que o método de disco-difusão em ágar demonstre alto grau de reprodutibilidade, os critérios de interpretação da medida do halo de inibição que determinam a susceptibilidade ou resistência são baseados em características dos agentes antimicrobianos observadas no soro ou nos tecidos humanos, e não foram validados para os patógenos da glândula mamária. A susceptibilidade a antimicrobianos é também avaliada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Esse método está padronizado, possui detalhamento técnico bem definido e apresenta a vantagem de fornecer dados quantitativos que podem ser interpretados considerando as características farmacológicas e farmacocinéticas dos antimicrobianos e a concentração mínima a ser alcançada no úbere bovino (Brito et al, 2001; Salvarani et al., 2008; Neves, 2010; Kalmus, 2011).

Brito et al. (2001) avaliaram 112 amostras de *Staphylococcus aureus*, pelo CIM, isoladas de infecções intramamárias bovina, em 33 rebanhos leiteiros da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. Os resultados mostraram 100% de susceptibilidade a cefalotina, com CIM<sub>90</sub> de 0,25 µg/mL, 100% de susceptibilidade a gentamicina, com CIM<sub>50</sub> de 0,25 µg/mL e CIM<sub>90</sub> de 0,5 µg/mL, 65% de susceptibilidade a penicilina, com CIM<sub>50</sub> de 0,06 µg/mL e CIM<sub>90</sub> de 0,5 µg/mL, 91% de susceptibilidade a tetraciclina, com CIM<sub>50</sub> de 0,5 µg/mL e CIM<sub>90</sub> de 1 µg/mL.

Diniz (2010) avaliou 14 *S. aureus*, isolados de leite de vacas com mastite, de várias

propriedades do município de Uberlândia/MG, e mostrou que, cinco destes isolados de *S. aureus* foram resistentes a oxacilina com CIM >256µg/mL.

Rubin et al. (2011) ao testarem o CIM para 123 amostras de *S. aureus* de origem bovina, encontraram 26 (21%) de resistência à penicilina com CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> variando de 0,06 a 0,5 µg/mL; 1 isolado (0,8%) de resistência à tetraciclina com CIM<sub>50</sub> de 2 µg/mL e CIM<sub>90</sub> de 32 µg/mL.

Haran et al. (2012), após analisarem 101 amostras de leites crus coletados a partir de tanque identificaram dois isolados de *S. aureus* MRSA. Destes, 50% foi resistente à enrofloxacina com CIM > 2 µg/mL e 100% foi resistente à penicilina com CIM > 8µg/mL.

Klein (2010) avaliou 85 isolados de *S. aureus*, obtidos de vacas com mastite, pertencentes a rebanhos leiteiros da região sudeste de Minas Gerais. Destes realizou o teste CIM de apenas dois isolados e foi observado CIM de 0,8 µg/mL para gentamicina. Além dos *S. aureus*, é possível encontrar cada vez mais trabalhos que realizaram testes pelo método de disco-difusão em ágar e pelo testes de CIM em isolados de *Staphylococcus* spp., obtidos de amostras de leite de vacas com mastite.

Oliveira et al. (2011) pesquisaram a prevalência e a etiologia da mastite bovina na bacia leiteira do município de Rondon no Estado do Pará e avaliaram o perfil de sensibilidade e resistência dos agentes isolados frente a antimicrobianos. Estes autores encontraram 74 isolados de microorganismos diferentes (*S. aureus*, *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium*) e dentre estes, 24 SCN (32,43%). No antibiograma, 100% dos isolados de SCN foram sensíveis ao sulfazotrim, 91,3% sensíveis à gentamicina, 87% sensíveis à cefalotina, 78,3% sensíveis à enrofloxacina e 73,9% sensíveis à tetraciclina.

### 3. HIPÓTESES

*Staphylococcus aureus* isolados de leite cru de bovinos podem ser identificados fenotipicamente e genotipicamente, pela detecção do gene *femA*, podem apresentar genes de resistência à meticilina (MRSA) e genes para enterotoxinas estafilocócicas.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo geral

Caracterizar a incidência de *S. aureus* em amostras de leite cru bovino e dos genes das enterotoxinas que podem ser produzidas por este micro-organismo.

#### 4.2 Objetivos específicos

Fazer a identificação fenotípica de *Staphylococcus* spp. de colônias isoladas das amostras de leite cru em ágar Baird-Parker (BP).

Fazer a identificação genotípica de *S. aureus*, por PCR, com a pesquisa do gene *femA*.

Avaliar os isolados quanto à resistência à meticilina, por PCR, com a pesquisa do gene *mecA*.

Submeter os isolados, identificados genotipicamente como *S. aureus*, à PCR, para observar a presença dos genes que codificam as enterotoxinas estafilocócicas.

Testar a susceptibilidade a antimicrobianos, de todos os isolados, pelo método de disco difusão em ágar e pelo teste de concentração inibitória mínima – CIM.

Verificar a distribuição de *S. aureus* potencialmente produtores de enterotoxinas em amostras de leite de tanque de cinco mesorregiões produtoras do Estado de Minas Gerais.

### 5. MATERIAL E MÉTODOS

#### 5.1 Local de realização do experimento

As amostras de leite foram obtidas no Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG) no período de Julho de 2009 a março de 2010. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico das Doenças Infecciosas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (LPDDI/DMVP). Os dois laboratórios possuem instalações na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG.

#### 5.2 Amostras de leite

Foram obtidas 251 amostras de leite cru refrigerado, com contagem bacteriana total - CBT acima de  $1,0 \times 10^5$  ufc/mL, de tanques de expansão, no período de Julho de 2009 a Março de 2010, recebidas pelo LabUFMG. As amostras foram entregues em caixas térmicas em refrigeração de 4 a 7°C, no prazo máximo de 72 horas após a ordenha. As amostras foram recebidas em frascos plásticos padronizados contendo substância bacteriostática conhecida como azidiol (associação de cloranfenicol e azida sódica). Segundo Leite (2006), este conservante é utilizado no país em função do grande número de fazendas e da extensão territorial, resultando em um longo tempo decorrido entre a coleta do leite e da realização da análise nos laboratórios. O azidiol pode ser utilizado sem que haja qualquer prejuízo nos resultados das análises. Após chegarem ao laboratório, as amostras foram numeradas e a cidade de origem das mesmas (presente no rótulo de cada uma delas) foi registrada. Este registro da origem foi realizado apenas para ilustrar o universo amostral (fig.2) e os resultados obtidos a partir destas amostras foram mostrados de forma descritiva. Dessa forma, foram registradas 30 amostras de leite da cidade de Abaeté (região Central Mineira); 32 amostras da cidade de Paracatu (Noroeste de Minas); cinco amostras da

cidade de Poté (Vale do Mucuri); 113 amostras de Bonfim e Sete lagoas (Região metropolitana de Belo Horizonte) e 71 amostras de Guanhães e Resplendor (região

do Vale do Rio Doce), totalizando sete cidades pertencentes a cinco mesoregiões do Estado de Minas Gerais.

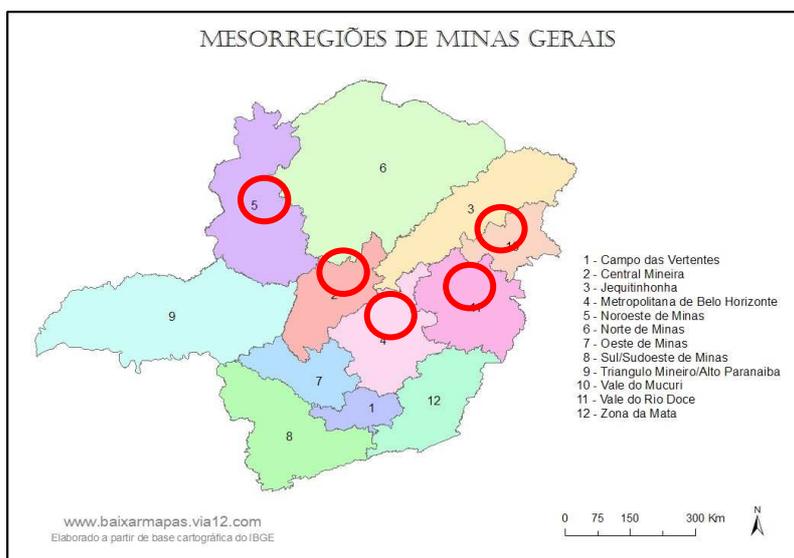


Figura 2 – Regiões de origem das amostras de leite.

### 5.2.1 – Colônias isoladas a partir das amostras de leite

Assim que chegaram ao LPDDI/DMVP, as amostras de leite, foram registradas e encaminhadas para a microbiologia. Cada amostra, após ser deixada à temperatura ambiente por 15 minutos foi vertida 25 vezes. Com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril foi recolhida uma alíquota para plaqueamento direto em ágar seletivo Baird-Parker (BP) (Himedia Laboratories M043, Índia), suplementado com gema de ovo e telurito de potássio (Egg yolk com telurito, Laborclin). Após este procedimento, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Foram selecionadas tres a cinco colônias denominadas típicas: negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio e/ou atípicas: acinzentadas ou

negras brilhantes, sem halo. Também foi realizada a prova de coagulase em tubo como parte da identificação fenotípica (Koneman, 1991; Quinn et al., 1994; Silva, 2004) dos *Staphylococcus* spp. Utilizou-se plasma de coelho liofilizado (Newprov®) segundo recomendações do fabricante. As colônias isoladas foram colocadas em caldo BHI e incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 18 a 24 horas. Posteriormente uma alíquota de 0,5 mL de cada cultura foi colocada em um tubo de ensaio juntamente com 0,5 mL do plasma de coelho recém-reconstituído com soro fisiológico estéril. Estas amostras foram colocadas em banho-maria a 36°C por quatro horas, observando a formação de coágulo a cada trinta minutos. Se o coágulo não fosse visível após quatro horas, os tubos eram deixados no banho-maria com diminuição de 1 grau (35°C) até completarem 24 horas. As colônias foram classificadas em coagulase

positivas (CP) ou coagulase negativas (CN) de acordo com a presença ou ausência, respectivamente, de um coágulo firme no interior do tubo.

Além destes testes, as colônias isoladas foram submetidas às provas tintoriais de Gram e bioquímicas de acordo com os protocolos de Quinn et al. (1994). Para os testes foram utilizadas amostras de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 como controles positivo e negativo, respectivamente. As colônias isoladas foram inoculadas em caldo BHI com 20% de glicerol a  $-20^{\circ}\text{C}$  (v/v) e congeladas em tubos tipo eppendorfs de 1,5mL, em triplicata, para utilização posterior.

#### 5.2.2 – Extração de DNA

As colônias isoladas das amostras de leite foram submetidas à extração de DNA pelo método da extração alcalina (Silva e Silva, 2005; Silva, 2008; Dias, 2010). Este método foi escolhido para diminuir a interferência de compostos como cálcio, proteinases, gordura e proteínas que podem bloquear o DNA e inibir o acesso da polimerase. Por este método é possível conseguir um DNA de qualidade para a amplificação por PCR (Silva e Silva, 2005; Cremonesi et al., 2006).

As colônias isoladas, foram reativadas em um 1 mL de caldo BHI e incubadas em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Esta suspensão de bactérias foi transferida para tubos tipo eppendorf e centrifugadas em  $2.627 \text{ X g}$  por 5 minutos a  $24^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos para obtenção de um precipitado de bactérias. O mesmo procedimento foi realizado com os controles positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e controle negativo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (Pottumarthy et al., 2004). Logo após procedeu-se à extração alcalina do DNA bacteriano dos isolados obtidos nas plascas de BP, cujo protocolo foi readaptado a partir dos trabalhos de

Cremonesi et al. (2006), Silva e Silva (2005) e Silva (2008) onde o tampão NET (50mM NaCl, 125 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl -pH 7,6) foi substituído pela solução de Tris-EDTA (TE) (10 mmol/L Tris-HCL e 1 mmol/L EDTA-pH 8). Para a extração diretamente do leite foi utilizado o protocolo proposto por Dias (2010). As amostras de leite depois de descongeladas foram homogeneizadas em agitador de tubos e, posteriormente, aliquotadas em volume de 0,5 mL, em microtubos de 1,5 mL, e adicionado a esta 1 mL da solução de lavagem alcalina (0,5 mol/L de NaOH e 0,05 mol/L de Citrato de Sódio). Esta solução foi homogeneizada no agitador de tubos e centrifugada em mini-centrifuga a  $17.760 \text{ X g}$  por 20 minutos a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . Após descartar o sobrenadante, o precipitado obtido foi homogeneizado em 1 mL de Tris-HCL (10,5 mol/L pH 8,0) e novamente centrifugado a  $17.760 \text{ X g}$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 100  $\mu\text{L}$  de solução Tris-EDTA (TE-pH 8) e, então, aquecido a  $96^{\circ}\text{C}$ , por duas horas em termo-bloco. Após essa etapa, adicionou-se o mesmo volume de solução de fenol-clorofórmio e homogenizou-se em agitador de tubos por 10 segundos. Posteriormente foi realizada outra centrifugação a  $2.627 \text{ X g}$  por 5 minutos a  $24^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido para outro microtubo com auxílio de uma pipeta. Essa etapa de extração com fenol-clorofórmio foi repetida mais duas vezes sendo que na última vez utilizou-se apenas o clorofórmio. Após esta etapa o sobrenadante foi transferido para outro microtubo, ao qual foi adicionado etanol 95% (duas vezes o volume inicial). Essa solução foi refrigerada por 1 hora a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para precipitação do DNA. Após esse período, a solução foi centrifugada a  $17.760 \text{ x g}$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% para hidratação do DNA. Repetiu-se a centrifugação e descartou-se o sobrenadante. Os microtubos foram deixados abertos

dentro da cabine de segurança biológica até a completa evaporação do álcool. O precipitado foi ressuspendido em 20 µL de solução Tris-EDTA (TE) e armazenado a – 20 °C, até a sua utilização. A quantidade de DNA foi mensurada por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop®ND-1000 UV-Vis).

### 5.3 – Utilização de reação em cadeia da polimerase - PCR

#### 5.3.1 – Detecção do gene *femA* pela técnica da PCR

#### 5.3.1.2. Detecção do gene *femA* em colônias isoladas a partir do leite

A PCR para o gene *femA* (tab.1) foi utilizado para identificar as amostras positivas para a presença de *S. aureus* no DNA extraído das colônias isoladas das amostras de leite. Para controle positivo e negativo foram utilizadas, respectivamente, culturas padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Tabela 1– Sequência de primers utilizados para detecção do gene *femA* para identificação de *Staphylococcus aureus*, sequência de oligonucleotídeos e tamanho esperado do produto de PCR

Gene	Primer	Sequencia de oligonucleotídeos 5’-3’	Tamanho do produto amplificado
<i>femA</i>	<i>femA</i> -1	5’ AAAAAAGCACATAACAAGCG 3’	132 pb
	<i>femA</i> -2	5’ GATAAAGAAGAAACCAGCAG 3’	

A seqüência de nucleotídeos foi derivada de seqüências publicadas nos trabalhos de Mehrotra et al., (2000) e Dias, (2010).

