

Natanael Lamas Dias

**IDENTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus aureus*, AVALIAÇÃO DO SEU
POTENCIAL ENTEROTOXIGÊNICO E RESISTÊNCIA A METICILINA
PELA TÉCNICA DE PCR EM AMOSTRAS DE LEITE DA
MICRORREGIÃO DE SETE LAGOAS-MG, 2009.**

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

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Nivaldo da Silva

**Belo Horizonte
Março/2010**

FICHA CATALOGRÁFICA/Deverá ser feita pela Biblioteca/EV/UFMG -(verso p.1)

ASSINATURA DA BANCA = página 3 verso em branco.....

= página verso em branco.....

Dedico este trabalho a todos os brasileiros por terem custeado meus estudos e a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela constante iluminação na minha vida,

Aos meus pais, José Viana e Selma e aos meus irmãos, Leandro e Nathan, por toda dedicação, companheirismo, amizade e amor e por sempre estarem estimulando meu crescimento pessoal.

Aos meus avós maternos (*in memoriam*), que tenho muita saudade, pelo exemplo e ensinamentos que contribuíram muito na minha formação pessoal e aos meus avós paternos pela amizade e carinho.

À minha noiva, Daniela Cristina, companheira inseparável, pelo carinho e por ter sido minha maior incentivadora nesse mestrado, contribuindo muito para concretização desse trabalho.

Ao meu orientador, professor Nivaldo da Silva, pelo apoio, incentivo e ensinamentos que foram valiosos no meu aperfeiçoamento profissional.

À todos os membros da banca examinadora, por aceitarem contribuir com este trabalho.

À toda equipe do LANAGRO - Pedro Leopoldo, em especial ao Pedro Mota, Anapolino, Marcelo, Antônio Augusto e Ana Cláudia, por terem permitido a realização desse trabalho nas dependências do LANAGRO.

À equipe do LBM do LANAGRO, em especial a Mariana e ao Antônio Augusto por terem me ajudado muito na realização desse experimento.

Ao meu primo Maximiller pela amizade e pela colaboração neste trabalho.

À equipe de microbiologia do LANAGRO, em especial a Sãozinha por ter contribuído com muita presteza na parte microbiológica desse experimento.

SUMÁRIO

	RESUMO	10
	ABSTRACT	11
1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Produção do leite.....	13
2.2	Qualidade do leite.....	16
2.3	Mamite bovina.....	17
2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.5	Intoxicação alimentar e Enterotoxinas.....	19
2.6	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à Meticilina (MRSA).....	22
2.7	PCR no diagnóstico molecular	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Local de realização do experimento.....	26
3.2	PCR.....	26
3.3	Amostras bacterianas.....	27
3.4	Amostras de Leite.....	27
3.4.1	Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células (CCS).	27
3.5	Extração de DNA.....	27
3.6	Reação de PCR e Detecção dos genes <i>fem A</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> e <i>mec A</i>	28
3.7	Otimização da PCR.....	28
3.8	Especificidade da técnica de PCR.....	29
3.9	Sensibilidade da técnica de PCR.....	29
3.10	Utilização da técnica de PCR nas amostras de leite de tanque de expansão.	29
3.11	Análises Estatísticas	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Especificidade.....	31
4.2	Sensibilidade.....	31
4.2.1	Resultado da avaliação da sensibilidade.....	34
4.3	Amostras clínicas.....	34
5	DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	39
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 01-	Principais Microrregiões produtoras de leite no Brasil.....	14
Quadro 02-	Iniciadores utilizados.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 01-	Estimativas de prevalência de quartos infectados no rebanho e de perdas de produção em relação à CCSLT.	30
Tabela 02-	Distribuição das amostras de leite com relação à CBT e a presença de <i>S. aureus</i> , identificadas pela amplificação do gene <i>fem A</i> , procedentes de produtores rurais da microrregião de Sete Lagoas-MG, 2009.....	35
Tabela 03-	Distribuição das amostras de leite com relação à CCS e a presença de <i>S. aureus</i> , identificadas pela amplificação do gen <i>fem a</i> , procedentes de produtores rurais da microrregião de Sete Lagoas-MG, 2009.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Microrregião de Sete Lagoas	14
Figura 2-	Produtos de PCR utilizando iniciador FEM A. Canaleta 1 DNA de <i>S. aureus</i> extraído de leite. Canaleta 2- DNA de <i>S. aureus</i> extraído de meio BHI. Canaleta 3 - DNA de <i>S. epidermidis</i> extraído de meio BHI e M: Padrão de tamanho molecular (DNA Ladder 100 pb) visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL).....	31
Figura 3-	Placas de BHI semeadas com leite contaminado nas diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , apresentando colônias de <i>S. aureus</i>	31
Figura 4-	Produtos de PCR obtidos com DNA extraído a partir de diluições seriadas de <i>S. aureus</i> , utilizando iniciador FEM A (132 pb), M: Padrão de tamanho molecular (DNA Ladder 1 Kb); 1- Diluição 10^{-1} ; 2- Diluição 10^{-2} ; 3- Diluição 10^{-3} ; 4- Diluição 10^{-4} ; 5- Diluição 10^{-5} ; 6- Diluição 10^{-6} ; 7- Diluição 10^{-7} ; 8- Diluição 10^{-8} ; 9- Diluição 10^{-9} , visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL).....	32
Figura 5-	Figura 5: Produtos de PCR obtidos com DNA extraído a partir de diluições seriadas de <i>S. aureus</i> , utilizando iniciador MEC A (533 pb): Diluição 10^{-1} ; 2- Diluição 10^{-2} ; 3- Diluição 10^{-3} ; 4- Diluição 10^{-4} ; 5- Diluição 10^{-5} ; 6- Diluição 10^{-6} ; 7- Diluição 10^{-7} ; 8- Diluição 10^{-8} ; 9- Diluição 10^{-9} ; M: Padrão de tamanho molecular (DNA Ladder 1 Kb), visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL).....	32
Figura 6-	Produtos de PCR obtidos com DNA extraído a partir de diluições seriadas de <i>S. aureus</i> , utilizando iniciador SEA (102 pb). M: Padrão de tamanho molecular (DNA Ladder 1 Kb); 1- Diluição 10^{-1} ; 2- Diluição 10^{-2} ; 3- Diluição 10^{-3} ; 4- Diluição 10^{-4} ; 5- Diluição 10^{-5} ; 6- Diluição 10^{-6} ; 7- Diluição 10^{-7} ; 8- Diluição 10^{-8} ; 9- Diluição 10^{-9} visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL).....	33

Figura 7-	Produtos de PCR obtidos com DNA extraído a partir de diluições seriadas de <i>S. aureus</i> , utilizando iniciador SEB (164 pb). M: Padrão de tamanho molecular (DNA Ladder 1 Kb); 1- Diluição 10 ⁻¹ ; 2- Diluição 10 ⁻² ; 3- Diluição 10 ⁻³ ; 4- Diluição 10 ⁻⁴ ; 5- Diluição 10 ⁻⁵ ; 6- Diluição 10 ⁻⁶ ; 7- Diluição 10 ⁻⁷ ; 8- Diluição 10 ⁻⁸ ; 9- Diluição 10 ⁻⁹ , visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL).....	33
Figura 8-	Produtos de PCR obtidos com DNA extraído a partir de diluições seriadas de <i>S. aureus</i> , utilizando iniciador SEC (451 pb): 1- Diluição 10 ⁻¹ ; 2- Diluição 10 ⁻² ; 3- Diluição 10 ⁻³ ; 4- Diluição 10 ⁻⁴ ; 5- Diluição 10 ⁻⁵ ; 6- Diluição 10 ⁻⁶ ; 7- Diluição 10 ⁻⁷ ; 8- Diluição 10 ⁻⁸ ; 9- Diluição 10 ⁻⁹ ; M: Padrão de tamanho molecular (DNA Ladder 1 Kb), visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL).....	34
Figura 9-	Distribuição dos genes produtores de enterotoxinas das 145 amostras de <i>S. aureus</i> identificadas pela presença do gene <i>fem A</i> em amostras de leite da microrregião de Sete Lagoas-MG, 2009.....	36