O volume e concentração dos componentes da reação foram 2,3µL de tampão especial 5x (IVB Phoneutria®) na concentração de 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 100mM de cada par de primers; 0,8 mM de dNTP; 1,0 U de Taq polimerase; 30 a 100ng do DNA extraído. O volume final da reação foi ajustado para 20µL com água ultra-pura. As amostras foram colocadas em um termociclador MiniCycler™ (MJ Research) e foram incubadas inicialmente a 94°C por 2 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 59°C por 40 segundos, 72°C por 2 minutos e uma incubação final de 72°C por 4 minutos. Após o processo ser finalizado, a temperatura de retirada das amostras foi de 4°C para preservação do DNA. Os produtos amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% com corrida em tampão TBE (Tris-borato-EDTA, pH 8,0) em

concentração de 0,5X, submetido a uma tensão de 100 volts por 90 minutos. Esta metodologia foi adaptada a partir do trabalho de Dias (2010).

Todos os isolados, identificados como *S. aureus* (*femA* positivos) ou *Staphylococcus* spp. (*femA* negativos), pela detecção do gene *femA* foram utilizados para os testes de susceptibilidade a antimicrobianos pelo método de disco-difusão em ágar e pelo teste de concentração inibitória mínima (CIM). Da mesma forma, foram utilizados nos testes posteriores de PCR para investigação da presença do gene *mecA* (resistência à meticilina) e dos genes que codificam enterotoxinas estafilocócicas.

### 5.3.1.3.–Detecção do gene *femA* diretamente do leite

Com o objetivo de detectar a presença do gene *femA* diretamente das amostras de leite recebidas, foi padronizado um PCR para este fim, utilizando a mesma metodologia descrita por Silva (2008) e Dias (2010).

### 5.3.1.4.–Sensibilidade do método de PCR para detecção do gene *femA*

A amostra da bactéria *S.aureus* ATCC 25923 foi plaqueada em ágar cérebro coração (BHI- Brain heart infusion ágar) e incubada por 24 horas. Após a incubação, assepticamente, em fluxo laminar, foi feita a padronização do inóculo colocando de 3 a 5 colônias em 1 mL de PBS estéril, até atingir turbidez 0,5 da escala de McFarland. Foram obtidas diluições decimais seriadas, de base 10, a partir da cultura variando de  $10^{-1}$  até  $10^{-10}$ . Simultaneamente ao teste, foi feito o plaqueamento de 0,1 mL das diluições seriadas, por semeadura de superfície, em triplicata, sobre o ágar cérebro coração (BHI- Brain heart infusion ágar), com o

auxílio de alça de Drigalski estéril. Após a absorção total do inóculo, as placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após este período foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) para cada diluição (Cremonesi et al., 2006).

Cada tubo, contendo uma diluição seriada, foi centrifugado e o precipitado obtido foi encaminhado à extração do DNA. Logo após, procedeu-se à PCR no intuito de aferir a sensibilidade de detecção (Silva, 2008) do gene *femA* nas diversas contagens da bactéria (Pottumarthy et al., 2004, Silva e Silva, 2005).

### 5.3.2 –Detecção do gene *mecA* em colônias isoladas a partir do leite

O gene *mecA* (tab.2) foi pesquisado em todos os 323 isolados para identificar aqueles que possuíam este gene de resistência à meticilina. Para os testes, foi utilizada cultura padrão de *S. ureus* (MRSA) já existente na bacterioteca do LPDDI como controle positivo (Silva, 2008).

Tabela 2 – Sequência de primers utilizados para detecção do gene *mecA* para resistência à meticilina

Gene	Primer	Sequencia de oligonucleotídeos 5'-3'	Tamanho do produto amplificado
<i>mecA</i>	<i>mecA</i> -1	5' AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC 3'	533 pb
	<i>mecA</i> -2	5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC 3'	

A sequência de nucleotídeos foi derivada de seqüências publicadas dos genes *mecA* descritos por Lee (2003) e Silva (2008).

Primeiramente, foi realizado PCR individual para este gene. Foi padronizada uma reação com volume final de 50µL. O volume e concentração dos componentes da reação foram 2,5µL de tampão especial 10x (100 mM Tris-HCL [pH8,3], 500 mM KCL, IB Phoneutria®) na concentração de 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5mM de cada par de primers; 0,2 mM de dNTP; 2,0 U de Taq polimerase; 30 a 100ng do DNA extraído. As amostras

foram colocadas em um termociclador MiniCycler™ (MJ Research) e foram incubadas inicialmente a 94°C por 5 minutos, seguidos por 39 ciclos de 94°C por 1 minuto, 59°C 1 minuto, 72°C por 2 minutos e uma incubação final de 72°C por 10 minutos. Após o processo ser finalizado, a temperatura de retirada das amostras foi de 4°C para preservação do DNA. Os produtos amplificados foram visualizados após

eletroforese em gel de agarose a 2% com corrida em tampão TBE (Tris-borato-EDTA, pH 8,0) em concentração de 0,5X, submetido a uma tensão de 100 volts por 90 minutos. O padrão DNA Ladder de 100pb foi utilizado como marcador. Após esta etapa de PCR individual, seguiu-se para a otimização de PCR biplex.

### 5.3.3 – PCR biplex e detecção dos genes *femA*+*mecA* em *Staphylococcus* spp. isolados a partir do leite

Foi otimizada uma reação biplex, com a pesquisa dos genes *femA* (132pb) + *mecA*

(533pb) nas mesmas condições da PCR padronizada anteriormente, volume final de 50µL e com 2 pares de primers. Com isso os testes foram realizados em menor tempo.

### 5.3.4. Detecção dos genes codificadores para as enterotoxinas estafilocócicas

Para a investigação, por PCR, da presença dos genes que codificam para as enterotoxinas estafilocócicas foram utilizadas sequências de nucleotídeos já publicadas (Tab.3).

Tabela 3 – Sequência de primers utilizados para detecção dos genes das enterotoxinas estafilocócicas

Gene	Primer	Sequencia de oligonucleotídeos 5'-3'	Tamanho do produto amplificado
seA <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13565	<i>SeA</i> -1	5' TTGGAAACGGTTAAAACGAA 3'	120 pb
	<i>SeA</i> -2	5' GAACCTTCCCATCAAAAACA 3'	
seB <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458	<i>SeB</i> -1	5' TCGCATCAAACGACAAACG 3'	478 pb
	<i>SeB</i> -2	5' GCAGGTACTCTATAAGTGCC 3'	
seC <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 19095	<i>SeC</i> -1	5' GACATAAAAGCTAGGAATTT 3'	257 pb
	<i>SeC</i> -2	5' AAATCGGATTAACATTATCC 3'	
seD <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 23235	<i>SeD</i> -1	5' CTAGTTTGGTAATATCTCCT 3'	317 pb
	<i>SeD</i> -2	5' TAATGCTATATCTTATAGGG 3'	
seE <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27664	<i>SeE</i> -1	5' AGGTTTTTTTCACAGGTCATCC 3'	209 pb
	<i>SeE</i> -2	5' CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC 3'	

Segundo os registros destas amostras, a sequência de nucleotídeos e a localização gênica foi derivada de sequências publicadas dos genes seA, seB, seC e seD nos trabalhos de Johnson et al. (1991), Silva (2004); Rajkovic et al. (2006) e Rall et al. (2008). Da mesma forma, sequência de nucleotídeos dos genes seE foram obtidos do trabalho de Mehrotra, (2000). O *S. epidermidis* (ATCC 12228) foi utilizado para testar a especificidade da técnica e como controle

negativo (Dias, 2010; Dias et al., 2011). Foi utilizado inicialmente o método de PCR individual para cada par de primers das bactérias ATCC produtoras de enterotoxinas a fim de padronizar os testes (Silva e Silva, 2005; Cremonesi et al., 2006; Silva, 2008).

O volume e concentração dos componentes da reação foram 2,5µL de tampão especial 10x (100 mM Tris-HCL [pH8,3], 500 mM KCL, Phoneutria®) na concentração de 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5mM de cada par de

primers; 0,2 mM de dNTP; 2,0 U de Taq polimerase; 20 a 100ng do DNA extraído. O volume final da reação foi ajustado para 50µL. As amostras foram colocadas em um termociclador MiniCycler™ (MJ Research) e foram incubadas inicialmente a 94°C por 5 minutos, seguidos por 39 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 52°C 1 minuto, 72°C por 2 minutos e uma incubação final de 72°C por 10 minutos. Após o processo ser finalizado, a temperatura de retirada das amostras foi de 4°C para preservação do DNA. Esta metodologia foi adaptada do trabalho de Mehrotra, (2000), Silva (2004) e Silva (2008). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de ágarose a 2%, contendo brometo de etídio a 1 mg/mL, em 100V por 100 minutos, em tampão TBE (Tris-borato-EDTA, pH 8,0) em concentração de 0,5X. O padrão DNA Ladder de 100pb foi utilizado como marcador.

### 5.3.5 Visualização dos produtos amplificados

A visualização das bandas amplificadas foi realizada sob luz ultravioleta em gel de ágarose a 2%, contendo brometo de etídio a 1mg/mL, (Phuektes et al., 2001; Silva, 2004; Silva, 2008). Os géis foram fotografados com a utilização do programa LPix Image através do aparelho L.Pix Molecular Imaging Loccus Biotechnology®.

## **6 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DISCO-DIFUSÃO EM ÁGAR**

Diversos métodos laboratoriais podem ser empregados para predizer a susceptibilidade

*in vitro* de bactérias aos agentes antimicrobianos. Muitos laboratórios de microbiologia clínica usam de forma rotineira, o método de disco-difusão em ágar para testar patógenos comuns de crescimento rápido e certas bactérias fastidiosas. Os testes de susceptibilidade são indicados para qualquer organismo que cause um processo infeccioso que requeira terapia antimicrobiana. O método de disco-difusão em ágar, padronizado e descrito originalmente por Bauer et al. (1966) conta atualmente com padrões de interpretação apoiados por dados laboratoriais e clínicos segundo Methodology (2003) e Methods (2009).

Foi testada a susceptibilidade das colônias positivas para o gene *femA*, consideradas portanto, *S. aureus* e das colônias negativas para o gene *femA*, consideradas *Staphylococcus* spp., com antimicrobianos de uso na prática médico – veterinária (tab.4). Foram utilizados Amoxicilina (AMOX) 10 µg, beta lactâmico subgrupo penicilina; Azitromicina (AZIT) 15 µg, macrolídeo; cefalotina (CFL) 30 µg, cefalosporina 1ª geração; enrofloxacin (ENO) 5 µg, quinolona; gentamicina (GEN) 10 µg, aminoglicosídeo; lincomicina (LIN) 2 µg, lincosamida; penicilina G (PEN) 10 UI, betalactâmico; sulfametoxazole-trimethoprim (SUT) 25 µg, sulfamida e tetraciclina (TET) 30 µg, do grupo das tetraciclina. Da mesma forma foram testadas as bactérias controle *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Methods, 2005; Dias 2010).

Tabela 4 – Normas interpretativas do teste de disco-difusão em ágar para *Staphylococcus* spp., de acordo com Methods (2009)

Agente antimicrobiano	Concentração dos discos (µg)	Halos de inibição utilizados como referência para interpretação dos resultados		
		Sensível (S)	Intermediário (I)	Resistente (R)
Amoxicilina*	10 µg	≤ 20	-	≥ 20
Azitromicina	15 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
Cefalotina	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Enrofloxacin	5 µg	≤ 12	13-16	≥ 17
Gentamicina	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Lincomicina**	2 µg	≤ 14	15-20	≥ 21
Penicilina	10 UI	≤ 28	-	≥ 29
Sulfametoxazol-trimetoprim	25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16
Tetraciclina	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19

Adaptado de Methods (2005).

\*Amoxicilina (Beta-lactâmico grupo das penicilinas) que inclui penicilina, oxacilina, ampicilina, amoxicilina. Foi utilizado o padrão de leitura para ampicilina.

\*\* Lincomicina (grupo das lincosamidas). Foi utilizado o padrão de leitura para clindamicina.

Uma alíquota das colônias isoladas e estocadas com 20% de glicerol a -20°C (v/v) (Phuektes et al., 2001) foi colocada em um novo caldo BHI e mantida em estufa bacteriológica a 37°C por 4 horas para reativação. Estas amostras foram plaqueadas em ágar Mueller Hinton (MH) (Himedia Laboratories M173, Índia), e deixadas por 18 a 24 horas para o aparecimento de colônias. Após este período foram coletadas de três a cinco colônias e estas foram suspensas em PBS estéril e padronizadas quanto à turbidez de acordo com a escala 0,5 de McFarland (Methods, 2000). Esta suspensão foi plaqueada com “swab” estéril em placa de petri descartável, de 150 X 10 mm de diâmetro, contendo ágar MH, em seguida foram colocados os nove discos de antibiogramas e a placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 18 horas e após este período foi realizada a mensuração dos halos de inibição.

A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com Performance... (2010) e a tabela de interpretação Sensidisc-DME® e Methods (2009) e os critérios interpretativos recomendados são de acordo com o tamanho do diâmetro dos halos de inibição de cada

antimicrobiano. As leituras foram consideradas “sensíveis”, “intermediárias” ou “resistentes”. A categoria “sensível” (S) significa que uma infecção por determinada cepa pode ser tratada adequadamente com a dose de agente antimicrobiano recomendada para esse tipo de infecção e espécie infectante, exceto quando contraindicado. A categoria “intermediária” (I) indica que as taxas de respostas podem ser inferiores àquelas para isolados sensíveis. As cepas “resistentes” (R) não são inibidas pelas concentrações sistêmicas dos agentes antimicrobianos geralmente atingíveis nos regimes terapêuticos normais e/ou se inserem na faixa de maior probabilidade de ocorrência de mecanismos específicos de resistência microbiana (Methods, 2005).

## 7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) é a menor concentração do antimicrobiano que apresenta efeito inibitório frente ao micro-organismo testado. É definida como a menor concentração em que não será observado

nenhum crescimento bacteriano visível a olho nu (Methodology, 2003).

### 7.1 Diluição dos antimicrobianos e preparação das soluções de trabalho

Cada antimicrobiano, obtido na forma de pó, foi estocado como recomendado pelo fabricante e as soluções e a concentração final nas placas de ágar MH variaram de 0,12 µg/l até 256 µg/l de acordo com Methods (2005). Cada solução de antimicrobiano foi preparada de acordo com as normas de Methodology (2003) e Methods (2005 e 2009) para determinação da CIM sendo utilizadas as seguintes bases: amoxicilina (AMOX), beta lactâmico subgrupo penicilina; azitromicina (AZIT), macrolídeo; cefalotina (CFL), cefalosporina 1<sup>a</sup> geração; enrofloxacin (ENO); gentamicina (GEN), aminoglicosídeo; lincomicina (LN), lincosamida; penicilina (PEN), beta lactâmico; sulfametoxazole-trimethoprim (SUT), sulfonamida associada com trimethoprim e tetraciclina (TET) grupo tetraciclina.

### 7.2 Preparação das placas com antimicrobianos

Para a preparação das placas de Petri de 100 mm de diâmetro foi utilizado ágar Mueller Hinton - MH (Himedia Laboratories M043, Índia), previamente esterilizado em frascos individuais. Após esterilização o meio foi colocado em banho-maria a 45°C e após a estabilização de temperatura foram colocados os antimicrobianos nas

concentrações desejadas. Volumes apropriados de soluções estoque de cada um deles nas concentrações iniciais de 10.000 mg/L, 1.000 mg/L e 100 mg/L foram diluídos para se obter concentrações das soluções de trabalho variando de 0,015 a 256 µg/mL. Foram feitas duas placas com cada concentração antibiótica, as quais foram confeccionadas 18 horas antes da realização dos ensaios (Salvarani et al., 2008) e mantidas em geladeira a 4°C. Foram testadas as bases farmacológicas descritas no item 8.1 e para controle dos testes foram utilizadas bactérias controle *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Methods, 2005; Dias 2010).