ANEXOS

Anexo 01	Resultados das amostras analisadas.....	48
----------	---	----

RESUMO

Neste trabalho foi realizada a identificação de *Staphylococcus aureus* e a avaliação do seu potencial enterotoxigênico a partir de amostras de leite de bovinos de propriedades rurais localizadas na microrregião de Sete Lagoas-MG, no período de março a junho de 2009. Utilizou-se a extração de DNA de *S. aureus* diretamente de amostras de leite, seguida da amplificação pela técnica da PCR dos genes *fem A*, *sea*, *seb* e *sec*. Os *S. aureus* resistentes à Meticilina (MRSA) foram detectados pela amplificação do gene *mec A*. A avaliação da sensibilidade e especificidade da técnica foi realizada em leite artificialmente contaminado com amostras de *S. aureus* padrão (ATCC 25923, ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 19095 e ATCC 33591) em concentração bacteriana conhecida. A especificidade foi demonstrada pela presença de produtos de PCR de tamanho esperado ao utilizar como molde, o DNA das amostras de referência (controle positivo) e pela ausência de amplificação do DNA de *S. epidermidis* (controle negativo). O limite de detecção dos microrganismos foi de 10 UFC/mL para todos os genes avaliados com os iniciadores específicos. Foram analisadas 200 amostras de leite de tanque de expansão da microrregião de Sete Lagoas -MG, quanto à presença do gene *fem A*. Das 200 amostras estudadas analisou-se estatisticamente se houve correlação entre a presença de *S. aureus* identificados nas amostras de leite com maiores Contagens bacteriana totais (CBT) e se as maiores Contagens de células somáticas (CCS) também estavam relacionadas com a maior presença de *S. aureus*. Dessas 200 amostras, em 145 (72,5%) houve amplificação do gene *fem A* e estas foram analisadas quanto à presença dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *mec A*. Os genes das enterotoxinas mais prevalentes foram: *sea* (60%), seguida de *seb* (37,93%) e posteriormente *sec* (6,89%). Foram encontradas 18 amostras de leite (11,03 %) com *S. aureus* portadores do gene *mec A*, identificando a presença de MRSA no leite da microrregião estudada. Não houve correlação entre as taxas de identificação de *S. aureus* e altas CCS e CBT. A detecção de *S. aureus* diretamente do leite, sem a necessidade de isolamento bacteriano, e a caracterização do potencial enterotoxigênico sugere a utilização da técnica de PCR para estudos epidemiológicos das infecções estafilocócicas da glândula mamária. O alto percentual (72,5%) de amostras de leite positivas para a presença do gene *fem A*, sugere que *S. aureus* constitui-se em um dos principais agentes causadores de infecções intramamárias na microrregião de Sete Lagoas-MG e que seu potencial enterotoxigênico representa um risco potencial à saúde pública. Ressalta-se que a presença de MRSA evidencia a seleção de microorganismos resistentes a antibióticos, provavelmente devido ao uso indiscriminado de antibióticos além de comprometer a qualidade do leite e de produtos derivados é também um risco a saúde humana.

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas, MRSA, PCR

ABSTRACT

The identification of *Staphylococcus aureus* in milk and the evaluation of its potential enterotoxic were evaluable during period from march to june of 2009, on the milk samples from cattle farms located in the microregion of Sete Lagoas-MG. A protocol for DNA extraction from *S. aureus* directly from milk samples, followed by amplifications by PCR of the genes *fem A*, *sea*, *seb* and *sec* were used. The Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) were detected by amplification of the *mec A* gene. The sensitivity and specificity of the technique was tested in milk artificially contaminated milk using a decimal dilution of *S. aureus* standard strains (ATCC 25923, ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 19095 and ATCC 33591). The detection limit of microorganisms was 10 CFU / mL for all genes evaluated with specific primers. The specificity was determined by the presence of expected PCR products from the DNA of the reference strains (positive control) and not amplified DNA from *S. epidermidis* (negative control). 200 milk samples from the expansion tank from the microregion of Sete Lagoas-MG were available for the presence of the gene *fem A*. The results were analyzed statistically if there was a relationship between the presence of *S. aureus* identified in milk samples with higher Total bacteria cont (CBT) and the largest somatic cell cont (CCS) were also related to increased presence of *S. aureus*. Of the 200 samples, 145 (72.5%) amplified the gene *fem A*, and were analyzed for the presence of genes *sea*, *seb*, *sec* and *mec A*. The genes of enterotoxins most prevalent were: *sea* (60%), followed by *seb* (37.93%) and then *sec* (6.89%). There were found 18 milk samples (11.03%) with *S. aureus* carriers of the gene *mec A*, identifying the presence of MRSA. There was no correlation between the rates of identification of *S. aureus* and high CCS or CBT. The detection of *S. aureus* directly from milk, without the need for bacterial isolation, and characterization of its enterotoxic potential suggests the use of this PCR technique for epidemiological studies of staphylococcal infections. In addition, the *S. aureus* is one of the major causative pathogen of intramammary infections in the microregion of Sete Lagoas-MG and have a high potential enterotoxic. It is represents a potential risk to public health. It should be noted that the presence of MRSA highlights the selection of antibiotics resistant microorganisms, suggesting that the indiscriminate use of antibiotics in addition to compromising the quality of milk and milk products is a risk to human health.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, MRSA, PCR

1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento de alto valor nutricional considerado como importante fonte de proteína, energia, cálcio, fósforo e vitaminas. Segundo dados da produção pecuária do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2009), no primeiro trimestre de 2009, Minas Gerais foi o Estado com a maior produção de leite do país, com 26,8% do total produzido. Dentre as principais regiões produtoras de leite em Minas Gerais encontra-se a microrregião de Sete Lagoas.

A produção leiteira é afetada por diversos fatores relacionados ao manejo e às doenças. Na pecuária leiteira a mastite é a enfermidade de maior prevalência e economicamente a que mais causa prejuízos a esta atividade. Geralmente essa doença é de natureza infecciosa podendo ser causada por diferentes microorganismos e sua ocorrência é determinada pelas interações entre o hospedeiro, o ambiente e o agente infeccioso. O principal microorganismo envolvido nesta enfermidade é o *Staphylococcus aureus*, bactéria amplamente distribuída na natureza, sendo veiculada aos alimentos e ao gado leiteiro principalmente por portadores assintomáticos.

No homem o *S. aureus* está presente na superfície da pele, destacando a região das mãos, mucosa nasal, olhos, garganta, trato gastrointestinal, sendo comumente encontradas em feridas e infecções. Essas bactérias produzem várias enterotoxinas (SE) que são importantes causadoras de intoxicações de origem bacteriana no homem e animais, sendo consideradas como a principal causa de toxi-infecções alimentares no mundo. As enterotoxinas estafilocócicas são resistentes à hidrólise de enzimas do trato gastrointestinal e são termoestáveis, resistindo à pasteurização.

Sua presença no leite e derivados representa sério problema à saúde pública. Os sinais clínicos observados nessa intoxicação incluem náusea, vômito, diarreia, dores abdominais, cefaléia, entre outros. Não se sabe ao certo qual a dimensão desse problema na sociedade, devido à subnotificação dessa enfermidade, o que reforça a importância da inspeção e medidas de controle sanitário dos alimentos destinados ao consumo humano.

Devido à má utilização dos antimicrobianos disponíveis no mercado e a alta capacidade adaptativa dos *S. aureus*, houve uma seleção de resistência destes microorganismos a diversos antimicrobianos. Atualmente, amostras de *S. aureus* resistentes a metilicilina (MRSA) são reconhecidamente um dos principais problemas de infecção hospitalar, também com relatos de infecções em animais.

A produção de enterotoxinas por linhagens de *S. aureus* pode ser determinada por diversas técnicas, entre elas a Sensibilidade Ótima em Placa (OSP) e métodos imunoenzimáticos. A técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) detecta os genes envolvidos na produção de enterotoxinas estafilocócicas, podendo com isso avaliar o potencial enterotoxigênico das amostras isoladas, uma vez que a bactéria pode apresentar o gene, porém sem o expressar.

Mediante o risco de intoxicação alimentar pelas toxinas produzidas pelo *S. aureus* e a importância dessa enfermidade para a saúde pública, trabalhos que objetivam identificar o microorganismo e o seu potencial de produção de toxinas nos alimentos apresentam grande relevância, a fim de avaliar o risco de contaminação alimentar.

Devido à importância das toxinas na patogenicidade de *S. aureus* veiculados em alimentos como o leite e seus derivados e a

resistência dos *S. aureus* a antibióticos utilizados no tratamento de mamite, este trabalho objetivou identificar *S. aureus* utilizando a técnica de PCR, com extração de DNA realizada diretamente das amostras de leite, avaliação do potencial enterotoxigênico dos *S. aureus* pela identificação dos genes que codificam as enterotoxinas A, B e C, além do destaque para detecção de MRSA, no leite de tanques de expansão da microrregião de Sete Lagoas – MG.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Produção de leite

O leite é um dos alimentos mais completos que existem na natureza por conter proteínas de alto valor biológico, por sua riqueza em cálcio e fósforo e por conter notáveis quantidades de vitaminas A e B2, além de exercer uma influência reguladora sobre a flora bacteriana do trato intestinal (Luz, 2008).

A produção mundial de leite foi de 560,5 milhões de toneladas em 2007, sendo 66% desse volume produzido na Europa e na América. A expansão da produção tem registrado crescimento maior nos países em desenvolvimento, com destaque para os asiáticos e latino-americanos. Apesar de o

Brasil ser considerado o sexto produtor mundial com aproximadamente 26,1 bilhões de litros (EMBRAPA, 2009), o consumo *per capita* brasileiro estimado para 2010, segundo dado da FAO (2004), é de 129,72 litros não satisfazendo a exigência mínima de 180 litros por habitante ano, preconizada pela Organização Mundial de Saúde (Guimarães, 2006).

O Estado de Minas Gerais, maior produtor de leite do país (IBGE, 2009), possui 10 macrorregiões e 66 microrregiões. Dentre estas microrregiões, destaca-se a microrregião de Sete Lagoas (Fig.1) composta pelos municípios de Araçá, Baldim, Cachoeira da Prata, Caetanópolis, Capim Branco, Cordisburgo, Fortuna de Minas, Funilândia, Inhaúma, Jaboticatubas, Jequitibá, Maravilhas, Matozinhos, Papagaios, Paraopeba, Pequi, Prudente de Moraes, Santana de Pirapama, Santana do Riacho e Sete Lagoas. Essa é uma das principais regiões produtoras de leite do Brasil, sendo que em 2007 ocupou o trigésimo primeiro lugar nacional, com uma produção de 177 milhões de litros de leite.

O Quadro 1 registra, pela ordem, as microrregiões que produziram, em 2007, mais de 130 milhões de litros.

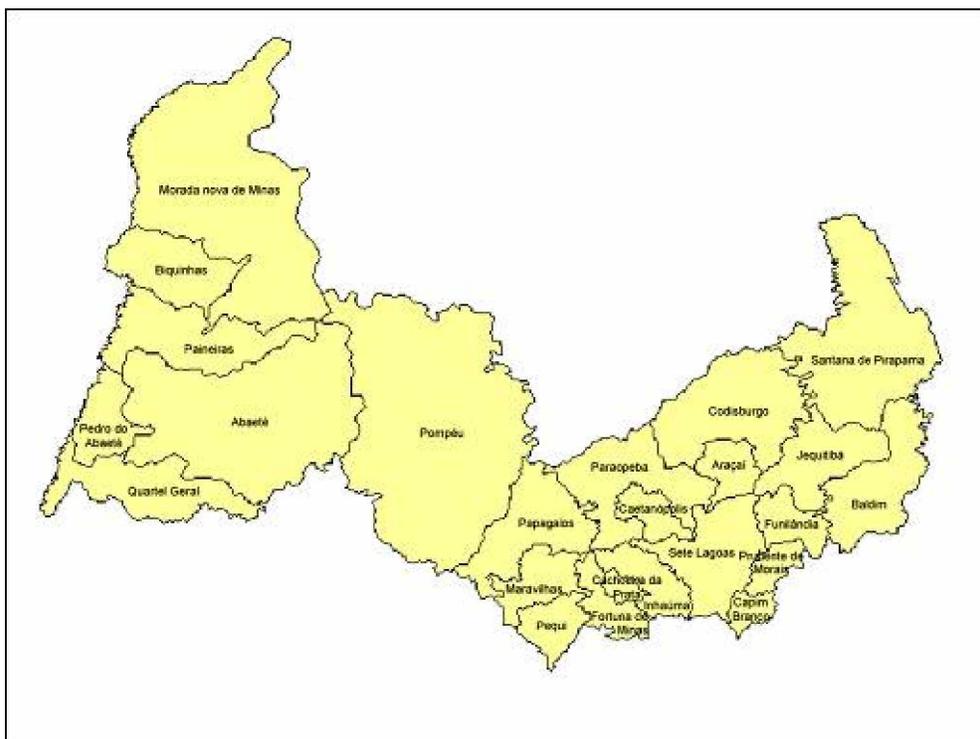


Figura 1 – Microrregião de Sete Lagoas- MG

Quadro 01: Principais Microrregiões produtoras de leite no Brasil.

	UF	Microrregião	Produção de Leite (milhões litros)					Produtividade (litros/vaca/ano)				
			2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007
1	SC	Chapecó	289	333	355	405	503	2.593	2.508	2.617	2.649	2.901
2	PR	Toledo	319	367	394	425	441	2.892	3.047	3.171	3.443	3.511
3	GO	Meia Ponte	360	372	373	361	392	1.137	1.159	1.114	1.147	1.158
4	RO	Ji-Paraná	327	370	389	347	376	762	760	762	764	787
5	SC	São Miguel d'Oeste	271	327	334	366	347	2.274	2.632	2.520	2.523	2.425
6	MG	Patos de Minas	297	312	326	320	328	2.012	2.000	2.051	1.975	1.982
7	MG	Frutal	344	330	339	320	327	1.031	1.031	1.036	1.026	1.039
8	RS	Passo Fundo	216	224	275	310	326	2.718	2.765	3.132	3.502	3.982
9	MG	Araxá	287	302	301	301	317	2.053	2.083	2.018	2.030	2.038
10	PR	Ponta Grossa	267	270	304	302	300	3.560	3.553	4.302	4.607	4.706
11	GO	Sudoeste de Goiás	300	295	291	285	297	1.468	1.453	1.461	1.462	1.472
12	MG	Patrocínio	226	235	245	270	287	2.037	2.127	2.208	2.383	2.494
13	MG	Uberlândia	214	214	223	258	271	1.399	1.354	1.388	1.363	1.334
14	PR	Francisco Beltrão	212	233	223	249	266	1.960	1.991	1.739	1.942	2.373
15	MG	Paracatu	220	228	238	233	264	1.396	1.373	1.387	1.396	1.441
16	MG	Passos	160	199	244	240	261	1.572	1.672	2.128	2.014	2.086
17	MG	Bom Despacho	253	272	280	282	256	2.564	2.542	2.323	2.328	2.289
18	RS	Lajeado – Estrela	150	173	172	191	217	2.363	2.607	2.514	2.635	2.756

continuação

	UF	Microrregião	Produção de Leite (milhões litros)					Produtividade (litros/vaca/ano)				
			2003	2004	2005	2006	2007	2003	2004	2005	2006	2007
19	PE	Vale do Ipanema	88	104	142	178	202	1.700	1.881	2.180	2.285	2.289
20	GO	Entorno de Brasília	180	198	210	208	200	987	1.039	1.087	1.104	1.097
21	MG	Três Marias	146	171	176	177	199	2.279	2.333	2.342	2.473	2.518
22	MG	Juiz de Fora	158	171	194	194	199	1.413	1.453	1.577	1.522	1.556
23	SC	Concórdia	148	163	169	203	195	2.292	2.379	2.375	2.327	2.325
24	SC	Xanxerê	102	112	135	154	191	2.680	2.698	2.988	3.093	3.490
25	RS	Três Passos	152	152	175	186	188	2.018	2.023	2.296	2.382	2.444
26	RS	Erechim	108	110	114	117	185	1.875	1.936	2.015	1.852	1.839
27	PR	Foz do Iguaçu	140	144	170	168	182	2.416	2.501	2.792	2.707	2.790
28	RS	Guaporé	131	139	142	147	178	2.875	2.962	3.008	3.024	3.346
29	GO	Anápolis	176	181	185	182	178	1.036	1.036	1.038	1.040	1.057
30	GO	Pires do Rio	105	113	177	179	177	1.288	1.321	1.386	1.393	1.404
31	MG	Sete Lagoas	151	163	180	181	177	2.281	2.377	2.467	2.476	2.456
33	GO	Porangatu	167	171	176	179	176	1.023	1.030	1.052	1.068	1.082
34	RS	Santa Rosa	141	163	175	186	173	2.273	2.232	2.439	2.509	2.593
35	GO	Ceres	210	211	204	178	168	1.040	1.043	1.014	1.006	1.006
36	MG	Divinópolis	150	157	156	163	162	2.038	2.126	2.107	2.144	2.161
37	PR	Cascavel	49	112	181	222	161	976	1.250	1.608	1.910	1.443
38	RS	Frederico Westphalen	99	99	108	120	160	1.803	1.829	1.891	1.699	1.677
39	MG	Piuí	136	139	145	148	157	1.884	1.940	1.777	1.787	1.961
40	PR	Pato Branco	81	123	136	144	155	2.417	2.704	2.833	2.855	3.051
41	MG	Cataguases	144	150	140	152	154	1.784	1.808	1.827	1.848	1.828
42	BA	Porto Seguro	141	140	144	148	154	609	610	620	610	629
43	MA	Imperatriz	86	126	145	161	153	726	842	850	890	861
44	GO	Catalão	131	138	139	139	152	1.215	1.248	1.253	1.257	1.370
45	MG	Varginha	133	140	132	143	149	1.654	1.585	1.719	1.703	1.685
46	PA	São Félix do Xingu	128	141	169	168	148	716	716	718	718	691
47	GO	Vale do Rio dos Bois	135	141	146	142	145	1.169	1.166	1.159	1.158	1.174
48	RS	Ijuí	114	114	135	139	144	2.787	1.577	1.697	1.974	2.646
49	SE	Sergipana do Sertão de São Francisco	58	70	98	140	144	1.439	1.577	1.697	1.974	1.961
50	PE	Vale do Ipojuca	66	66	128	140	142	979	989	1.584	1.632	1.665
51	MG	Uberaba	106	115	145	141	141	1.807	1.808	1.879	1.632	1.879
52	GO	Goiânia	142	140	147	145	141	1.219	1.206	1.241	1.231	1.221
53	GO	Quirinópolis	180	132	131	143	139	1.552	1.535	1.549	1.557	1.555
54	MG	Curvelo	139	167	168	167	139	1.125	1.275	1.268	1.249	1.058
55	MG	Governador Valadares	113	119	128	120	134	973	965	972	967	935
56	MG	Unai	100	110	107	112	133	1.529	1.790	1.769	1.767	2.042
57	MG	São Sebastião do Paraíso	104	104	99	135	133	1.563	1.542	1.538	1.609	1.579