### 7.3 Preparação do inóculo e execução do teste de CIM

As colônias que apresentaram resultados intermediários ou resistentes aos antimicrobianos foram plaqueadas novamente em ágar Baird Parker (Himedia Laboratories, M043, Índia) e mantidas em estufa a 37°C por 18-24 horas. Asepticamente, em fluxo laminar, retirou-se de cada isolado três a cinco colônias de *Staphylococcus* spp. e estas foram homogeneizadas em 2 mL de PBS estéril até atingir turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, contendo aproximadamente 1 a 2 x 10<sup>8</sup> ufc/mL (Methods, 2005). Cada suspensão de cultura foi transferida para os poços do replicador de Steer (Fig. 3).

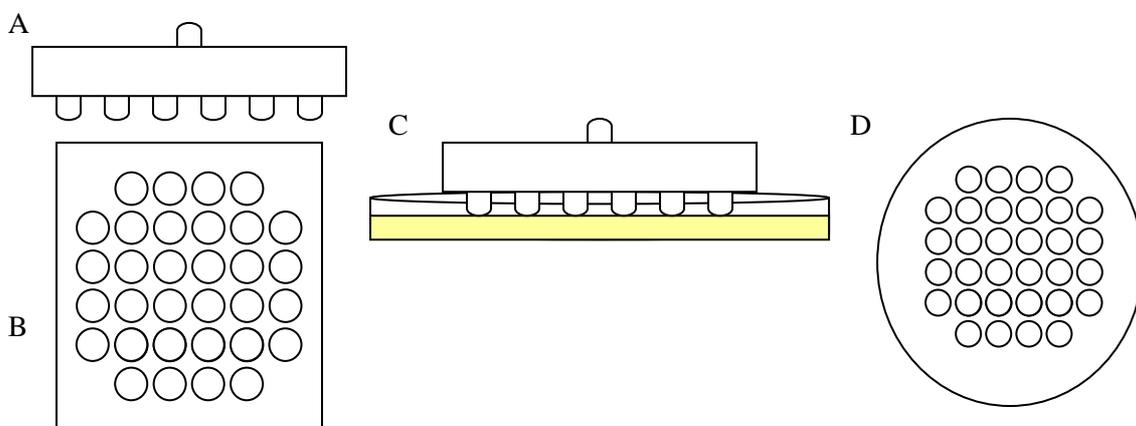


Figura 3– Replicador de Steer - Parte superior (A) e inferior (B) do replicador. (C) ilustração do esquema de aplicação nas placas de ágar Mueller Hinton - MH, (D) vista superior da placa com os inóculos. Adaptado de Carvalho, 2005.

As placas de ágar Mueller Hinton foram inoculadas encostando-se o replicador de Steer na superfície da mesma com 1 µl da suspensão bacteriana experimental, não ultrapassando 20 minutos entre o preparo do inóculo e incubação. Nas mesmas placas também foram inoculadas as estirpes de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922 (Pottumarthy et al., 2004 e Methods, 2005). As placas foram incubadas invertidas por 24 horas a 37°C em atmosfera de aerobiose em estufa bacteriológica, segundo metodologia previamente descrita (Methodology, 2003; Methods, 2005).

A leitura do teste foi iniciada pelas placas sem os antimicrobianos (controles negativos

ou brancos), e em seguida pelas estirpes de referência da ATCC (controles positivos), comparando-se as CIMs obtidas nas amostras controles com as preconizadas pelo Performance (2010) seguindo as normas interpretativas para o teste de CIM (tab.5). A CIM dos isolados de *S. aureus* e de *Staphylococcus* spp. foi definida como a menor concentração em que não foi observado nenhum crescimento bacteriano visível a olho nú. Em adição, foram determinadas as menores concentrações em µg/mL capazes de inibirem 50% e 90% dos isolados, denominados CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> respectivamente. Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

Tabela 5 – Normas interpretativas do teste de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) para *S. aureus* e *Staphylococcus* spp., de acordo com Performance, (2010).

Agente antimicrobiano	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) Norma interpretativa		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Amoxicilina*	$\leq 0,25$	-	$\geq 0,5$
Azitromicina	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Cefalotina	$\leq 8$	16	$\geq 32$
Enrofloxacina	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Gentamicina	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Lincomicina**	$\leq 0,5$	1-2	$\geq 4$
Penicilina	$\leq 0,12$	-	$\geq 0,25$
Sulfametoxazole-trimethoprim	$\leq 2$	-	$\geq 4$
Tetraciclina	$\leq 4$	8	$\geq 16$

Adaptado de Performance, 2010.

\*Amoxicilina (Beta-lactâmico grupo das penicilinas) que inclui penicilina, oxacilina, ampicilina, amoxicilina. Foi utilizado o padrão de leitura para ampicilina.

\*\* Lincomicina (grupo das lincosamidas). Foi utilizado o padrão de leitura para clindamicina.

## 8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e análise de Fisher foram utilizados para detectar diferenças no percentual de suscetibilidade de *S. aureus* e *Staphylococcus* spp. em relação aos antibióticos testados. Foi utilizado o programa Graph Pad, versão 3.06,32 de 2003. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos (Sampaio, 1998). As frequências dos genes para enterotoxinas e a distribuição de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente foram abordadas por descrição dos dados.

## 9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 9.1 Isolamento de micro-organismos

Das 251 amostras de leite coletadas, e plaqueadas em ágar BP, foram obtidas 323 colônias típicas e/ou atípicas de cor negra, brilhante, com ou sem halo de lecitinase. Estas foram separadas em grupos de isolados de acordo com os resultados das provas bioquímicas e de coagulase em tubo. Foram obtidos 278 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase positivas

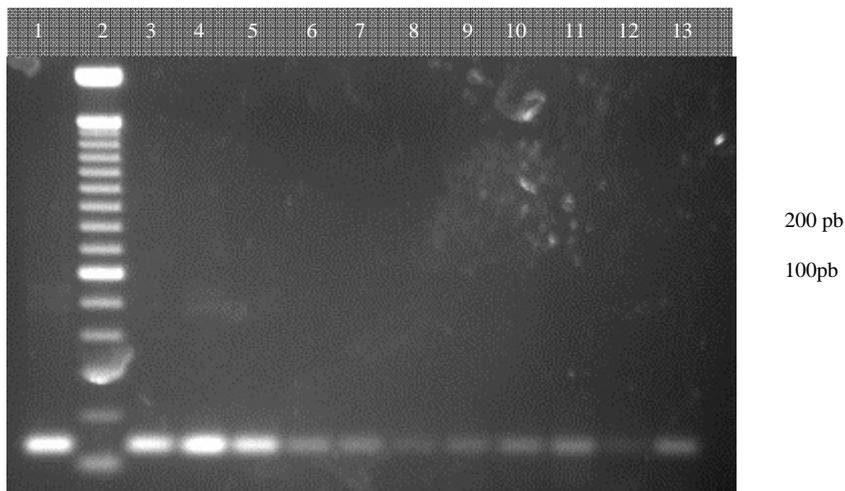
(SCP) e 45 isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase negativas (SCN).

Características fenotípicas têm sido empregadas para discriminar amostras de *Staphylococcus* spp e dependem da expressão de fatores biológicos da célula tais como, a produção de enzimas, utilização de nutrientes, produtos finais do metabolismo, dentre outros. Destas abordagens fisiológicas, poucas são úteis para a real caracterização de amostras bacterianas já dependem das condições do meio, o que torna o uso desta técnica limitado (Silva, 2004). Os métodos comumente utilizados para diagnóstico etiológico dos casos de mastite baseiam-se na cultura bacteriológica, através do isolamento e identificação das bactérias por técnicas bioquímicas, sendo limitados pela baixa sensibilidade e crescimento lento ou inviável do micro-organismo. Por este motivo, testes moleculares utilizados para detecção de micro-organismos em amostras de leite são recomendados (Dias, 2010).

## 9.2 Sensibilidade da técnica de PCR para o gene *femA*

O limite de detecção apresentado, observando-se a formação de uma banda de

132 pb, foi até a diluição de  $10^{-10}$ , sendo que esta diluição apresentou 12,5ng de DNA do *S. aureus* ATCC 25923, mostrando a alta sensibilidade do método (fig.4).



Canaleta 1- controle positivo; Canaleta 2 – padrão 100pb ; Canaleta 3 - *S. aureus* ATCC 25923 diluição  $10^0$ ; Canaleta 4 - *S. aureus* ATCC 25923 diluição  $10^{-1}$ ; Canaleta 5 - *S. aureus* ATCC 25923 diluição  $10^{-2}$ ; Canaleta 6 - *S. aureus* ATCC 25923 diluição  $10^{-3}$ ; Canaleta 7 - *S. aureus* ATCC 25923 diluição  $10^{-4}$ ; Canaleta 8 - *S. aureus* ATCC 25923 diluição  $10^{-5}$ ; Canaleta 9 - *S. aureus* ATCC 25923 diluição  $10^{-6}$ ; Canaleta 10 - *S. aureus* ATCC 25923 diluição  $10^{-7}$ ; Canaleta 11 - *S. aureus* ATCC 25923 diluição  $10^{-8}$ ; Canaleta 12 - *S. aureus* ATCC 25923 diluição  $10^{-9}$ ; Canaleta 13 - *S. aureus* ATCC 25923 diluição  $10^{-10}$ .

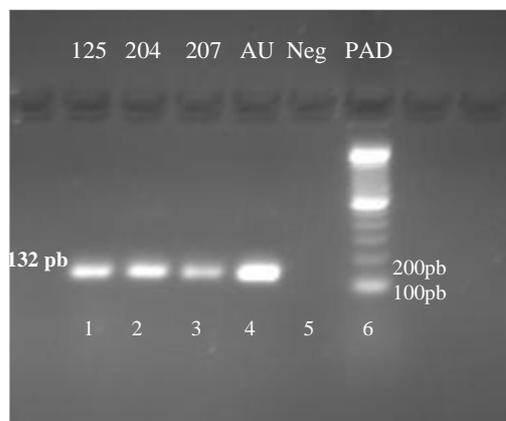
Figura 4– Produtos de PCR obtidos com DNA extraído a partir de diluições seriadas de *S. aureus* ATCC 25923 utilizando iniciador *femA* (132pb)

## 9.3 – Detecção do gene *femA*

### 9.3.1 Gene *femA* em colônias de *S. aureus* isoladas a partir do leite

Dos 323 isolados, 278 foram classificados fenotipicamente como *Staphylococcus* spp. coagulase positivas (SCP) e 45 *Staphylococcus* spp. coagulase negativas (SCN), sendo que somente os primeiros apresentaram, após PCR, um produto

amplificado de 132 pb correspondente ao gene *femA* (fig.5), sendo, portanto, identificados genotipicamente como *S. aureus*. Utilizando o mesmo teste genotípico, os isolados SCN não apresentaram o produto de 132 pb após PCR e foram considerados *Staphylococcus* spp. O resumo dos resultados da presença do gene *femA* também está apresentado na tabela 6, incluindo a origem das amostras avaliadas.



Canaletas 1 a 3 – isolados positivos para o gene *femA*; Canaleta 4-controle positivo *S. aureus*, Canaleta 5-controle negativo *S. epidermidis*; Canaleta 6 PAD-padrão de tamanho molecular 100 pb;

Figura 5– Reação em cadeia pela polimerase –PCR para detecção do gene *femA* (132pb) em isolados de *Staphylococcus* spp. das amostras de leite cru

Tabela 6- Presença do gene *femA* em isolados de *Staphylococcus* spp. das amostras de leite cru e sua distribuição pelas mesorregiões do Estado de Minas Gerais, 2010.

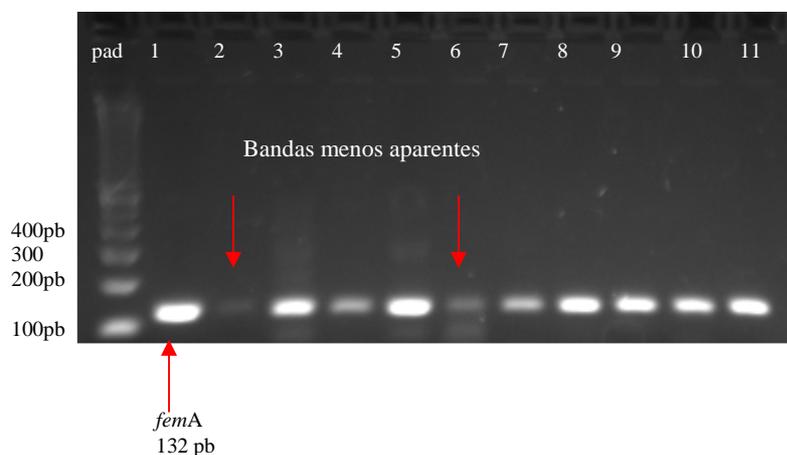
Mesorregiões de Minas Gerais	Número de amostras de leite obtidas de cada microrregião	Número de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. obtido das amostras	Presença do gene <i>femA</i> entre os isolados de <i>Staphylococcus</i> spp.	
			<i>femA</i> Positivo	<i>femA</i> Negativo
Abaeté (Central mineira)	30	31	30 (96,77%)	1 (3,22%)
Bonfim e Sete lagoas (Metropolitana de Belo Horizonte)	113	101	97 (96,03%)	4 (3,96%)
Guanhães e Resplendor (Vale do Rio Doce)	71	75	72 (96,00%)	3 (4,00%)
Paracatu (Noroeste de Minas)	32	109	73 (66,97%)	36 (33,02%)
Poté (Vale do Mucuri)	5	7	6 (85,71%)	1 (14,28%)
Total	251	323	278 (86,06%)	45 (13,93%)

### 9.3.2 Detecção do gene *femA* diretamente de amostras de leite

Foram avaliadas, por PCR, todas as amostras de leite, para a pesquisa direta de *S. aureus* com a utilização do gene *femA* (132pb). Foi extraído o DNA total, diretamente de um mL de leite cru, pelo mesmo método de extração alcalina. Após fazer os testes nas colônias isoladas, foi necessário fazer uma padronização do PCR realizado diretamente das amostras do leite para saber a correspondência dos resultados. Para estes testes, o protocolo de PCR precisou ser mudado porque não foi obtido sucesso na reação anterior com 20µL. Foi otimizada uma reação com 50µL. Assim como o volume da reação mudou, os componentes do mix de PCR e o tempo de corrida também foram modificados. O volume e concentração dos componentes da reação foram 2,5µL de tampão especial 10x (100 mM Tris-HCL [pH 8,3], 500 mM KCL, IB Phoneutria®) na concentração de 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5mM de cada par de primers;

0,2 mM de dNTP; 2,0 U de Taq polimerase; 30 a 100ng do DNA extraído. O volume final da reação foi ajustado para 50µL. As amostras foram colocadas em um termociclador MiniCycler™ (MJ Research) e foram incubadas inicialmente a 94°C por 5 minutos, seguidos por 39 ciclos de 94°C por 1 minuto, 59°C 1 minuto, 72°C por 2 minutos e uma incubação final de 72°C por 10 minutos. Após o processo ser finalizado, a temperatura de retirada das amostras foi de 4°C para preservação do DNA. Os produtos amplificados foram encaminhados para eletroforese em gel de ágarose a 2%, e uma corrida em 100 volts por 90 minutos.

Das 251 amostras de leite analisadas, a presença do produto amplificado de 132 pb foi observada em 210 amostras (83,66%). Nas outras 41 amostras (16,33%) de leite não apresentaram este produto. O único inconveniente encontrado foi que alguns dos produtos amplificados não apresentaram bandas tão aparentes, em comparação aos testes feitos em colônias isoladas (fig.6).



Canaleta 1 controle positivo *S. aureus*, canaletas 2 a 11 - amostras de leite positivas para o gene *femA*. Foi utilizado um padrão molecular 100 pb;

Figura 6– Reação em cadeia pela polimerase –PCR - para detecção do gene *femA* (132pb) diretamente das amostras de leite cru.

Trabalhos realizados por outros pesquisadores utilizaram a presença do *femA* como marcador molecular para a identificação da presença de *S. aureus* em diferentes espécimes clínicos (Kobayashi et al., 1994; Mehrotra et al., 2000; Costa, 2008). A detecção do *femA* pela técnica da PCR, diretamente em amostras de leite foi realizada por Dias (2010) e Dias et al. (2011), com resultados de 72,5% da presença deste gene. Da mesma forma, Costa (2008) constatou a amplificação do gene *femA* em 97,7% dos isolados oriundos de casos de mastite clínica e subclínica em amostras isoladas obtidas de rebanhos do Sul de Minas Gerais.

Mesmo sem significância estatística, o percentual um pouco menor da presença do gene *femA* da extração feita diretamente das amostras de leite (83,66%) em relação aos isolados de *S. aureus* (86,06%) pode ser atribuída à possível presença de inibidores de PCR presentes no leite (Silva e Silva, 2005; Silva, 2008) o que não inviabiliza este teste genotípico para a pesquisa de *S. aureus* em isolados de campo. Segundo estudos realizados por (Costa, 2008; Dias et al., 2011) o gene *femA*, pode ser usado como marcador epidemiológico para detecção e identificação de *S. aureus*, a partir de amostras de leite, mostrando-se útil em estudos populacionais sobre a dinâmica das infecções intramamárias.

Vale salientar que, apesar de se ter encontrado uma boa correlação entre a presença do gene *femA* e *S. aureus*, no presente trabalho não foi possível realizar a identificação do gene *femA* juntamente com as toxinas estafilocócicas por meio de PCR multiplex e mesmo ajustando o volume de reação para 50µL, não foi possível otimizar a temperatura de anelamento. O gene *femA*, para as amostras de leite, foi melhor visualizado com ciclos de 59°C. Por outro lado, a pesquisa dos genes para enterotoxinas foi padronizada com ciclos de 52°C. Esta diferença entre as temperaturas de anelamento impossibilitou o teste

conjunto, para amplificar por PCR multiplex, os genes *femA* e das enterotoxinas.

Andrade (2009) analisou 300 amostras de queijo coalho e obteve 207 isolados de *staphylococcus* spp. para identificação genotípica através da pesquisa do gene *femA*. A presença deste gene foi detectada em 95% dos isolados de queijo artesanal e industrial. Segundo a autora, a alta frequência encontrada pode ser atribuída à contaminação do leite cru, provável recontaminação pós-pasteurização, condição inadequada de armazenamento e ao manipulador, o qual tem sido considerado uma importante fonte de disseminação desta bactéria em alimentos.

Ângelo (2010) analisou 265 estirpes de *Staphylococcus* spp., isolados de leite cru e de vacas com mastite, conseguiu identificar 125 amostras (74,40%) como *S. aureus* onde as estirpes, previamente congeladas, precisaram ser reativadas em passagens sucessivas em meios de cultivo por 36 horas. Primeiro foram reativadas em caldo BHI, por 24 horas. Depois estas estirpes foram plaqueadas em ágar BHI e reincubadas por mais 24 horas. Somente depois destas etapas é que as mesmas foram plaqueadas em ágar BP e incubadas pelo mesmo tempo para identificação de colônias típicas e atípicas. O presente estudo propôs um diferencial quanto à forma de cultivo adotando-se o plaqueamento direto de uma alíquota da amostra de leite na placa de ágar BP. Com esta metodologia, foi possível obter colônias isoladas típicas e atípicas com 24 horas de incubação das placas.

#### 9.4 – Detecção do gene *mecA*

##### 9.4.1 Detecção do gene *mecA* em colônias de *S. aureus* isoladas a partir do leite

Dos 278 isolados identificados genotipicamente como *S. aureus*, foi observado por PCR, um produto amplificado de 533 pb em 12 (4,31%) destes isolados (tab.7).

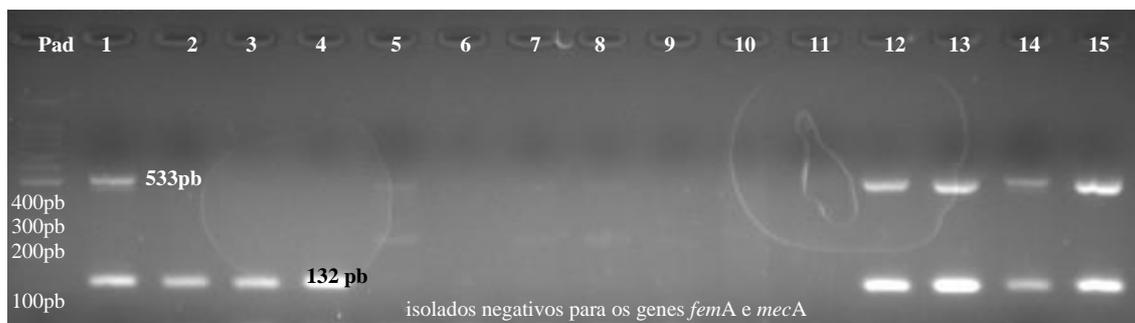
Tabela 7– Presença do gene *mecA* em *S. aureus* isolados de amostras de leite cru refrigerado de bovinos provenientes de cinco mesorregiões do Estado de Minas Gerais, 2010.

Mesorregiões de Minas Gerais	Número de amostras de leite obtidas de cada microrregião	Número de isolados de <i>S. aureus</i> obtido das amostras	Presença do gene <i>mecA</i> entre os isolados de <i>S. aureus</i>	
			<i>mecA</i> Positivo	<i>mecA</i> Negativo
Abaeté (Central mineira)	30	30	7 (23,33%)	23 (76,66%)
Bonfim e Sete lagoas (Metropolitana de Belo Horizonte)	113	63	1 (1,58%)	62 (98,41%)
Guanhães e Resplendor (Vale do Rio Doce)	71	69	1 (1,44%);	68 (98,55%)
Paracatu (Noroeste de Minas)	32	109	3 (2,75%)	106 (97,24%)
Poté (Vale do Mucuri)	5	7	0	7 (100%)
<b>Total</b>	<b>251</b>	<b>278</b>	<b>12 (4,31%)</b>	<b>266 (95,68%)</b>

9.4.2 PCR bplex para detecção dos genes *femA+mecA* das colônias isoladas a partir das amostras de leite

pesquisar os genes *femA+mecA*, simultaneamente, nas colônias de *S. aureus* isoladas das amostras de leite, otimizando o tempo de obtenção de resultados.

Após a fase de PCR convencional, foi padronizada uma PCR bplex (fig.7) para



Canaleta 1: controle *femA+mecA*; Canaletas 2, 3 e 4: isolados positivos para *femA*; Canaletas 5 a 11: isolados negativos para *femA+mecA*; Canaletas 12 a 15: isolados positivos para *femA+mecA*. Foi utilizado padrão de tamanho molecular de 100 pb; Gel fotografado com a utilização do programa LPix Image através do aparelho L.Pix Molecular Imaging Loccus Biotechnology®.

Figura 7. Reação bplexPCR - para detecção dos genes *femA* (132pb) e *mecA* (533pb) em colônias de *S. aureus* isoladas de amostras de leite bovino

Por PCR convencional, dos 278 isolados de *S. aureus* analisados, 12 (4,31%) apresentaram o gene *mecA* sendo considerados portanto, MRSA. Da mesma forma nos testes realizados com PCR biplex foi observada a mesma frequência de isolados com este gene. A amplificação do gene *mecA* como marcador molecular, por meio da PCR, foi utilizada por diversos pesquisadores, mostrando sua especificidade para detecção de MRSA em diferentes espécimes clínicos (Mehrotra et al., 2000; Al-Talib et al., 2009; Sturenburg, 2009; Tran et al., 2012). Outros trabalhos realizados em Minas Gerais detectaram a presença de MRSA em extração de DNA feita diretamente do leite de tanque de expansão percentuais (3,3% e 11%), respectivamente (Silva, 2008; Dias et al., 2011). Variações quanto à frequência de achados de MRSA podem ocorrer entre as mesorregiões devido às diferenças entre o número de amostras avaliadas, bem como o aspecto temporal e geográfico. Resistência a meticilina por isolados de *S. aureus* pela síntese de proteínas de ligação a penicilina (PBPs) adicionais, conhecidas como PBP2a, foi abordada por vários pesquisadores (Cardoso et al., 2000a; Livermore, 2000; Stapleton e Taylor, 2002; Silva, 2008; Sader et al., 2008; Ishihara et al., 2010). Estas fazem com que o micro-organismo consiga manter a estrutura do peptidoglicano íntegra quando exposta aos antimicrobianos beta-lactâmicos. A bactéria disponibiliza unidades peptídicas parecidas com as PBPs, que serão liberadas no meio, para serem alvo dos antimicrobianos (Stapleton et al., 2007) diminuindo assim, a sua ação direta na célula bacteriana.

Mesmo que no presente trabalho não tenha feito nenhum tipo de avaliação quanto a presença destas estruturas, se pode deduzir que os isolados obtidos das amostras de leite podem ter utilizado esta estratégia de defesa, pois os isolados de *S. aureus*, nos testes de difusão em ágar, apresentaram resistência à

penicilina (89,56%) corroborando com o trabalho de Arias (2012).

È frequente a detecção de MRSA em isolados humanos como causadores de infecções comunitárias e hospitalares (Sousa e Lencastre, 2003; Al-Talib et al., 2009; Sturenburg, 2009), entretanto, o aparecimento destes micro-organismos em amostras de leite, em diversas regiões do mundo, tem despertado um grande interesse (Berger-Bachi, 1992; Lee, 2003).

O presente trabalho, ao encontrar um percentual de amostras (4,31%), positivas para resistência à meticilina, pode contribuir para evidenciar a disseminação desse tipo de patógeno entre os rebanhos produtores de leite das mesorregiões estudadas. Estes dados sugerem que as infecções mamárias por MRSA em bovinos leiteiros podem se constituir em sério problema no campo, como afirmaram Lee et al. (2004) e Silva (2008).

Vários autores encontraram a presença do gene *mecA* nos isolados de *S. aureus* variando entre 4 e 6% (Vyletelová et al., 2011), corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

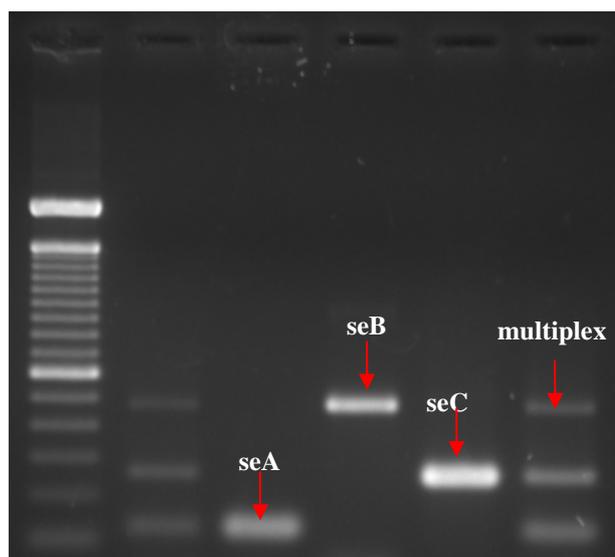
A presença do gene *mecA* foi relatada entre 14 e 11% por Dias (2011) e Zutic et al., (2012). Tais resultados podem ser explicados pela forma de coleta amostral uma vez que estes autores coletaram amostras diretamente dos quartos mamários afetados, o que pode ter aumentado a chance de isolamento dos micro-organismos causadores da infecção que possuíam genes de resistência a antimicrobianos. Entretanto, os resultados descritos por Dias et al. (2011) se referem aos isolados obtidos somente da região de Sete Lagoas/MG, enquanto no presente foram avaliados isolados de cinco microregiões do Estado de Minas Gerais. Em uma análise comparativa somente com os isolados da região metropolitana, aos quais Sete Lagoas pertencem, o presente

trabalho registrou apenas um isolado (1,58%) que apresentou este gene. A idéia de comparar amostras procedentes de uma mesma microrregião torna-se mais representativa e pode evidenciar a disseminação de micro-organismos entre rebanhos produtores de leite, o que não pode ser feita neste caso, pois ao se comparar somente a cidade de origem das amostras percebe-se que o trabalho de Dias et al. (2011) pode sugerir que as infecções mamárias nos bovinos leiteiros estudados podem ser causados por MRSA, ao contrário do presente estudo que não pode assumir este raciocínio, visto que o número de isolados que apresentaram o gene *mecA*, para esta microrregião, foi pouco representativo.

Soares et al. (2012), no intuito de auxiliar na montagem de um perfil epidemiológico dos agentes causadores de mastite bovina, encontraram a presença do gene *mecA* em isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa-SCN.

#### 9.5 PCR Multiplex para detecção dos genes das enterotoxinas estafilocócicas

Após a etapa de PCR convencional para pesquisar os genes das enterotoxinas, foi otimizada uma reação de PCR multiplex onde foram observados simultaneamente os produtos amplificados dos genes *seA* (120pb); *seB* (478pb) e *seC* (257pb) (fig.8) utilizando as culturas de *S. aureus* padrão ATCC portadores destes genes.



Canaleta 1 -padrão de peso molecular 100 pb; Canaleta 3-seA com 120pb; Canaleta 4- seB com 478 pb; Canaleta 5- seC com 257pb; Canaletas 2 e 6-PCR multiplex seA+seB+seC;

Figura 8. PCR convencional e multiplex para detecção dos genes *seA* com 120 pb, *seB* com 478 pb e *seC* com 257 pb, de *S. aureus* produtores de enterotoxinas estafilocócicas.

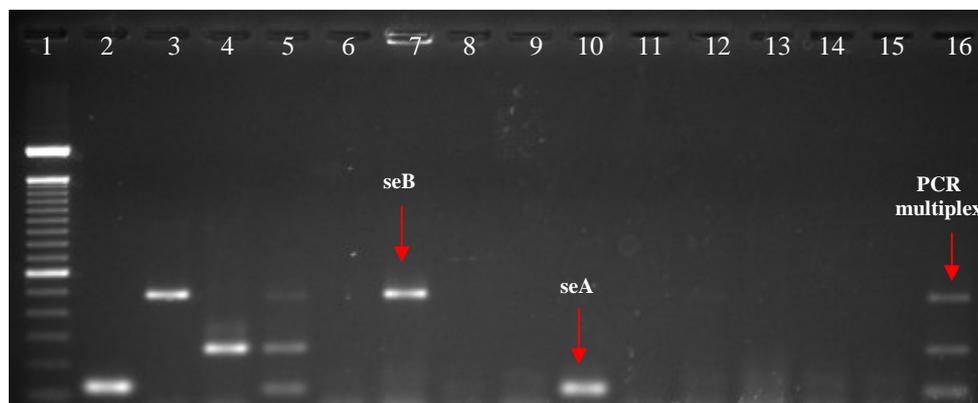
A partir deste ponto, foram iniciados os testes de PCR multiplex nos isolados experimentais de *S. aureus* obtidos das amostras de leite. Tanto nos resultados da PCR convencional quanto da PCR multiplex

foram observados que, dos 278 isolados de *S. aureus* testados, os genes *seA* e *seB* foram visualizados em 3 isolados (1,07%) cada e não foram encontrados isolados contendo genes para *seC* (tab.7).