Fonte: IBGE (2009) – Pesquisa da Pecuária Municipal. Elaboração: R.ZOCCAL - Embrapa Gado de Leite Ordenação por produção de leite em 2007.

2.2 – Qualidade do leite

A perda de qualidade do leite assume destacada importância no que se refere à saúde pública. No Brasil, embora não exista estatística disponível sobre o assunto, são frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos com leite contaminado com microrganismos patogênicos. Contribui para isto, entre outras causas, o fato de mais de 44% do leite consumido no país ser proveniente do mercado informal, ou seja, comercializado sem qualquer tratamento térmico ou controle laboratorial (Fagundes e Oliveira, 2004).

As condições sanitárias dos rebanhos, a qualidade do leite, o transporte e a temperatura de conservação do leite podem explicar a variabilidade dos percentuais de amostras impróprias ao consumo humano. (Brant *et al.*, 2007).

Contagens bacterianas totais (CBT) e de células somáticas (CCS) são métodos de referência e comumente são utilizados na avaliação da qualidade do leite cru. A contagem individual de células somáticas (CCSI) é um recurso laboratorial comumente empregado para o diagnóstico da mamite subclínica, enquanto a contagem de células somáticas do leite do tanque (CCSLT) é um parâmetro utilizado para estimar o índice de mamite subclínica presente no rebanho e as perdas de produção (Ruegg e Reineman, 2002; Silveira Filho, 2007; Costa, 2008). Segundo Harmon (1994), existe alta correlação entre a CCSLT, índices de mamite subclínica e diminuição de produção de leite pelo rebanho. De acordo com Cassoli e Machado (2007), CCSIs entre 100.000 e 200.000 cél/mL são consideradas normais, enquanto que escores superiores a 200.000

cél/mL constituem um forte indício da mamite subclínica.

A CBT é um índice que está diretamente associado à higiene da ordenha e ao resfriamento 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 sujeira encontrada nos tetos e úbere é considerada a principal fonte de bactérias do ambiente para a glândula mamária, podendo causar mamite e, para o leite, podendo causar aumento da CBT (Galton *et al.*, 1982).

Costa (2008) correlacionou positivamente CCSLTs com as taxas de isolamento de *S. agalactiae* e de *S. uberis*. Porém, contrariamente ao relatado pela literatura, não observou correlação entre CCSLT e as taxas de isolamento de *S. aureus*. Este mesmo autor constatou que quando se verificam aumentos nos índices de mamite clínica ou subclínica, verifica-se aumento também na CCSLT.

Altas CCSTs são indicativas de índices elevados de mamite subclínica no rebanho o que traz reflexos diretos na qualidade do leite e na produtividade do rebanho (Santos e Fonseca, 2007). Rebanhos que apresentavam os maiores índices de mamite subclínica, sobretudo com o envolvimento de *S. aureus* e *S. agalactiae* foram também aqueles apresentaram os maiores escores de CCST. Cinco propriedades, que tinham *S. agalactiae* como agente principal, foram as que apresentaram os escores mais elevados de CCST no leite (1.702 a 3.181×10^3 cel./mL), o que demonstra a importância deste microrganismo no aumento da CCST em relação aos demais patógenos contagiosos, conforme relatado por Zafalon *et al.* (1999) e por Costa *et al.* (2005).

Pinheiro de Sá *et al* (2004) verificaram correlação entre a produção de enterotoxinas e a resposta celular verificada pela CCS, revelando que nos casos de detecção de enterotoxinas, as amostras eram provenientes de quartos mamários com CCS superior a 1000×10^3 células por mL de leite, o que pode sugerir possível fator de virulência para este agente.

O mercado interno e externo está muito mais exigente e observador. Considerando não somente o ganho financeiro adquirido com a produção de leite de alto padrão, a melhoria na qualidade deste produto reflete a maior eficiência da produção nas propriedades rurais e eleva o rendimento dos produtos lácteos na indústria. Conseqüentemente, esta eficiência beneficia o negócio destas empresas e da cadeia de leite como um todo. A legislação em vigor, Instrução Normativa Nº 51 de Setembro de 2002 (Brasil, 2002), desde julho de 2008, estabelece 750.000 cél./mL como limite máximo de CCSLT para o leite produzido atualmente nas regiões sul, sudeste e centro oeste do Brasil, e para 400.000 cél./mL em 2012.

2.3 – Mamite bovina

A mamite bovina constitui-se em um dos problemas sanitários mais importantes na pecuária leiteira nacional, embora doenças infecciosas de grande importância econômica, como a brucelose e tuberculose ainda sejam endêmicas no rebanho brasileiro. Tal fato gera uma demanda, por parte de toda cadeia produtiva do leite, por alternativas que venham minorar os prejuízos relacionados com ocorrência dessa doença que, além de depreciar a qualidade do leite, diminui a rentabilidade do empreendimento pela queda de produção que se verifica nos rebanhos endemicamente acometidos (Costa, 2008). O ônus determinado pela doença se justifica

pela redução na produção de leite dos animais acometidos, gastos com medicamentos, descarte de leite de animais em tratamento, reposição precoce de vacas e, eventualmente, a morte de animais. Além desses aspectos, verificam-se alterações nas características físico-químicas do leite, tais como a redução dos teores de gordura e caseína e o aumento da contagem de células somáticas, ocasionando baixo rendimento industrial, além de depreciação no valor nutricional e das características sensoriais do produto (Santos, *et al.* 2005). Dessa forma, pode-se considerar que mamite é a doença infecciosa mais comum que afeta as vacas leiteiras e a que proporciona as maiores perdas econômicas para o setor leiteiro, tanto por sua alta frequência, quanto pelos aspectos econômicos a ela relacionados (Silva, 2003; Silva e Silva, 2005).

O *S. aureus* destaca-se como um dos microrganismos mais frequentemente associados às infecções intramamárias de bovinos em todos os continentes e o agente que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária leiteira (Vasudevan *et al.*, 2003; Costa 2008). Diversos autores relataram que a mamite clínica e subclínica de causa estafilocócica é de considerável relevância, especialmente a subclínica, onde este agente representa cerca de 20% a 40% dos isolamentos. (Langoni *et al.* 1991; Fitzgerald *et al.*, 1997; Langoni *et al.*, 1998; Pinheiro de Sá *et al.*, 2004).

No Brasil, *S. aureus* é considerado o principal agente causal da mamite bovina, com taxas de isolamento variáveis entre 8,3% e 49,23% (Costa *et al.*, 1995; Donatele *et al.*, 2002, Costa, 2008). Outros autores relatam resultados variáveis entre 9,1% e 85% em diferentes regiões e estados e entre diferentes países (Langenegger *et al.*, 1986; Costa, 1986; Vianni e Nader, 1989; Trinidad *et al.*, 1990; Langoni *et al.* 1991; Wilson *et al.*,

1997). Dessa forma pode-se considerar que em diversas regiões do Brasil a mamite contagiosa é a mais freqüente, tendo como agentes principais *S. aureus*, *Streptococcus* spp. (3-60 %), *Corynebacterium bovis* (1,3-30 %) e *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN) (16-25 %) (Silva *et al.*, 1983; Nader Filho *et al.*, 1984; Costa *et al.*, 1995; Brito *et al.*, 1999; Laffranchi *et al.*, 2001; Costa 2008).

Estima-se que, anualmente, as perdas mundiais devido à mamite aproximam-se de 35 bilhões de dólares. Nos Estados Unidos, o custo anual da mamite tem sido estimado em 1,5 a 2,0 bilhões de dólares, enquanto que as perdas de produção de leite, devido à mamite subclínica, e custos de reposição associados à alta contagem de células somáticas (CCS) foram estimados em 960 milhões de dólares (Silva, 2008).