Tabela 8. Presença dos genes seA, seB e seC em *S. aureus* isolados de amostras de leite cru refrigerado de bovinos provenientes de cinco mesorregiões do Estado de Minas Gerais, 2010.

Mesorregiões de Minas Gerais	Número de isolados de <i>S. aureus</i> obtidos das amostras de leite	Número de isolados de <i>S. aureus</i> que apresentaram os genes para enterotoxinas estafilocócicas		
		seA 12pb	seB 478pb	seC 257pb
Abaeté (Central mineira)	30	1 (3,33%)		0
Bonfim e Sete lagoas (Metropolitana de Belo Horizonte)	63	2 (3,17%)		0
Guanhães e Resplendor (Vale do Rio Doce)	69			0
Paracatu (Noroeste de Minas)	109		3 (2,75%)	0
Poté (Vale do Mucuri)	7			0
Total	278 (100%)	3 (1,07%)	3 (1,07%)	0

Através do gel de eletroforese (fig.9) foi possível visualizar os produtos amplificados pelos isolados estudados e confrontá-los com as bandas apresentadas no PCR multiplex.



Canaleta 1-padrão de peso molecular 100 pb; canaleta 2, 3 e 4-PCR convencional *S. aureus* ATCC; canaletas 5 e 16- PCR multiplex seA+seB+seC; canaleta 6- controle negativo *S. epidermidis* (ATCC 12228); canaleta 7 – isolado com gene seB; canaleta 10- isolado com gene seA. canaletas 8, 9, 11-15- isolados negativos para os genes das enterotoxinas.

Figura 9. PCR multiplex para detecção dos genes seA (120 pb), seB (478 pb) e seC (257 pb), nos isolados de *S. aureus* estudados em leite cru refrigerado.

A presença dos genes para as enterotoxinas estafilocócicas, por PCR convencional, observadas por outros autores variou de 3 a 90% para seA; de 1,1% a 37% para seB; e de 3,1 a 13% para seC (Cardoso et al., 1999b; Silva, 2004; Fueyo et al., 2005; Ikeda et al., 2005; Ferreira et al., 2008; Dias, 2010; Santana, 2010). Estas variações entre os resultados podem ser resultantes dos tipos de materiais avaliados. Neste trabalho, por exemplo, foi realizado com leite cru, proveniente de tanques de expansão. Tal fato pode, perfeitamente, justificar os resultados obtidos, devido possibilidade de diluição das amostras, que pode influenciar negativamente no número de isolados obtidos que possam apresentar os genes pesquisados.

Além do PCR convencional, vários autores realizaram PCR multiplex para enterotoxinas estafilocócicas encontrando os genes seA em percentuais de 4,5% a 44,44%, seB de 2,3% a 22,22% e seC de 22% a 30,76% em isolados de *S. aureus* (Sharma et al., 2000; Lovset et al., 2004; Zocche, 2008; Hwang et al., 2010).

O presente estudo, pesquisou a presença dos genes SeA, SeB e SEC nos isolados experimentais tanto por PCR convencional quanto por PCR multiplex e ambos os testes mostraram concordância de resultados.

Mesmo que os trabalhos de Dias (2010) e Santana (2010) sugeriram que a enterotoxina C está associada à produção leiteira bovina, no presente estudo não foram encontrados isolados que apresentaram os genes seC o que, por outro lado, corrobora com os trabalhos de Ikeda et al. (2005), Zocche (2008) e Hwang et al. (2010), que também não observaram a presença de seC em amostras de leite. Estes achados podem sugerir que os isolados de *S. aureus* avaliados não possuíam perfil enterotoxigênico para a enterotoxina C.

PCR é um teste que indica um provável perfil enterotoxigênico dos isolados e a presença de genes não indica, necessariamente, a capacidade do microorganismo de produzir toxina biologicamente ativa suficiente para induzir manifestações clínicas. No entanto, o simples fato de uma estirpe, conter um ou mais genes enterotoxigênicos é significativo, por oferecer risco à saúde pública caso encontre condições favoráveis à expressão de suas características. Isto foi comprovado em alguns trabalhos onde os isolados de *S. aureus* produziram enterotoxina A variando de 3 a 52%, de enterotoxina B de 19 a 52% e de enterotoxina C de 6 a 38,9%.

O presente estudo não avaliou a produção de enterotoxinas e por isso não pode comparar os métodos utilizados entre os trabalhos, no entanto, deve-se entender que a produção de pelo menos um tipo de enterotoxina, isoladamente ou em associação pode evidenciar características de toxigenicidade dos isolados (Cardoso et al., 1999b; Tollersrud et al., 2006; Nader et al., 2007; Ferreira et al., 2008; Santana, 2010; Dias, 2010).

O leite e produtos lácteos, também têm sido associados com frequência a surtos e casos esporádicos de intoxicação estafilocócica. É freqüente observamos em locais onde existe a prática de consumo de leite cru, que este fica exposto a temperatura ambiente por um grande período de tempo, até ser entregue ao consumidor. Sabe-se que durante pequenos intervalos de tempo ocorre multiplicação bastante elevada de microrganismos. Outro agravante é a forma em que são transportados e acondicionados. Os veículos utilizados, na grande maioria das vezes, não possuem recipientes refrigerados e o leite é envasado em recipientes impróprios, como garrafas plásticas tipo pet reaproveitadas. A Organização Mundial da Saúde (OMS), comprovou a existência de sete doenças viróticas básicas e 16 doenças bacterianas veiculadas pelo leite, destacando-se:

ricketisioses (febre Q), infecções e intoxicações bacterianas (tuberculose, brucelose, listeriose, clostridioses), intoxicações alimentares (principalmente devido à toxina do *Staphylococcus aureus*), febres tifóide e paratifóide, salmonelose e intoxicações estreptocócicas (Abrahão, 2005).

Segundo Borges (2008) para a formação de enterotoxinas em quantidade suficiente para provocar intoxicação são necessárias  $10^6$  células de *S. aureus* por grama de alimento. Carmo et al. (2002) relataram a ocorrência de dois surtos de intoxicação estafilocócica causados pelo consumo de queijo Minas e leite, ocorridos em Manhuaçu e Passa Quatro (MG). No primeiro surto, o consumo de queijo Minas foi incriminado e envolveu 50 pessoas. As amostras de queijo e de leite cru inicial apresentaram contagens de *S. aureus* de  $2,4 \times 10^3$  a  $2,0 \times 10^8$  UFC/g e presença de enterotoxinas seA, seB e seC. No segundo surto, o consumo de leite cru proveniente de animais com mastite (contagem de estafilococos coagulase negativa superior a  $2,0 \times 10^8$  UFC/mL e presença de enterotoxinas seC e seD) causou a intoxicação de 328 pessoas.

Quanto à termoresistência das enterotoxinas estafilocócicas, o trabalho de Borges et al., 2008 realizou a pesquisa de enterotoxinas em 20 amostras, sendo cada uma composta por cinco unidades amostrais dos produtos:

leite cru, leite pasteurizado, coalhada e de queijo. O leite cru apresentou elevada população de *Staphylococcus* sp. e de *Staphylococcus* coagulase positiva em 100% (25/25) das amostras. As contagens oscilaram entre  $3,3 \times 10^4$  a  $1,5 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, para *Staphylococcus* sp. e de  $8,0 \times 10^3$  a  $5,0 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> para *Staphylococcus* coagulase-positiva. Este nível de contaminação, principalmente, por *Staphylococcus* coagulase positiva é considerado alto (superior a  $1,0 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>) e pode favorecer a produção de enterotoxinas estafilocócicas sob condições ambientais adequadas. A presença de enterotoxina foi constatada em 20% (4/20) das amostras analisadas sendo que todas isto ocorreu pós-processamento térmico, no qual enterotoxinas foram detectadas no leite cru e, conseqüentemente, também detectadas no leite pasteurizado, na coalhada e no queijo obtido a partir desse leite.

#### **10. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO DE DISCO EM ÁGAR**

Foi avaliada a susceptibilidade aos antimicrobianos dos 278 isolados de *S. aureus* (86,06%) e 45 isolados de *Staphylococcus* spp. (13,93%), classificados de acordo com a genotipagem, totalizando 323 antibiogramas (testes de disco-difusão em ágar) (fig.10).

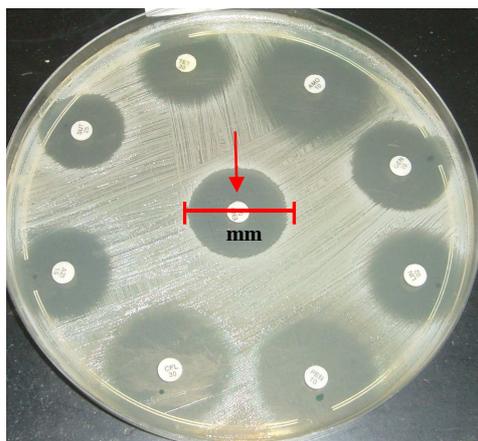
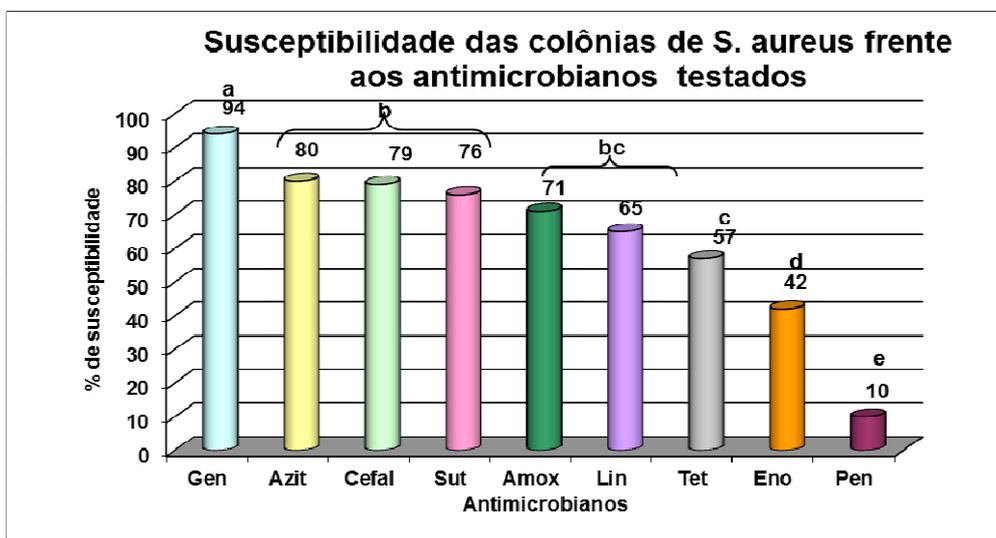


Figura 10–Isolado experimental de *S. aureus* e visualização de halos de inibição (por mensuração do diâmetro em milímetros) pelo método de disco-difusão em ágar

Nos isolados de *S. aureus* foram observados 263 amostras (94,0%) sensíveis à gentamicina 10 µg; 222 amostras (80,0%) sensíveis a azitromicina 15 µg; 220 amostras (79,0%) sensíveis a cefalotina 30 µg; 212 amostras (76,0%) sensíveis a sulfametoxazole-trimethoprim (SUT) 25 µg; 197 amostras (71,0%) sensíveis a

amoxicilina 10 µg; 181 amostras (65,0%) sensíveis a lincomicina 2 µg; 159 amostras (57,0%) sensíveis a tetraciclina 30 µg; 117 (42,0%) sensíveis a enrofloxacina 5 µg e 29 amostras (10,0%) sensíveis à penicilina G 10 UI. A distribuição de susceptibilidade das amostras é mostrada na fig.11.



a; b; c; d; e; com  $p < 0,0001$

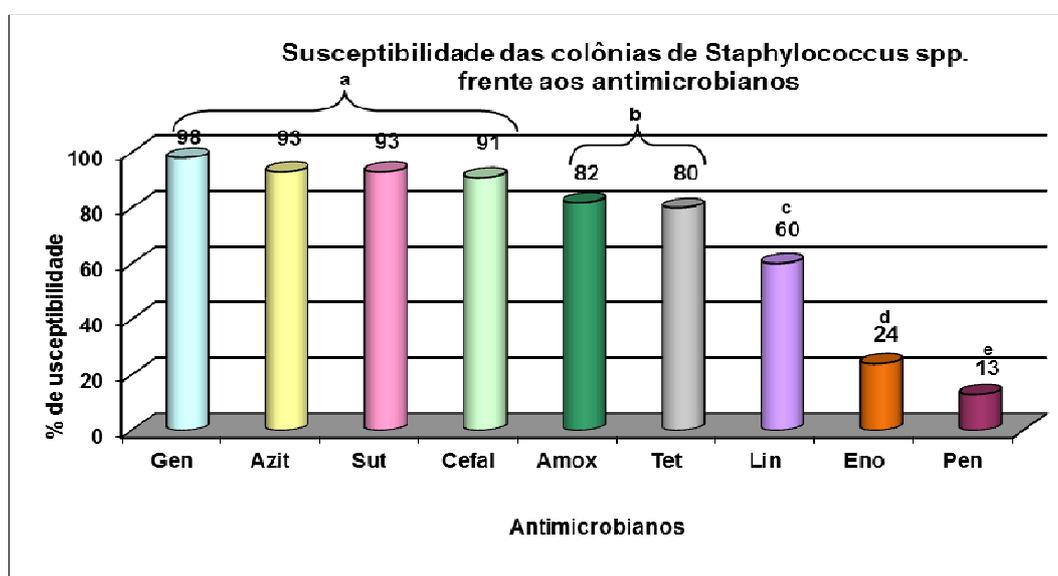
b;c com  $p$  entre 0,01 - 0,05

Figura 11–Perfil de susceptibilidade frente aos antimicrobianos testados das colônias de *S. aureus* isoladas a partir de leite cru de cinco mesorregiões do Estado de Minas Gerais, 2010.

Foi possível perceber que os antibióticos mais eficazes para os isolados de *S. aureus* foram gentamicina e azitromicina ao contrário de enrofloxacin e penicilina que não apresentaram efeito bactericida satisfatório.

Por outro lado, dos isolados de *Staphylococcus* spp. foi observado que 44 amostras (98,0%) sensíveis a gentamicina 10 µg; 42 amostras (93,33%) sensíveis a azitromicina 15 µg; 42 amostras (93,0%)

sensíveis a sulfametoxazole-trimetoprim (SUT) 25 µg; 41 amostras (91,0%) sensíveis a cefalotina 30 µg; 37 amostras (82,0%) sensíveis a amoxicilina 10 µg; 36 amostras (80,0%) sensíveis a tetraciclina 30 µg; 27 amostras (60,0%) sensíveis a lincomicina 2µg; 11 amostras (24,0%) sensível a enrofloxacin 5 µg; 6 amostras (13,0%) sensíveis a penicilina G 10 UI. A distribuição de susceptibilidade das amostras é mostrada na fig.12.



a; b; c; d; e; com  $p < 0,0001$

Figura 12–Perfil de susceptibilidade frente aos antimicrobianos testados das colônias de *Staphylococcus* spp. isoladas a partir de leite de cinco mesorregiões do estado de Minas Gerais, 2010.

Os antibióticos mais eficazes, agora para os isolados de *Staphylococcus* spp. foram gentamicina, azitromicina, SUT e cefalotina e os menos eficazes foram enrofloxacin e penicilina.

Neves et al. (2010) encontraram um perfil de sensibilidade a gentamicina de 92%, o que está bem próximo aos resultados do presente estudo, indicando que este antibiótico pode ser eficaz para o tratamento das mastites bovinas de origem bacteriana

(Freitas et al., 2005). Além do mais, a gentamicina pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos que apresenta amplo espectro de ação, entretanto não é empregada como droga de primeira escolha (Souza et al., 2005), o que pode retardar o aparecimento de linhagens resistentes que ocorre devido ao uso excessivo de antibióticos.

Quanto à penicilina, alguns autores encontraram isolados de *S. aureus* com

perfil de resistência variando de 16% a 96% (Freitas et al., 2005; Shittu e Lin 2006; Aires-de-Sousa, 2007; Ferreira, 2008; Neves et al., 2010; Kalmus, 2011; Haran et al., 2012). Os estafilococos isolados de leite de vacas com mastite quase sempre apresentam índices de resistência à penicilina, acima de 70% (Freitas et al., 2005). Muitos mecanismos estão envolvidos nesta resistência incluindo a produção de enzimas que inativam a droga, alteração dos alvos de ação da droga e alteração da permeabilidade da membrana externa gerando efluxo (Methodology, 2003).

As  $\beta$ -lactamases são enzimas que inativam e hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico e sua produção acontece devido a um “feed back” onde a presença de  $\beta$ -lactâmicos no meio extracelular é “captada” pela bactéria desencadeando eventos intracelulares que culminarão na formação das enzimas, classificadas segundo a estrutura (classe A à D) e características funcionais e bioquímicas (grupo I à IV), que podem ser de origem cromossômica ou plasmidial, permitindo que esses elementos sejam transferidos entre as bactérias. As Enzimas classificadas como classe A- grupo II, hidrolisam penicilinas e cefalosporinas; classe B- grupo III, carbapenêmicos; classe C- grupo I, cefalosporinas; classe D, penicilinas e cloxacilina; e grupo IV (penicilinases) sendo que a maioria das cepas de *S. aureus* produz penicilinases (Nakano et al., 2011).

Quanto à enrofloxacina, pode-se dizer que os agentes quimioterápicos derivados do ácido quinoloncarboxílico há muito vêm sendo utilizados no tratamento de diferentes patologias, quer seja para o uso humano ou animal (Marinho et al., 2002). A resistência aos antimicrobianos do grupo das quinolonas pode se apresentar pela mutação de genes que codificam os alvos do antimicrobiano; por aquisição de resistência através de plasmídeos e por alterações na permeabilidade da membrana celular (efluxo) expulsando a droga do meio interno

(Felli, 2007). Este último sistema, que tem o papel de remover toxinas do citoplasma, tem sido reportado em várias bactérias como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (Sanchez Ito, 2004).

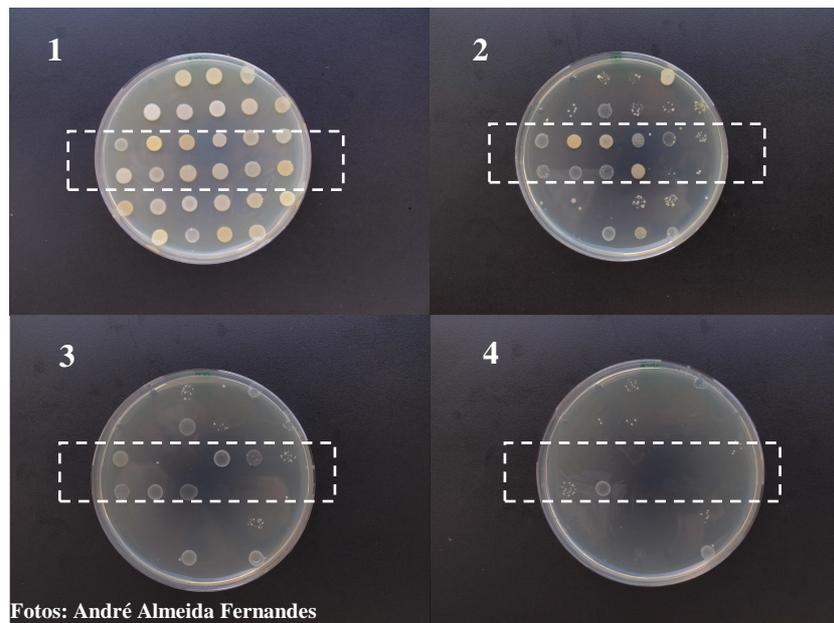
De forma geral, quando isolados de microorganismos apresentam perfil de resistência a algum antimicrobiano, isto pode ser em resposta a uma provável utilização indiscriminada de drogas antimicrobianas que exerceram a chamada pressão seletiva. Esta situação contribui para o aumento de fatores de resistência nas bactérias (Ferreira, 2008) e para a seleção de isolados resistentes envolvidos nos processos inflamatórios da glândula mamária de bovinos (Marinho et al., 2002; Kalmus, 2011). Tal fato favorece a cronificação da infecção, aumentando os custos, o tempo de tratamento, sem falar nas perdas econômicas relacionadas à produção leiteira (Shittu e Lin, 2006). *S. aureus* além de ser responsável por grandes prejuízos à pecuária leiteira, pode apresentar um aumento crescente no padrão de resistência (Brito et al., 2001) aos diversos antimicrobianos que são utilizados na prática médico-veterinária (Haran et al., 2012) e a análise *in vitro* de susceptibilidade antimicrobiana auxilia na aplicação de uma terapêutica adequada (Freitas, 2005).

Já os SCN, os resultados mostrados indicaram que estes isolados também apresentaram resistência elevada à enrofloxacina e à penicilina. Segundo Barbalho (2011), *Staphylococcus coagulase negativa* são encontrados com alta frequência em amostras de leite e representa grande importância epidemiológica e clínica nas mastites bovinas, fato que pode ser explicado pelo crescente número de trabalhos que estão incluindo os SCN na avaliação de susceptibilidade aos antimicrobianos em rebanhos leiteiros (Marinho et al., 2002; Kalmus et al., 2011; Oliveira et al., 2011).

## 11. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração em que

não foi observado nenhum crescimento bacteriano visível a olho nu (Methodology, 2003). Os isolados foram testados frente a todos os nove antimicrobianos e a leitura de CIM (fig.13) foi registrada para cada concentração.



Fotos: André Almeida Fernandes

Foto 1- Isolados apresentando crescimento visível a olho nu. Fotos 2 e 3- Alguns dos isolados começam a ter o crescimento inibido pelo antimicrobiano. Foto 4- Já é possível registrar o CIM de alguns isolados onde não é visualizado crescimento bacteriano.

Figura 13–Susceptibilidade dos isolados de *S. aureus* pelo teste CIM frente a um dos antimicrobianos testados

Para analisar o perfil de susceptibilidade das amostras, pelo método CIM, os dados foram confrontados com os parâmetros do Performance (2010) para fazer a caracterização das amostras como sensível (S) intermediário (I) ou resistente (R) frente

ao antimicrobiano testado. O percentual de susceptibilidades às diferentes concentrações de cada antimicrobiano é mostrado a seguir para as amostras de *S. aureus* (tab.8) e *Staphylococcus* spp. (tab.9) bem como os resultados de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>

Tabela 9– Concentração inibitória mínima-CIM das amostras de *S. aureus* e respostas de susceptibilidade às diferentes concentrações dos agentes antimicrobianos testados

Antimic. (n° amostras testadas)	Ponto de corte $\mu\text{g/mL}^1$	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ), Concentrações dos antimicrobianos testados e número de amostras encontradas em cada concentração													% Suscep	
		0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256			
Enro(161)	$\leq 4$	23	29	24	28 <sup>A</sup>	32	13 <sup>B</sup>	12								92,54 <sup>a</sup>
Sut (66)	$\leq 2$					55 <sup>A</sup>	5 <sup>B</sup>	1					3			83,33 <sup>b</sup>
Genta (15)	$\leq 4$	1	2	2	2	2 <sup>A</sup>	3		1	1 <sup>B</sup>	1					80,00 <sup>b</sup>
Azit (56)	$\leq 2$			7	18	16 <sup>A</sup>	2	2	6 <sup>B</sup>	5						73,21 <sup>b</sup>
Tetra (119)	$\leq 4$			39	36 <sup>A</sup>	6	5		3	3	3	18 <sup>B</sup>	6			72,26 <sup>b</sup>
Cefalo (58)	$\leq 8$	8	9	5	7 <sup>A</sup>	3	1	5	8	9 <sup>B</sup>	3					65,51 <sup>c</sup>
Amox (81)	$\leq 0,25$		30	17 <sup>A</sup>	13	8	8 <sup>B</sup>	4			1					37,03 <sup>d</sup>
Pen G (249)	$\leq 0,12$	46	22	38	32 <sup>A</sup>	27	16	5	18	18	10 <sup>B</sup>	11	6			18,47 <sup>e</sup>
Linco (97)	$\leq 0,5$		1	12	26	11 <sup>A</sup>	4	6	12	20 <sup>B</sup>	1		4			13,40 <sup>e</sup>

a; b; c; d; e; com  $p < 0,0001$

1 = Critério interpretativo de acordo com Performance (2010).

A = CIM<sub>50</sub> = Concentração que inibiu 50% das amostras testadas

B = CIM<sub>90</sub> = Concentração que inibiu 90% das amostras testadas

% Suscep= porcentagem de amostras sensíveis ao antimicrobiano

Tabela 10– Concentração inibitória mínima-CIM das amostras de *Staphylococcus* spp. e respostas de susceptibilidade às diferentes concentrações dos agentes antimicrobianos testados

Antimic. (n° amostras testadas)	Ponto de corte $\mu\text{g/mL}^1$	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ), Concentrações dos antimicrobianos testados e número de amostras encontradas em cada concentração													% Suscep	
		0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256		
Genta (1)	$\leq 4$						1 <sup>A,B</sup>									100,0 <sup>a</sup>
Sut (3)	$\leq 2$					1	2 <sup>A,B</sup>									100,0 <sup>a</sup>
Enrof (34)	$\leq 4$			1		3		19 <sup>A</sup>	10 <sup>B</sup>	1						67,64 <sup>b</sup>
Azit (3)	$\leq 2$				1		1 <sup>A</sup>			1 <sup>B</sup>						66,60 <sup>b</sup>
Tetra (9)	$\leq 4$				1	4 <sup>A</sup>	1					1			2 <sup>B</sup>	66,60 <sup>b</sup>
Amox (8)	$\leq 0,25$			5 <sup>A</sup>	1	1 <sup>B</sup>		1								62,50 <sup>b</sup>
Cefalo (4)	$\leq 8$						1	1 <sup>A</sup>		2 <sup>B</sup>						50,00 <sup>c</sup>
Linco (18)	$\leq 0,5$				2	4	2	2 <sup>A</sup>	3	2	3 <sup>B</sup>					11,11 <sup>d</sup>
Pen G (39)	$\leq 0,12$		1	2	14	12 <sup>A</sup>	6 <sup>B</sup>	1					3			2,56 <sup>e</sup>

a; b; c; d; e; com  $p < 0,0001$

1 = Critério interpretativo de acordo com Performance (2010).

A = CIM<sub>50</sub> = Concentração que inibiu 50% das amostras testadas

B = CIM<sub>90</sub> = Concentração que inibiu 90% das amostras testadas

% Suscep= porcentagem de amostras sensíveis ao antimicrobiano

De acordo com os resultados, os isolados de *S. aureus* são sensíveis à enrofloxacin, SUT e gentamicina, apresentando CIM<sub>90</sub> = 4  $\mu\text{g/mL}$ , CIM<sub>90</sub> = 4  $\mu\text{g/mL}$  e CIM<sub>90</sub> = 32  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, porém, foi observada a presença de linhagens que foram extintas somente em concentrações maiores destes antimicrobianos que variaram de 8-128  $\mu\text{g/mL}$ . Já os SCN

também foram sensíveis à gentamicina e SUT, ambos apresentando CIM<sub>90</sub> = 2  $\mu\text{g/mL}$ , mas a enrofloxacin não teve a mesma eficácia onde foi observado CIM<sub>90</sub> = 8  $\mu\text{g/mL}$  e a presença de 1 isolado que foi eliminado em uma concentração de 8  $\mu\text{g/mL}$ .

Houve discrepância entre os resultados dos testes de disco-difusão em ágar e CIM para enrofloxacin, onde os isolados de *S. aureus* foram considerados resistentes e sensíveis a estes testes, respectivamente. Isso pode ser possível devido à capacidade do teste CIM de evidenciar isolados remanescentes observados após o CIM<sub>90</sub>. Esta situação não é perceptível no teste de disco-difusão em ágar, que possivelmente podem ter desenvolvido algum mecanismo de resistência como, por exemplo, efluxo, provocando uma menor concentração da droga dentro da bactéria fazendo com que a síntese proteica prosseguisse normalmente e o micro-organismo sobrevivesse (Pereira-Maia et al., 2010). Também é possível dizer que, a presença de *S. aureus* resistentes pode estar condicionada, entre outros fatores, à aplicação de produtos em subdosagens ou em período insuficiente de tratamento dos animais. Soma-se à negligência às normas higiênicas de manejo de ordenha que favorecem a transmissão dessas bactérias entre animais de um mesmo ambiente (Zafalon et al., 2008 e Klein, 2010).

Os resultados de sensibilidade à enrofloxacin no presente estudo estão semelhantes a outros trabalhos (Langoni et al., 2000; Brito et al., 2001; Giannechini, 2002; Zafalon et al., 2008; Haran et al., 2012) que observaram enrofloxacin com CIM >2 µg/mL e 83% de sensibilidade; perfil de sensibilidade dos isolados de *S. aureus* para gentamicina variando de 83 a 100% com CIM =0,5 µg/mL e sensibilidade a SUT de 97,3%, considerando estes antimicrobianos efetivos no tratamento da mastite bovina.

Quanto à tetraciclina, além de apresentar um CIM<sub>90</sub> de 128 µg/mL para os isolados de *S. aureus*, foi possível perceber a presença de linhagens as quais o antimicrobiano foi efetivo somente na concentração de 256 µg/mL. Seguindo a mesma tendência, ao avaliarmos os SCN observamos CIM<sub>90</sub> de 256 µg/mL a este antimicrobiano. Os

isolados remanescentes podem ter utilizado o mecanismo de efluxo ou outro, onde proteínas citoplasmáticas protegeram o ribossomo bacteriano da ação das tetraciclinas, fazendo com que a síntese proteica prosseguisse normalmente (Pereira-Maia et al., 2010).

Os isolados de *S. aureus* são resistentes à amoxicilina, penicilina e lincomicina, de acordo com os resultados apresentando CIM<sub>90</sub> = 4 µg/mL, CIM<sub>90</sub> = 64 µg/mL e CIM<sub>90</sub> = 32 µg/mL, respectivamente e mais uma vez foi possível perceber a presença de linhagens as quais os antimicrobianos mostraram atividade bactericida em concentrações maiores que variaram entre 8-256 µg/mL. Giannechini et al., 2002 ao avaliarem *S. aureus* encontraram CIM<sub>90</sub> >8 µg/mL e 56% de resistência à penicilina. Os isolados de SCN também são resistentes a lincomicina e penicilina, com os resultados de CIM<sub>90</sub> = 32 µg/mL e CIM<sub>90</sub> = 2 µg/mL, sendo que, para este último, foi possível perceber a presença de isolados que sofreram atividade bactericida na concentração de 128 µg/mL; da mesma forma, foi observado o perfil de resistência para cefalotina com CIM<sub>90</sub> = 16 µg/mL.