Estudo realizado por Costa (2008) em 35 rebanhos leiteiros da região sul de Minas Gerais, verificou elevados índices de mamite e de contagens de células somáticas, sendo predominantes os agentes contagiosos representados principalmente por *Staphylococcus* coagulase positivos (34,29 %) e *Streptococcus agalactiae* (21,82%). Patógenos ambientais representaram (18,35%) dos isolamentos. O mesmo autor identificou a existência de uma grande diversidade de *S. aureus* na população estudada e a existência de tipos clonais predominantes entre os rebanhos, que respondem pela maioria das infecções.

2.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (do grego “*staphyle*” = cacho de uvas, e “*cocos*” = grão) foi descrito pela primeira vez em 1880, em pus de abscesso cirúrgico por um médico escocês Alexandre Ogston, sendo um dos microrganismos mais comuns nas infecções piogênicas em todo o mundo (Santos e

Fonseca 2007). O nome desta espécie deriva da coloração de suas colônias que passaram a ser estudadas e isoladas por Rosembach (Silveira Filho, 2007), que nomeou inicialmente *S. pyogenes aureus*, para as colônias amareladas e *S. pyogenes albus*, para as brancas. Entretanto, já é sabido que a pigmentação da colônia é bastante variável (Judicial Commission, 1958).

O gênero *Staphylococcus* apresenta-se morfológicamente na forma de cocos Gram positivos, isolados ou agrupados em cachos, pares ou tétrades, são coagulase positiva, sendo um patógeno oportunista (Santana *et al.*, 2006), anaeróbios facultativos, não esporulados, imóveis e produtores usuais de catalase (Kloss e Lambe, 1991). O *S. aureus* apresenta temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 48,5 °C (com temperatura ótima de 35 a 37 °C) (Frazier e Westhoff, 2000). Esta bactéria pode crescer em pH de 4,0 a 9,8, sendo o pH ótimo para crescimento, compreendido entre 6,0 e 7,0 (Luz, 2008). Estas características possibilitam que o *S. aureus* cresça numa grande variedade de alimentos.

Estas bactérias são oxidase-negativa, fermentam glicose em anaerobiose, possuem ácido teicóico como constituinte de sua parede celular e DNA com conteúdo bastante reduzido de GC (30 % a 39 %) (Luz, 2008). A parede celular dos estafilococos é resistente a lisozima e sensível a lisostafina, que cliva especificamente as pontes cruzadas de peptidoglicano com pentaglicina. Os estafilococos são facilmente destruídos por tratamentos térmicos, como a pasteurização, mas suas enterotoxinas (SE) são termoestáveis e permanecem ativas nos alimentos tornando-se um risco em potencial para a saúde do consumidor e um problema para a saúde pública (Carmo, 2001).

O habitat primário de *S. aureus* em humanos é a mucosa da nasofaringe onde a bactéria existe como um membro persistente ou transitório da microbiota normal sem causar quaisquer sintomas (Fueyo *et al.*, 2005). Portadores assintomáticos constituem-se a principal fonte de infecção por *S. aureus*, podendo causar doenças adquiridas tanto no ambiente hospitalar como na comunidade (Fueyo *et al.*, 2005).

2.5- Intoxicação alimentar e Enterotoxinas

A contaminação microbiológica dos alimentos tem sido objeto de preocupação constante em diversos países. Estima-se que nos Estados Unidos ocorram cerca de 6,5 milhões de casos de infecções e 9.000 óbitos em consequência das enfermidades transmitidas por alimentos a cada ano. Já no Brasil, de acordo com o Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), entre 1999 e 2002 (BRASIL, 2005), ocorreram 25.281 óbitos por Doenças Transmitidas por Alimentos, com uma média de 6.320 óbitos/ano, porém sem especificar as toxinas, os microrganismos ou as fontes envolvidas (Almeida *et al.* 2008). Estes dados, possivelmente subestimados devido à falta de notificação dos surtos, demonstram a relevância das medidas de controle sanitário dos alimentos destinados ao consumo humano, particularmente das matérias primas de origem animal.

O *S. aureus* é ubíquo na natureza, sendo os humanos e os animais seus reservatórios primários. Esse microorganismo é um dos mais frequentes agentes etiológicos da mamite e, dessa forma, o leite e produtos lácteos são considerados veículos comuns deste microorganismo (Silva, 2004). Este fato, aliado ao elevado índice de amostras enterotoxigênicas, deve merecer especial atenção dos órgãos oficiais de inspeção e de

vigilância sanitária, uma vez que pode representar sério risco potencial para a saúde pública (Lamaita *et al.*, 2005). Programas de estudos epidemiológicos sobre toxinfecção alimentar são essenciais para a melhoria na saúde coletiva em todo mundo (Veras, 2004).

A presença das amostras toxigênicas de *S. aureus* no leite não implica, necessariamente na ocorrência de intoxicações em seres humanos, porém o risco existe e é maior para crianças. A percepção de risco é aumentada, principalmente, ao se considerar que esse microorganismo é o mais envolvido nas infecções intramamárias de rebanhos leiteiros, com prevalência de amostras com elevado potencial toxigênico (Sá *et al.*, 2004).

Enterotoxinas estafilocócicas (SE) são os principais agentes de intoxicação de origem bacteriana no homem e são caracterizadas por náusea, vômito, diarreia, dor de cabeça, cólica abdominal, câibra muscular, queda de pressão sangüínea e prostração (Lamaita *et al.*, 2005). O período de incubação da intoxicação estafilocócica é curto, variando de 15 minutos a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado (Carmo, 2001). Os sintomas variam de acordo com a susceptibilidade individual, sendo mais graves em recém-nascidos, idosos e pessoas acometidas de doenças crônicas imunossupressoras. O restabelecimento ocorre geralmente em período de um a dois dias (Bergdoll, 1989). Uma mesma amostra de *S. aureus* pode produzir mais de um tipo de toxina, que em quantidades inferiores a 1µg podem desencadear os sintomas de intoxicação (Nader Filho *et al.*, 2007).

As SE pertencem à família dos superantígenos, cujas principais características são a pirogenicidade, a antigenicidade e a capacidade de aumentar a sensibilidade celular à endotoxinas (Silva,

2004). As SE são consideradas superantígenos, por estimularem uma resposta policlonal inespecífica de células T e a liberação aumentada de citocinas, causando toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune adaptativa, os quais prolongam a infecção bacteriana. Os superantígenos ligam-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 a peptídeos, formando um complexo trimolecular, que induz a proliferação demasiada de células (Andrade, 2008).

As SE possuem uma estrutura compacta, o que conferem resistência a enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, renina e papaína (Bergdoll, 1989) resistindo dessa forma à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais mantendo sua atividade no trato digestivo após ingestão (Luz, 2008). Entre outras propriedades, as enterotoxinas são estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos, não sendo inativadas totalmente pela pasteurização e outros tratamentos térmicos usuais (Bergdoll, 1989).

Muitos isolados de *S. aureus* produzem quantidades detectáveis de enterotoxinas após 24 horas de incubação a 30 °C (Luz, 2008); condições especiais como temperatura e pH são as mais necessárias para a síntese de enterotoxinas (Veras, 2004). Segundo Bergoll, (1989) a temperatura ótima de produção de enterotoxinas é a 37 °C, podendo ocorrer também em temperaturas entre 25°C e 30 °C. Segundo o mesmo autor, quanto menor a temperatura maior o tempo necessário para produção das enterotoxinas; sob condições de anaerobiose são dependentes de fatores como o pH (5,15 a 9,0; pH ótimo 6,5 a 7,5).

Atualmente, são conhecidos 18 tipos de enterotoxinas estafilocócicas classificados com base em suas diferenças sorológicas em SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU (Cunha, 2007).

A detecção de enterotoxinas estafilocócicas realizada no sobrenadante de culturas pelos métodos clássicos de imunodifusão, aglutinação e ELISA é demorada, e nem sempre detecta concentrações baixas de toxinas. Comercialmente estão disponíveis apenas kit/antisoros para SEA, SEB, SEC, SED e SEE (Cremonesi *et al.*, 2005).

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem se revelado uma alternativa rápida, sensível e específica na identificação de patógenos e seus genes de enterotoxinas (Rosec e Guiraud, 2002).

Os genes que codificam as enterotoxinas já foram estudados, e suas denominações iniciam com as letras *se* (Freitas *et al.*, 2004). Os genes que codificam *sed* e *sej* são carregados por plasmídios – as que codificam *sea* e *see* por fagos e por cromossomo: *seb*, *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep* e *seq* (Andrade, 2008).