Os trabalhos de Brito et al. (2001), Zafalon et al. (2008), Rubin et al. (2011) e Haran et al. (2012) apontaram resultados de resistência à beta-lactâmicos (em especial a penicilina) que variaram de 31 a 63% com CIM >8 µg/mL e mesmo que os valores absolutos de resistência encontrados por estes autores não estejam próximos ao de nosso estudo deve-se ter em mente que as infecções causadas por *S. aureus* são normalmente tratadas com antibióticos cujas dosagens são estabelecidas com base nos resultados de sensibilidade observados *in vitro* e em dados farmacológicos da droga usada, porém, sabe-se que fatores inerentes ao animal podem afetar a concentração efetiva da droga no sítio de ação. O uso de antibióticos para o tratamento da mastite é um passo importante para o controle da

doença, mas o amplo uso de penicilinas na medicina veterinária pode favorecer o desenvolvimento de resistência e explicar a maior prevalência de amostras resistentes a beta-lactâmicos (Zafalon et al., 2008 e Klein, 2010).

## 12. CONCLUSÕES

A identificação genotípica de *S. aureus* pode ser feita pela amplificação do gene *femA* e, dentre os isolados avaliados, *S. aureus* foi o principal patógeno encontrado, confirmando este micro-organismo como um dos principais agentes presentes em infecções intramamárias.

A identificação genotípica de *S. aureus* MRSA pode ser feita pela amplificação do gene *mecA*.

A padronização da técnica de PCR multiplex, para identificação de genes para enterotoxinas estafilocócicas, mostrou-se útil para avaliar um possível perfil enterotoxigênico dos *S. aureus* isolados de leite.

*S. aureus*, potencialmente produtores de enterotoxinas, foram encontrados em amostras de leite de tanque das regiões Central Mineira, Metropolitana de Belo Horizonte e Noroeste de Minas, todas consideradas mesorregiões produtoras de leite do Estado de Minas Gerais. Isto evidencia o risco potencial que o leite contaminado pode representar à saúde pública devido à termoestabilidade das enterotoxinas estafilocócicas e sua conseqüente resistência ao tratamento de pasteurização do leite.

A susceptibilidade a antimicrobianos, pelos testes *in vitro*, tanto das colônias de *S. aureus*, bem como as *Staphylococcus* spp., apresentou respostas semelhantes onde os antimicrobianos enrofloxacina, gentamicina, e sulfametoxazole+trimethoprim foram mais eficazes contra estes isolados, por outro

lado, os antimicrobianos menos eficazes foram aqueles pertencentes ao grupo dos beta-lactâmicos.

## 13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, R.M.C.M. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública\*, *Arch. Vet. Sci.* v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.

AIRES-DE-SOUZA, M.; PARENTE, C. E. S. R.; VIEIRA-MOTTA, O.; *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 73, n. 12, p. 3845-3849, 2007.

ALMEIDA, C.F.; ARAÚJO E. S.; SOARES Y.C.; *et al.* Perfil epidemiológico das intoxicações alimentares notificadas no Centro de Atendimento Toxicológico de Campina Grande, Paraíba. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v.11, n.1,p. 139-146, São Paulo, 2008.

AL-TALIB, H.; YEAN, C. Y.; AL-KHATEEB, A.; *et al.* A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and panton-valentine leucocidin. *BMC Microbiol.*, 2009, v. 9, n.113, p. 1-8, 2009.

ANDRADE, A. P. C. Identificação bioquímica, molecular e pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo coalho. 2009. 71f. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) Universidade Federal do Ceará-CE.

- ANDRADE, H. H. Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites subclínicas bovina no Distrito Federal e entorno. 2012. 60f. Dissertação (Mestrado em saúde animal) Universidade Federal de Brasília, DF.
- ÂNGELO, F. F. Detecção de genes de exotoxinas em *Staphylococcus* spp. isolados de leite cru refrigerado e de leite de vacas com mastite. 2010. 70f. Tese (Doutorado em ciência e tecnologia de alimentos) Universidade Federal de Viçosa-UFV.
- ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus* enterotoxins. *Toxins*, v. 2, n. 7, p. 1751-1773; 2010.
- ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação?. *Semina: Ciênc. Agr.*, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.
- BARBALHO, T. C. F.; MOTA, R. A. Isolamento de agents bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* v. 2, n. 2, p. 31-36, 2001.
- BARRETO, N. S. E.; SANTOS, G. C. F.; CREPALDI, A. L. *et al.* Qualidade microbiológica e suscetibilidade antimicrobiana do leite in natura comercializado em Cruz das Almas, Bahia. *Semina: Ciênc. Agr.*, v. 33, n. 6, p. 2315-2326, 2012.
- BANDOCH, P.; MELO, L. S. Prevalência de mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: uma revisão bibliográfica. *Publ. UEPG Biol. Health Sci.*, v.17, n.1, p. 47-51. 2011.
- BAUER, A.W.; KIRB, W.M.M.; SHERRIS, J.C. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.45, n. 4, p.493-496, 1966.
- BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: *FOODBORNE bacterial pathogens*. New York: Marcel Dekker, 1989, p.463-523.
- BERGER-BACHI, B.; ROHRER, S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch. Microbiol.* v. 1, n. 178, p. 165–171, 2002.
- BORGES, M. F.; ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L.; *et al.* *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados. *B. Ceppa*, v. 21, n. 1, p. 71-86, 2008.
- BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L. *et al.* Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Cienc. Rural*, v.38, n.5, p.1431-1438, 2008b.
- BRITO, M. A.V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S. *et al.* Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, n.5, p.531-537, 2001.
- CARDOSO, H. F. T. Identificação de fatores de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite bovino em Minas Gerais. 1999a. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- CARDOSO, H. F.T.; SILVA, N.; SENA, M. J. *et al.* Production of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.59, n. 5, p.347-349, 1999b.

- CARDOSO, H. F. T.; COSTA, G. M.; SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *S. aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.22, n.5, p.199-206, 2000a.
- CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L. S., SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* vol.52, n.1, p. 7-10, Belo Horizonte, 2000b.
- CARMO, L.S. Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e TSST-1 para uso em ensaios imunoenzimáticos. 2001. 254f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R. *et al.* Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.*, v.19, n. 1, p. 9-14, 2002.
- CHAVES, T. F. Revisão teórica das técnicas utilizadas na detecção de enterotoxinas estafilocócicas. *Cienc. Equat.*, v. 2, n. 1, p.1-14, 2012.
- CLIVER, D. O. *Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1994. 613p.
- COOK, E.; WANG, W.; ROBIU, N.; FRIES, C. B. *et al.* Measurement of staphylococcal enterotoxin B in serum and culture supernatant with a capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Vac. Immunol.*, v. 14, n. 9, p. 1094-1101, 2007.
- CONTROLE de antimicrobianos. 2010. Instituto Racine. Informe eletrônico. ANVISA RDC n 44/2010. Disponível em: <<http://www.racine.com.br/noticias/portal-racine/noticias/anvisa-publica-rdc-n-44-sobre-controle-de-antimicrobianos>>. Acessado em 11/02/2011.
- COSTA, G. M. Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do Estado de Minas Gerais. 2008. 123f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; MALFERRARI, G. *et al.* Technical Note: Improved for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. *J. Dairy Sci.*, v. 89, n. 1, p. 163-169, 2006.
- CUNHA, M. L. R. S.; PERESI, E.; CALSOLARI, R. A. O. *et al.* Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Braz. J. Microbiol.* v. 1, n. 37, p. 70-74, 2006.
- DADOS Epidemiológicos-DTA período de 2000 a 2011. SVS-Secretaria de Vigilância em Saúde. Unidade Técnica de Doenças de Veiculação Hídrica e Alimentar-UHA. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis-CGDT. SVS. 36 p. 2011. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_dta\\_periodo\\_2000\\_2011\\_site.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_periodo_2000_2011_site.pdf)> Acessado em 29/01/2013.
- DIAS, N. L. Identificação de *Staphylococcus aureus*, avaliação do seu potencial enterotoxigênico e resistência a metilina pela técnica de PCR em amostras de leite da microrregião de Sete Lagoas-MG, 2009. 2010. 52f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

DIAS, N. L.; SILVA, D. C. B.; OLIVEIRA, D. C. B. S. *et al.* Detecção de genes de *Staphylococcus aureus*, enteroxinas e de resistência à meticilina em leite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 63, n.1, p. 1547-1552, 2011.

DINIZ, C. M.; MELO, R. T.; MENDONÇA, E. P. *et al.* Resistência a oxacilina em *Staphylococcus spp.* isolado de leite mastítico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 69, n. 4, p. 482-488, 2010.

DISTRIBUIÇÃO dos produtores por Região, 2010. TOP 100 Milkpoint\*. EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tabela 02.90. Atualizado em fevereiro/2012. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0290a.php>> Acessado em 09/07/2012.

ESTATÍSTICAS do leite: produção total de leite, sob inspeção e vacas ordenhadas no Brasil. EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Acessado em: 20/11/2012. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0231.php>>

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

FELLI. M. A. V. Quinolonas antibacterianas. Química Farmacêutica I-FCF/USP, 2007. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/QUINOLONAS2007.pdf>> Acessado em 04/07/11.

FERREIRA, L. M.; CONDE, S. O.; ZAFALON, L. F. *et al.* Identificação de genes enterotoxigênicos de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite bovina. In: *Congresso Brasileiro de qualidade do leite: segurança alimentar e saúde pública*, 3., Recife. CBQL: UFRPE. *Anais*, 2008.

FERREIRA L. M. Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* envolvidas em casos de mastite bovina. 2008b. 58f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, São Paulo, SP.

FILHO, V. M. S. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina no Estado e Pernambuco. 2007. 82f. Dissertação (Mestrado-Departamento de genética-Centro de ciências biológicas)- Universidade Federal de Pernambuco, PE.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 175p.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M. *et al.* Perfil de densibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase positivas* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FREITAS, M. F.; LUZ, I. S.; PINHEIRO JUNIOR, J. W. *et al.* Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus spp.* Isoladas de queijo coalho. *Cienc. Tecnol. Alim.*, v. 29, n. 2, p. 375-379, 2009.

- FUEYO, J.M.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. *et al.* Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 3, p. 1278–1284, 2005.
- GANDRA, E. A. Multiplex PCR para detecção de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* em leite UHT artificialmente contaminado. Pelotas, 2006. 69f. Tese (Doutorado em ciência e tecnologia agroindustrial) - Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pernambuco.
- GIANNECHINI, R. E.; CONCHA, C., FRANKLIN, A. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay. *Acta Vet. Scand.*, v. 43, n. 1, p. 31-41, 2002.
- HAUG, A.; HOSTMARK, A.T.; HARSTAD, O. Bovine milk in human nutrition – a review. *Bio Med Central. Lip. Health Dis.*, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2007.
- HARAN, M. K. P.; GODDEN, S. M.; BOXRUD, D. *et al.* Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Isolated from Bulk Tank Milk from Minnesota Dairy Farms. *J. Clin. Microbiol.*, v. 50, n. 3, p. 688–695, 2012.
- HWANG, S. Y.; PARK, Y. K.; HOO, H. C. *et al.* Spa typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea. *J. Vet. Sci.*, v. 11, n. 2, p. 125-131, 2010.
- ISHIHARA, K.; SHIMOKUBO, N.; SAKAGAMI, A. *et al.* Occurrence and Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an Academic Veterinary Hospital. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 76, n.15, p. 5165–5174. 2010.
- IKEDA, T.; TAMATE, N.; YAMAGUCHI, K.; *et al.* Mass Outbreak of Food Poisoning Disease Caused by Small Amounts of Staphylococcal Enterotoxins A and H *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 71, n. 5, p. 2793–2795, 2005.
- JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J. *et al.* Relationships between *staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect. Immunol.*, v. 70, n. 2, p. 631–641, 2002.
- JOHNSON, W.M.; TYLER, S.D.; EWAN, F.E.; *et al.* Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v. 1, n. 29, p. 426–430, 1991.
- KALMUS P.; AASMAE, B.; KÄRSSIN A. *et al.* Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet. Scand.*, v. 53, n.4, p. 1-7, 2011.
- KYAW, C. M. Antibióticos e Quimioterápicos. 2010. Disponível em: <<http://vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/antibioticos/antibioticos.html#mecanismos>>. Acessado em 15/01/2010.
- KYAW, C. M. 2011. Antibióticos e Quimioterápicos. Disponível em: <<http://vsites.unb.br/ib/cel/microbiologia/antibioticos/antibioticos.html#caracteristicas>>. Acessado em 11/05/2011.

- KOBAYASHI I. I. N.; WU, H.; KOJIMA, K. *et al.* Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol. Infect.*, v.1, n. 113, p. 259-266, 1994.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; *et al.* Diagnóstico microbiológico. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465 p.
- KROPEC, A.; MAIRA-LITRAN, T.; JEFFERSON, K. *et al.* Poly-N-Acetylglucosamine Production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. *Inf. Immunol.*, v. 73, n. 10, p. 6868–6876, 2005.
- LAMAITA H. C.; CERQUEIRA M. M. O. P.; CARMO L. S. Contagem de *Staphylococcus spp.* e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.5, p.702-709, 2005.
- LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D. *et al.* Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet. Microbiol.*, v.67, p.127-141, 1999.
- LANGONI, H.; ARAÚJO, W. N.; SILVA, A. V. *et al.* Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacina bem como com a sua associação. *Arq. Inst. Biol.*, v.67, n.2, p.177-180, 2000.
- LEE, J. H. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, n. 11, p. 6489-6494, 2003.
- LEE, J. H.; JEONG, J. M.; PARK, Y. H. *et al.* Evaluation of the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, n. 6, p. 2780-2782, 2004.
- LEITE, M.O. Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol líquido, azidiol comprimido e bronopol. 2006. 62f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- LEITE inspecionado no Brasil, 2000/2011. Zocal R. EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Fonte: IBGE/ Pesquisa Trimestral do Leite. Embrapa Gado de Leite. Tabela 02.31. Atualizado em fevereiro/2012. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0231.php>>. Acessado em 09/07/2012.
- LIVERMORE. D. M. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.16, suppl. 1, p 3-10. 2000.
- LONGARAY, S. M. Identificação de enterotoxinas produzidas por linhagens de *Staphylococcus aureus* envolvidas em surtos de doenças transmitidas por alimentos no período de 2002 a 2003, no Rio Grande do Sul. 2007. 48f. Dissertação (Mestrado em ciência animal)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.
- LOVSET, A.; LONCAREVIC, S.; BERDAL, K. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in *Staphylococcal* isolates. *J. clin. Microbiol.*, v. 42, n. 8, p. 3869–3872, 2004.

LUZ, I. S. Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco. 2008. 125f. Dissertação ( Mestrado em Saúde Pública)-Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, PE.

MACRONUTRIENTES, vitaminas e elementos. DRI–Dietary Reference Intakes. National Academy of Sciences. Institute of Medicine. Food Nut. Board. Table for carbohydrate, fiber, fat, fatty acids and protein. Disponível em: <<http://fnic.nal.usda.gov/dietary-guidance/dietary-reference-intakes/dri-tables>> Acessado em: 18/03/2013.