O gene *sea* que codifica a SEA é composto de 771pb e codifica uma proteína de 27,1 KDa (Betley e Mekalanos, 1988). A detecção do gene *sea* em isolados de *S. aureus* é importante, pois a SEA é tóxica mesmo em baixas concentrações (Evenson *et al.*, 1988), sendo a enterotoxina mais envolvida em intoxicações alimentares seguida por SED e SEB (Balaban e Rasooly, 2000).

O gene *seb* consiste de 798 nucleotídeos e codifica uma proteína de 31,4 KDa (Johns Jr e Khan, 1988). O gene *seb* é cromossomal em isolados clínicos de *S. aureus* envolvidos em

intoxicação alimentar, embora seja carregado por um plasmídeo em outros isolados bacterianos (Shafer e Iandolo, 1978).

A enterotoxina SEC é heterogênea e contém algumas variantes, designadas SEC1, SEC2, SEC3, SEC bovina e SEC ovina. Estas foram classificadas com base nas diferenças antigênicas e no hospedeiro animal com o qual elas estão associadas. O gene *sec1* contém 801 pb e codifica uma proteína de 27,4 KDa (Bohach e Schlievert, 1987), o gene *sec2* contém 801 pb e codifica uma proteína de 26 KDa (Bohach e Schlievert, 1989) e o gene *sec3* contém 798 pb e codifica uma proteína de 27,4 KDa (Couch e Betley, 1989). SEC2 e SEC3 são os subtipos de SECs mais frequentes em surtos de intoxicação alimentar (Chen *et al.*, 2001). SEC é a enterotoxina mais comumente associada com produção leiteira bovina, ovina e caprina (Hirooka *et al.*, 1988).

Cardoso *et al.* (1999) caracterizaram a produção da toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e de enterotoxinas estafilocócicas (SE) A, B, C e D em 127 amostras de *S. aureus*, isoladas de amostras de leite proveniente de vacas com mamite no Estado de Minas Gerais. Das 127 amostras testadas, 60 (47 %) eram produtoras de TSST-1 e 54 (43 %) produtoras de SE, 38 amostras produziram SED (30 %), 24 SEB (19%), 8 SEC (6 %) e 4 SEA (3 %). Esta foi a primeira descrição da presença de TSST-1 em isolados de glândula mamária de bovinos no Brasil. Para verificação da produção de toxinas foi utilizada a técnica de sensibilidade ótima em placa-OSP- (Robbins *et al.*, 1974).

Silva (2004) identificou maior presença dos genes *sea* e *seb* em amostras de leite bovino, utilizando 100 amostras de *S. aureus* isoladas de leite de cabra (n=36) e de vaca (n=64). Esses isolados bovinos eram pertencentes a

rebanhos localizados em 23 municípios do estado de Minas Gerais. Foi realizado PCR multiplex com os iniciadores FEM A, SEA, SEB E SEC e observou que 64 amostras isoladas de mamite bovina, quatro (6,3%) co-amplificaram os genes *sea* e *seb* e 2 (3,1 %) amplificaram o gene *sec*.

Veras (2004) observou em 30 amostras de *S. aureus* provenientes de leite e derivados envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar ocorridos no período de 1998 a 2002, em Minas Gerais, uma maior porcentagem de amplificação para o gene de SEA (26,6 %) seguida de SEB (20 %) e posteriormente SEC (3,33 %). Na associação de SEA +SEB encontrou-se uma porcentagem de 16,6 %.

Nader Filho *et al.* (2007) identificaram a maior presença do gene *sea*, *e seb* seguida do gene *sec* e o predomínio de SEA, SEB em relação a SEC pesquisadas em 72 amostras de *S. aureus* isoladas no leite de vacas com sinais de mamite ou que apresentavam positividade no California Mastitis Test, em 10 propriedades rurais do Estado de São Paulo.

Luz (2008) utilizou de 94 isolados de *S. aureus* de amostras de leite provenientes de vacas com mamite e queijo coalho em propriedades de exploração leiteira de cinco municípios da região de Pernambuco, Brasil (São Bento do Una, Angelim, Caetés, Correntes e Gravatá) e nenhum dos avaliados pela PCR-Multiplex possuía os genes *sea*, *seb* e *sec*, havendo apenas a amplificação dos segmentos de tamanho esperado nas amostras de referência (FRI) usadas como controle positivo. Em contrapartida 88/94 (93,6%) identificaram os genes responsáveis pela produção das enterotoxinas SEG, SEH, SEI e SEJ, dos quais 31/88 (35,2%) amplificaram apenas para um gene, 33/88 (37,5%)

amplificaram para dois genes, 17/88 (19,3%) amplificaram para três genes e 7/88 (8%) amplificaram para os quatro genes, permitindo classificar os fragmentos de tamanho esperado dentro de 10 grupos genotípicos para a presença dos genes toxigênicos, dessa forma não detectando a presença dos genes das enterotoxinas clássicas.

2.6 *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Nas últimas décadas, tem-se observado a emergência de microrganismos resistentes aos antibióticos, dentre os quais se destaca *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Essas linhagens não são comumente relatadas em animais, entretanto, nos últimos anos, há registros de aumento de casos de infecções em animais domésticos (Rich *et al.*, 2005; Middleton *et al.*, 2005), sugerindo que as infecções mamárias por MRSA, em bovinos leiteiros, podem ser consideradas sério problema no campo (Lee *et al.*, 2004).

Na década de 1940, a grande maioria dos *S. aureus* era sensível à penicilina. A partir de 1950, quando os antibióticos passaram a ser amplamente utilizados, iniciou-se o fenômeno de resistência bacteriana a praticamente todos os antibióticos de uso parenteral, incluindo a eritromicina e a tetraciclina (Chambers 1988). A introdução das penicilinas resistentes a penicilinases, na década de 1960, possibilitou um avanço na terapêutica antiestafilocócica. Com o uso indiscriminado das penicilinas semi-sintéticas, como a meticilina empregada no tratamento de infecções estafilocócicas, surgiram amostras resistentes a este antibiótico, denominadas de MRSA, cujo padrão de resistência se estende aos outros antibióticos beta-lactâmicos (Voss *et al.*, 1994). MRSA foi primeiramente reportado

em 1961 no Reino Unido e, em meados dos anos 70, tornou-se endêmico em muitos países sendo a principal causa de infecções hospitalares no mundo. A vancomicina era o único antibiótico efetivo contra os mesmos, mas, em 1997, foram descritas amostras de *S. aureus* com resistência à vancomicina e à teicoplanina. Tais estafilococos receberam a sigla VISA (*Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina) e atualmente são denominados simplesmente de VRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes a Vancomicina) (Boyle-Vavra *et al.*, 2001). Inicialmente, as infecções constituíam-se primariamente, num problema hospitalar, recentemente, elas têm se estabelecido em comunidades sem risco identificável (Lee, 2003).

Em animais o isolamento de MRSA foi primeiramente reportado por Devriese *et al.* (1972) a partir de leite de vacas com mamite. A sensibilidade de *S. aureus* aos diferentes antibióticos empregados no tratamento das doenças animais é de grande importância para o médico veterinário, pois visa fornecer subsídios para a terapia do animal acometido, bem como para todos os animais do rebanho submetidos às mesmas condições de manejo e, portanto, sob os mesmos riscos de infecção. Por todo o mundo, o aumento de prevalência de *S. aureus* multi-resistentes causadores de mamite bovina é grave, com a redução da efetividade dos antimicrobianos e o aumento da morbidade e dos custos para combater essa doença. Existe heterogeneidade genética considerável em populações naturais de *S. aureus* (Zafalon *et al.*, 2008).

As mamites causadas por *S. aureus* apresentam na atualidade uma baixa resposta à antibioticoterapia, por isso há uma variedade de estudos no esforço de determinar quais são os fatores responsáveis

por falhas na terapia, de modo que no futuro os tratamentos sejam mais efetivos (Reis *et al.*, 2003; Costa, 2008).

Em Minas Gerais, Cardoso *et al.* (2000), no período de 1994 a 1997, isolaram e submeteram ao antibiograma 127 *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%). As drogas menos efetivas foram Polimixina B, ampicilina e penicilina G de acordo com os testes *in vitro*, com os percentuais de sensibilidade de respectivamente 8,7%, 28,6% e 29,1%. Resultado semelhante foi obtido por Donatele *et al.* (2002) em que foi avaliado o perfil de resistência aos antimicrobianos de 180 amostras de *S. aureus* isolados de mamite subclínica em rebanhos do estado do Rio de Janeiro, verificando elevados índices de resistência para os antibióticos β -lactâmicos (82,9%) e tetraciclina (24,4%).

No que se refere à resistência antibiótica de amostras de *S. aureus* envolvidas na etiologia da mamite bovina em rebanhos brasileiros, nota-se uma grande variação quanto à eficiência das diferentes drogas analisadas. No entanto, algumas tendências são percebidas, como susceptibilidade da maioria dos isolados de *S. aureus* à gentamicina, cefalosporinas e ao cloranfenicol, e a resistência à penicilina e ampicilina (Costa, 2008).

Segundo Rajala-Schultz *et al.* (2004), as bactérias resistentes que são encontradas em animais produtores de alimentos, podem contaminar os produtos alimentícios e serem transferidas para humanos através da cadeia alimentar. No trato gastrointestinal elas podem transferir genes que conferem a

resistência antimicrobiana a outras bactérias da própria espécie ou de espécies não relacionadas, patogênicas ou não (Luz, 2008).

Foram registrados isolamentos de *Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina no Rio de Janeiro, em São Paulo e Porto Alegre e de estafilococos coagulase negativos resistentes à vancomicina e à teicoplanina em São Paulo (Oliveira, 2002).

Os MRSA associados às infecções comunitárias (CA-MRSA) emergiram recentemente como um novo patógeno. Tradicionalmente, os MRSA eram reconhecidos como importantes patógenos hospitalares (HA-MRSA, do inglês: hospital-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*). Entretanto, recentemente, infecções comunitárias por MRSA em pacientes que não apresentam riscos clássicos para infecções nosocomiais (CA-MRSA sem risco) têm sido relatadas nos Estados Unidos, Taiwan, Nova Zelândia, Austrália e em diversos países da Europa. Amostras de CA-MRSA podem não ter nenhuma relação com serviços de saúde e afetar pacientes saudáveis da comunidade que não apresentam os riscos nosocomiais clássicos. Desta forma, estudos sobre a epidemiologia e as características fenotípicas e genotípicas das amostras de MRSA envolvidas em infecções comunitárias sem risco são necessárias (Ribeiro, 2005).

Amostras de CA-MRSA sem risco causam, com muita frequência, infecções envolvendo a pele e tecidos moles, como celulite e abscessos. Há relatos de casos fatais de pneumonia em adultos jovens e, aparentemente, sem riscos para infecções nosocomiais por MRSA (Van der Flier *et al.*, 2003).

MRSA são frequentemente resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas (Lee *et al.*, 2004).

A resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* pode ser codificada cromossomicamente ou mediada por plasmídios. *S. aureus* possui três mecanismos distintos de resistência à meticilina: a) hiperprodução de beta-lactamases; b) presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP *protein binding penicilin*) alterada denominada PBP 2a; c) modificações na capacidade de ligação das PBPs (Tomasz *et al.*, 1989). De Lencastre *et al.* (1991) sugerem que os três mecanismos podem estar presentes numa mesma amostra, inclusive interagindo entre si.

S. aureus possui cinco PBPs. As PBPs são enzimas que catalisam a etapa terminal da síntese da parede bacteriana e se localizam na membrana celular da bactéria. As PBP 1, 2 e 3 são essenciais e têm alta afinidade (sítios-alvo) com os antibióticos beta-lactâmicos, unindo-se a esses por ligações covalentes. A resistência à meticilina em estafilococos é devida à produção de uma PBP adicional, anômala, denominada PBP 2a, que apresenta baixa afinidade com os antibióticos beta-lactâmicos. Esta proteína alterada é codificada por um gene cromossômico denominado *mec A*, que é responsável pela resistência intrínseca dos MRSA a todos os antibióticos beta-lactâmicos (Santos, 2005).

A detecção de resistência dos *S. aureus* à meticilina, entre outros antibióticos, pode ser realizada por métodos tradicionais, como a difusão em disco, ou pelo uso de equipamentos automatizados que forneçam o valor da concentração inibitória mínima (CIM) (Donatele *et al.* 2002).

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos para amostras de *S. aureus* é realizado em placas de Petri contendo Agar Mueller-Hinton (MH) acrescido de 2% de cloreto de sódio, após incubação a 37° C durante 24 horas. A suscetibilidade é verificada com a utilização de antimicrobianos ativos sobre estes germes e sua escolha depende do sítio da infecção por eles causada. A leitura é realizada medindo-se os diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos discos e a interpretação feita de acordo com a tabela de halos padronizada pelo NCCLS (NCCLS, 2000). Em geral, o resultado é assim expresso: sensível, moderadamente resistente (intermediário) e resistente. No antibiograma, é possível relacionar o diâmetro do halo de inibição e a CIM (Murray *et al.*, 2000).

Uma nova técnica está disponível para detecção da suscetibilidade antimicrobiana bastante prática, rápida e que não requer equipamentos. Este recurso consiste em uma fita estreita de material plástico contendo concentrações crescentes de antibiótico, que é colocada em placas de Petri contendo Agar Mueller-Hinton de maneira semelhante ao teste de difusão em disco. A fita de E-test é utilizada na mesma temperatura aplicada aos testes de difusão em discos e sua principal vantagem é fornecer o valor da CIM diretamente (NCCLS, 2003). A utilização do antibiograma pela automação é também muito freqüente, porém necessita de uma observação clínica mais particularizada quanto ao emprego das drogas, cuja seleção requer o conhecimento da ação farmacocinética dos antimicrobianos.

Alguns genes, denominados genes auxiliares ou fatores essenciais gene *fem* (*factor essential for methicilin resistance*), auxiliam o gene *mec A* a expressar um alto nível de resistência aos beta-lactâmicos. Foram identificados muitos desses genes *fem*,

denominados *fem A*, *fem B*, *fem C*, *fem D*, *fem E* e *fem F* (Vannuffeld *et al.*, 1995). O gene *fem A* é essencial para a expressão da resistência dos MRSA e parece ser uma característica peculiar de *S. aureus*, não sendo encontrado em outras espécies de estafilococos. Os genes *fem A* e *mec A* têm sido detectados em amostras de MRSA por meio de técnicas moleculares como a reação de polimerase em cadeia (PCR). Esta técnica apresenta vantagens em relação às demais, pois oferece elevada eficácia e segurança, além de ser um método rápido e sensível (Oliveira *et al.*, 2002). É possível com a PCR em aproximadamente 18 horas identificar MRSA (Louie *et al.*, 2002).

2.7. PCR no diagnóstico molecular

Com a finalidade de se obter técnicas acuradas, rápidas e específicas para o diagnóstico da mamite bovina, métodos moleculares, como a PCR são úteis no diagnóstico microbiológico (Zschöck *et al.*, 2005). A PCR apresenta vantagens em comparação aos métodos tradicionais de diagnóstico: é altamente sensível, específica e rápida. Para se produzir um diagnóstico positivo são necessárias poucas células e estas não precisam estar viáveis, dessa forma, amostras que são inadequadamente preservadas podem ser utilizadas (Phuerktes *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2001). A técnica de PCR pode ser utilizada com grande eficiência para detecção do gene da coagulase (*coa*) e na detecção do gene *fem A* em identificação de *S. aureus* (Veras, 2004).

A amplificação do gene que codifica a proteína coagulase (*coa*) tem sido relatada por diversos pesquisadores como método simples e acurado para identificar e discriminar *S. aureus*. O seqüenciamento desse gene da coagulase ou de sua porção 3' terminal tem sido um recurso utilizado para o estudo

comparativo e de filogenia entre isolados de *S. aureus* (Costa, 2008). A extremidade 3' desse gene possui uma região polimórfica constituída por unidades repetidas de 81 pb, as quais diferem entre os isolados em número e localização de sítios para a enzima AluII sendo essa característica utilizada para tipagem de *S. aureus* (Silva, 2004).

No Brasil, foram realizados alguns estudos de diversidade populacional empregando a técnica de polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), aplicada ao gene da coagulase. Silva e Silva (2005) aplicaram a técnica de RPLP no estudo comparativo entre 64 *S. aureus* isolados de bovinos leiteiros do estado de Minas Gerais e verificaram a ocorrência de 27 padrões de produtos de PCR e de 49 tipos eletroforéticos na RFLP, demonstrando uma grande diversidade populacional entre as amostras estudadas.

A aplicação de técnicas de biologia molecular, aliada às técnicas convencionais de bacteriologia, tem possibilitado novas abordagens na epidemiologia da mamite bovina. Por meio destes testes, tem sido demonstrado que os clones associados aos casos de mamite bovina, embora não estritamente espécie-específicos, são característicos da espécie e que infecções intercruzadas, embora ocorram, não se revestem de maior importância epidemiológica. Os testes apontam ainda a ocorrência de uma grande diversidade populacional de *S. aureus*, com a existência de clones predominantes que são comuns entre rebanhos (Costa, 2008).

Vários métodos de PCR multiplex, que amplificam simultaneamente mais de um gene na mesma reação, têm sido descritos na literatura para detecção de *S. aureus* enterotoxigênicos em leite e queijos, mas frequentemente estes métodos não são

reprodutíveis, sendo necessário que cada laboratório padronize suas reações (Cremonesi *et al.*, 2005).