MAIDHOF, H.; REINICKE, B.; BLUMEL, P. *et al.* Meca, which encodes a factor essential for expression of methicillin resistance, affects glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.*, v. 173, n. 11, p. 3507-3513, 1991.

MARTINEZ, G.; HAREL, J.; GOTTSCHALK, M. Specific detection by PCR of *Streptococcus agalactiae* in milk. *Can. J. Vet. Res.*, v. 65, n.1, p. 68-72, 2001.

MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L. *et al.* Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. *Cienc. Anim. Bras.*, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MARINHO, M.; BALDINE, S.; SILVA, A. V. *et al.* Ação in vitro da enrofloxacin em microrganismos isolados de leite mastítico da região de Botucatu-sp. *ARS Veterinária*, v. 18, n. 2, p. 120-124, 2002.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J. clin. Microbiol.*, v. 38, n. 3, p. 1032–1035, 2000.

MERUSSI, G. D.; MAFFEI, D. F.; CATANOZI, M. P. L. M. Surtos de gastroenterite relacionados ao consumo de laticínios no Estado de São Paulo no período de 2000 a 2010. *Alim. Nutr.*, v. 23, n. 4, p. 639-645, 2012.

METHODS for dilution antimicrobial. Susceptibility tests for bacteria that grow aerobically approved standard. 58 p. NCCLS, M7-A5, v. 20, n. 2, 2000.

METHODS for dilution antimicrobial-Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; (Substituição da norma M100-S14, vol. 24). 177 p. 15º suplemento informativo M100-S15, vol. 25, n. 1, 2005.

METHODS for dilution antimicrobial Susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard- eight edition. 65 p. M07-A8, v. 29, n. 2, (replaces M07-A7, v. 26, n. 2), 2009.

METHODOLOGY of testing antimicrobial sensitivity by dilution for aerobic bacteria growth: norma aprovada. (Substituição da norma A5 vol. 20, n. 2). Sexta edição. M7-A6, vol. 23, n. 2, 2003.

NADER, A. F.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, A. Produção de enterotoxinas e da toxina do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* vol.59, n. 5, p.1316-1318, 2007.

- NAKANO, V.; NISHIYAMA, S. A.; AVILA-CAMPOS, M. J. Beta-lactamases: sua importância na resistência bacteriana. 2011. Departamento de Microbiologia. Universidade de São Paulo. Artigo on-line. Disponível em: < <http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/> e [http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com\\_content&view=article&id=47&Itemid=57&lang=br](http://www.icb.usp.br/bmm/mariojac/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=57&lang=br)>. Acessado em 30/06/11.
- NEVES, M. C.; COSTA, J. R. V.; VIEIRA, V. C. *et al.* Resistência aos antimicrobianos e análise da diversidade genética de staphylococcus aureus por PCR-rapd. *Arq. Inst. Biol.*, v.77, n.4, p.575-582, 2010.
- OLIVEIRA, C. M.; SOUZA, M. G.; SILVA, N. S. *et al.* Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, Estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011.
- ORWIN, P. M.; FITZGERALD, R.; LEUNG, D. Y. M.; GUTIERREZ, J. A.; BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization of Staphylococcus aureus enterotoxin L. *Infect. Immunol.*, v. 71, n. 5, p. 2916-2919, 2003.
- PARK, J. Y.; FOX, L. K.; SEO, K. S.; *et al.* Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. Elsevier. *Vet. Microbiol.*, v. 147, n. 1, p. 149-154, 2011.
- PERFORMANCE standards for antimicrobial susceptibility testing, twentieth information supplement. Tabela 2c. NCCLS. 160 p. M100 S20 vol. 30 N. 1 Substitui a Norma M100-S19 Vol. 29, n. 3, 160 p. Janeiro. 2010.
- PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. B. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Quim. Nova*, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.
- PHUEKTES, P.; MANSELL, P. D.; BROWNING, G. F. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of Staphylococcus aureus and Streptococcal causes of bovine mastitis. *J Dairy Sci.*, v. 84, n. 5, p. 1140-1148, 2001.
- POTTUMARTHY, S.; SCHAPIROM, J. M.; PRENTICE, J. L. *et al.* Clinical isolates of Staphylococcus intermedius masquerading as methicilin-resistant Staphylococcus aureus. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, n. 12, p. 5881-5884, 2004.
- PRODUÇÃO de leite, vacas ordenhadas e produtividade animal no Brasil – 1980/2010. Zoccal R. EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Fonte: IBGE/Pesquisa da Pecuária Nacional. Embrapa Gado de Leite. Tabela 02.30. Atualização: fevereiro/2012. Acessado em 09/07/2012. <http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0230.php>
- PROFT, T.; FRASER, J. D. Bacterial superantigens. *Clin. Exp. Immunol.*, v.133, n. 1, p. 299 – 306, 2003.
- QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K. *Clin. Vet. Microbiol.* London: Wolfe, 1994. 648 p.
- RAJKOVIC A.; MOUALIJ B. E.; UYTENDAELE, M. *et al.* Immunoquantitative real-time PCR for detection and quantification of Staphylococcus aureus enterotoxin B in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 72, n. 10, p. 6593-6599, 2006.
- RANKING da Produção de Leite por Estado, 2010/2011. ZOCAL, R. EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Fonte: IBGE/Pesquisa da Pecuária Municipal. Embrapa Gado de Leite, Tabela 02.40. 2012. Disponível em <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0240.php>>. Acessado em 09/07/2012.

REGIMENTO da Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite. 2009. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/servlet/VisualizarAnexo?id=5449>>. Acessado em 15/06/09.

REGULAMENTO técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. 2011. MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anexo IV. SISLEGIS, IN 62/2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>>. Acessado em 17/12/2012.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D. *et al.* Coagulase positive Staphylococcus intramammary infections in primiparous dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.77, n. 4, p.958-969, 1994a.

ROHRER, S.; BERGER-BACHI, B. FemABX Peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and-lactam resistance in Gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 47, n. 3, p. 837-846, 2003.

RUBIN, J. E.; BALL, K. R.; CHIRINOTREJO, M. Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius isolated from various animals. *Can. Vet. J.*, v. 52, n. 1. p. 153-157, 2011.

SÁ, M. E. P.; CUNHA, M. S. R. S.; ELIAS, A. O. Importância do Staphylococcus aureus nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico e a relação com a contagem de células somáticas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.41, n. 1, p.321-326, 2004.

SADER, H. S.; FRITSCHÉ, T. R.; JONES, R. N. Antimicrobial Activities of Ceftaroline and ME1036 tested against clinical strains of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 52, n. 3, p. 1153-1155, 2008.

SALVARANI, F. M.; PINTO, F. F.; LOBATO, F. C. F. *et al.* Concentração inibitória mínima (CIM) de oito antimicrobianos frente isolados de Streptococcus suis. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 45, n. 1, p. 41-47, 2008.

SANCHES ITO, C. A. Ácido nalidíxico como marcador preditivo de sensibilidade às fluorquinolonas em Escherichia coli isoladas de urocultura. 2004. 100 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Staphylococci: colonies morphological characteristics, coagulase and EEA production collected from cooled raw milk samples. *Cienc. Agrar.*, v. 27, n. 4, p. 639-646, 2006.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C. *et al.* Estafilococos em alimentos. *Arq. Inst. Biol.*, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SCHELIN, J.; CARLQUIST, N. W.; COHN, S. T.; LINDQVIST, R.; BARKER, C.; RADSTRON, P. The formation of Staphylococcus aureus enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, v. 2, n. 6, p. 580-592, 2011.

SHARMA, N. K.; REES, C. E. D.; DODD, C. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for Staphylococcus aureus strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 66, n. 4, p. 1347-1353, 2000.

SHITTU, A.; LIN, J. Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of Staphylococcus aureus in KwaZulu-Natal province, South Africa. *BMC Infect. Dis.*, v. 125, n. 6, p. 12-13, 2006.

- SILVA, E. R. Genotipagem e avaliação do potencial enterotoxigênico de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite caprina e bovina. 2004. 57f. Tese (Doutorado em ciência animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- SILVA, E. R.; SILVA, N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Can. J. Vet. Res.*, v. 69, n. 4, p. 260-264, 2005.
- SILVA, M. A. Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina. 2008. 38 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- SILVA, E. P.; BERGAMINI, A. M. M.; OLIVEIRA, M. A. Alimentos e agentes etiológicos envolvidos na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil-2005 a 2008. *Bepa*. v. 7, n. 77, p. 4-10, 2010.
- SILVEIRA FILHO, V. M. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina no Estado de Pernambuco. 2007. 82 fl. Mestrado (Genética), Universidade Federal de Pernambuco, PE.
- SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; PRIBUL, B. R. *et al.* Antimicrobial resistance and detection of *mecA* and *blaZ* genes in coagulase-negative *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. *Pesqui. Vet. Bras.* v. 32, n. 8, p. 692-696, 2012.
- SOUSA, M. A.; LENCASTRE, H. Evolution of Sporadic Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Hospitals and their similarities to isolates of community-acquired MRSA. *J. Clin. Microbiol.* v. 41, n. 8, p. 3806-3815, 2003.
- SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. Monografia. *Atualizações*, v. 34, n. 1, p. 27-36, 2005.
- STAPLETON P. D.; TAYLOR, P. W. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci. Prog.*, v. 85, n. 1, p. 57-72. 2002.
- STAPLETON P. D.; SHAH, S.; EHLERT K. *et al.* The  $\beta$ -lactam-resistance modifier (-)-epicatechingallate alters the architecture of the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, v.153, n. 7, p. 2093-2103, 2007.
- STURENBURG, E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. *G. Med. Sci.*, v. 7, n. 1, p. 1-19, 2009.
- TSENG, C. W.; ZHANG, S.; STEWART, G. Accessory gene regulator control of *Staphylococcal* enterotoxin D gene expression. *J. Bacteriol.*, v. 186, n. 6, p. 1793-1801, 2004.
- TOLLERSRUD, T.; KAMPEN, A. H.; KENNY, K. *Staphylococcus aureus* enterotoxin D is secreted in Milk and stimulates specific antibody responses in cows in the course of experimental intramammary infection. *Infect. Immun.*, v. 74, n. 6, p. 3507-3512, 2006.
- TRAN, N. K.; WISNER, D. H.; ALBERTSON, T. E. *et al.* Multiplex polymerase chain reaction pathogen detection in trauma, emergency, and burn surgery patients with suspected septicemia. *Surgery*, v.151, n. 3, p. 456-463, 2012.

VYLETELOVÁ, M.; VLKOVÁ, H.; MANGA, I. Occurrence and characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant coagulase-negative *Staphylococci* in raw milk manufacturing. *Czech J. Food Sci.*, v. 29, Special Issue: S11–S16, 2011.

VOUILLAMOZ, J.; ENTENZA J. M.; HOHL P. *et al.* LB11058, a new cephalosporin with high penicillin-binding protein 2a affinity and activity in experimental endocarditis due to homogeneously methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, n. 11, p. 4322–4327, 2004.

WATTIAUX, M. A. Lactação e ordenha. Composição do leite e seu valor nutricional. The Babcock Institute. 1994-2011. Board of Regents of the University of Wisconsin System. Disponível em: <<http://babcock.wisc.edu/node/205?q=node/201>>. Acessado em 11/09/2012.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P.; NADER FILHO, A. *et al.* Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 67, n. 2, p. 118-125, 2008.

ZECCONI, A., HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. *Bull. IDF*, v. 1, n. 345, p.15-18, 2000.

ZOCHE, F.; FRANÇA, R. C.; GUIMARÃES, J. A. *et al.* PCR Multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Comunic. Interc.*, v. 34, n. 7, p. 487-491, 2009.

ZUTIC, M.; CIRKOVIC, I.; PAVLOVIC, L. *et al.* Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk samples from Serbian cows with subclinical mastitis. *Afric. J. Microbiol. Res.*, v. 6, n. 29, p. 5887-5889, 2012.

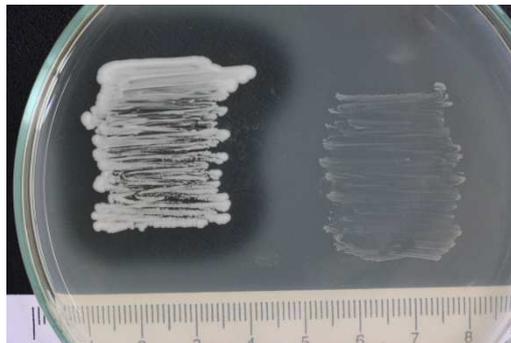
## 14 – ANEXO I - PRANCHA DE FOTOS

Provas utilizadas para testes fenotípicos segundo Quinn et al., 1994 para identificação de *Staphylococcus aureus*

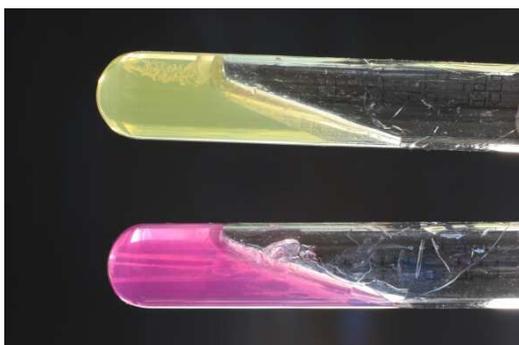
(Fotos: André Almeida Fernandes)



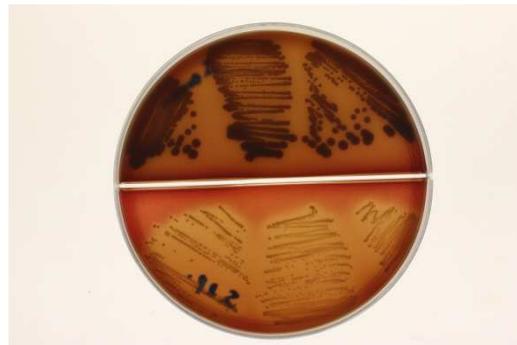
ÁGAR MANITOL 7% NaCl  
sem inóculo (acima)  
negativo com alcalinização do meio (esquerda)  
positivo com acidificação do meio (direita)



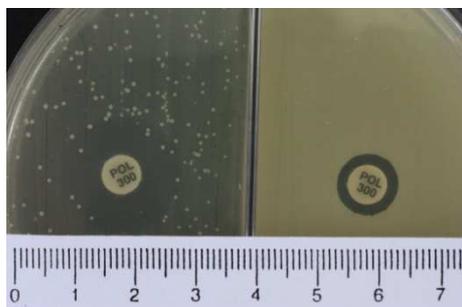
ÁGAR DNASE  
positivo (esquerda)  
negativo (direita)



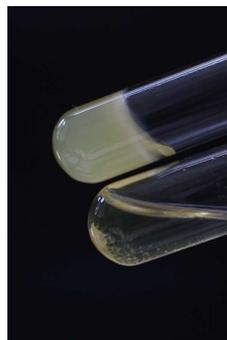
PROVA DA UREASE  
negativa (acima)  
positiva (abaixo)



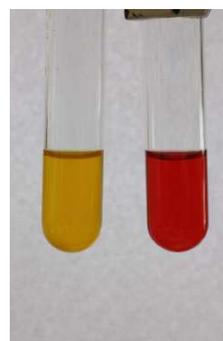
ÁGAR SANGUE (visualização de hemólise)  
negativa (acima)  
hemólise positiva (abaixo)



TESTE DE POLIMIXINA B  
sensível (esquerda)  
resistente (direita)



COAGULASE  
positiva (acima)  
negativa (abaixo)



MANITOL  
positiva (esquerda)  
negativa (direita)