Silva (2004) obteve uma relação de 100% de concordância entre a detecção do gene por PCR e a detecção da toxina correspondente pelos testes fenotípicos, demonstrando dessa forma que a PCR pode ser utilizada para caracterizar e identificar tipos enterotoxigênicos de *S. aureus* isolados de mamite.

Luz (2008) avaliou a expressão potencial dos genes produtores de enterotoxinas através da RT-PCR e constatou que risco de intoxicação alimentar por *S. aureus* pode ser avaliado com base na expressão do RNAm correspondente. No entanto, apenas a detecção dos genes toxigênicos em *S. aureus* não implica que estes isolados produzam SEs em nível suficiente para causar quadros de intoxicação alimentar ou outras doenças associadas às enterotoxinas (Chiang *et al.*, 2008).

Na rotina microbiológica, o diagnóstico para a espécie *S. aureus* resistente a meticilina são baseados nas características fenotípicas. No entanto, não é um teste fidedigno, pois muitas bactérias resistentes a meticilina podem ser inicialmente susceptíveis a essa droga. A detecção do gene *mec A* é considerada padrão ouro para o diagnóstico dessa espécie (Lee *et al.*, 2004).

A detecção direta de patógenos bacterianos em amostras lácteas é um trabalho difícil devido à presença de substâncias inibidoras da PCR (Ramesh *et al.*, 2005; Cremonesi *et*

al., 2005). Ramesh *et al.* (2005) conseguiram um limite de detecção de 10^3 UFC/mL individualmente e de 10^4 UFC/mL simultaneamente para *S. aureus* e *Yersinia enterocolitica* em uma reação multiplex com dois pares de iniciadores, utilizando a combinação de solventes orgânicos, detergentes e álcalis no método de extração.

Silva (2008) obteve um limite de detecção de microrganismos a partir da extração diretamente do leite de 10^2 UFC/mL pela técnica de PCR individual e 10^3 UFC/mL pela técnica de PCR multiplex.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização do experimento

Os experimentos foram realizados no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-MG) em Pedro Leopoldo/MG e no Laboratório de Diagnóstico e Pesquisa em Doenças Infecciosas da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

3.2. PCR

Utilizou-se a técnica da PCR para detecção do gene *fem A*, que identifica o *S. aureus*. Esta mesma técnica foi utilizada para a detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, que estão relacionados ao potencial de produção das enterotoxinas SEA, SEB e SEC, respectivamente e do gene *mec A*, que identifica MRSA. O Quadro 2 mostra a seqüência de iniciadores referente a cada gene pesquisado.

Quadro 02: Iniciadores utilizados

Iniciador	Seqüência de primers 5'-3'	Gene	Tamanho do produto (PB)
Fem A 1 Fem A 2	AAAAAAGCACATAACAAGCG GATAAAGAAGAAACCAGCAG	<i>Fem A</i>	132
SEA1 SEA2	GGTTATCAATGTGCGGGTGG CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	<i>Sea</i>	102
SEB1 SEB2	GTATGGTGGTGTAACTGAGC CCAAATAGTGACGAGTTAAGG	<i>Seb</i>	164
SEC1 SEC2	AGATGAAGTTAGTTGATGTGTATGG CACACTTTTAGAATCAACCG	<i>Sec</i>	451
MecA1 MecA2	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	<i>mec A</i>	533

A seqüência de nucleotídeos e a localização gênica foi derivada de seqüências publicadas dos genes *sea* (Betley e Mekalanos, 1988), *seb* (Jhons e Khan, 1986), *sec* (Bohach e Schillievert, 1987) *fem A* (Berger-Bachi *et al.*, 1989) e *mec A* descritos por Lee (2003).

3.3. Amostras bacterianas

Amostras padrão de *S. aureus* cedidas pela FIOCRUZ (Fundação Osvaldo Cruz) e de *Staphylococcus epidermidis* cedida pelo Laboratório de Microbiologia do LANAGRO/MG (Laboratório Nacional Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) foram utilizadas para padronização da técnica, avaliação da sensibilidade, da especificidade e como controle positivo e negativo nas reações de PCR. As amostras padrão de *S. aureus* ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 19095 e ATCC 33591, foram, respectivamente, utilizadas para padronização e controle positivo de *S. aureus* produtor de enterotoxina A (SEA), *S. aureus* produtor de enterotoxina B (SEB), *S. aureus* produtor de enterotoxina C (SEC), e MRSA. O *S. epidermidis* (ATCC 12228) foi utilizado para testar a especificidade da técnica e como controle negativo.

3.4. Amostras de Leite

Foram utilizadas 200 amostras de leite obtidas em tanque de expansão de propriedades rurais pertencentes à

microrregião de Sete Lagoas, coletadas no período de março a junho de 2009. Essas amostras foram cedidas pelo Laboratório de Análise de Leite da Escola de Veterinária da UFMG. As amostras de leite continham azidiol, substância bacteriostática que possui como princípio ativo cloranfenicol e azida sódica. Esse material foi congelado até a sua análise.

3.4.1 – Contagem Bacteriana Total (CBT) e Contagem de Células Somáticas (CCS)

A CCS e CBT foram efetuadas eletronicamente por citometria de fluxo (Somacount 300- Bentley-USA), no Laboratório de Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG nas amostras de leite estudadas.

3.5. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada diretamente do leite, segundo modificação do protocolo proposto por Millar *et al.* (2000). As amostras de leite depois de descongeladas foram homogeneizadas em agitador de tubos e, posteriormente, aliquoteadas 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-centrífuga a 17.760 g por 20 minutos a temperatura de 4°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 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 100 µL de solução Tris-EDTA (TE) (pH 8) e, então, aquecido a 96 °C, por duas horas em banho Maria. Após essa etapa, adicionou-se o mesmo volume de solução de fenol-clorofórmio e homogeneizou-se em agitador de tubos por 10 segundos. Posteriormente foi realizada outra centrifugação a 2.627 g por 5 minutos a 24° 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°C, para precipitação do DNA. Após esse período, a solução foi centrifugada a 17.760 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foi adicionado 500 µL 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 ressuspensionado em 20 µL de tampão TE (10 mmol/L Tris-HCL e 1 mmol/L EDTA) e o produto armazenado a -20 °C, até a sua utilização.

3.6. Reação de PCR e Detecção dos genes *fem A*, *sea*, *seb*, *sec* e *mec A*

Foi realizada a detecção dos genes *fem A*, *sea*, *seb*, *sec* e *mec A* no DNA extraído das amostras de leite de tanque de expansão da microrregião de Sete Lagoas. Para controle positivo e negativo foram utilizadas, respectivamente, amostras padrão de *S. aureus* e *S. epidermidis*, extraídas conforme protocolo constante do item 3.5. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o tampão especial IVB 5x (Phoneutria, Brasil), iniciadores (Invitrogen®,USA), dNTPs, Taq DNA polimerase (Phoneutria, Brasil) e DNA extraído do leite. Utilizou-se um espectrofotômetro (NanoVue) para mensurar a quantidade de DNA extraído por amostra. As reações foram processadas em um termociclador P x 2 Thermal Cycler (Thermo Electron Corporation). Os produtos de amplificação (*amplicons*) foram analisados por eletroforese, utilizando-se uma fonte de energia para eletroforese (Power PAC Basic/Marca Biorad), em 40 mL gel de agarose 1,5% (p/v), corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL), visualizados por um transiluminador com exposição à luz ultravioleta e fotografados por um sistema de fotodocumentação (Vilber Loumart). DNA Ladder Invitrogen® de 100pb e 1Kb foram utilizados como marcadores.

3.7 Otimização da PCR

Para definir as condições da reação de PCR, cada par de iniciador foi testado, avaliando-se as diferentes concentrações de iniciadores associados a diferentes temperaturas e ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Após várias tentativas, amplificações eficientes e reproduzíveis foram padronizadas com um volume final de reação de 20 µL, 20% de tampão especial IVB 5x (Phoneutria,

Brasil), 10 µmol/L dos iniciadores, 200 pmol/L de dNTPs, 5,0 U de Taq polimerase e aproximadamente 100 ng de DNA. A quantidade de DNA foi mensurada por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoVue). As condições de ciclagem para análise dos genes *fem a*, *sea* e *seb* foram de 94°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C e 30 segundos a 72° C e uma incubação final de 4 minutos a 72° C. Para análise dos genes *sec* e *mec a* foi utilizada a seguinte programação: 94°C por 5 minutos, seguidos por 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 57°C, 1 minuto a 72°C e uma incubação final de 4 minutos a 72°C.

3.8 Especificidade da técnica de PCR

Para verificar a especificidade da técnica, os iniciadores FEM A, SEA, SEB, SEC e Mec A foram observados quanto ao tamanho específico do produto da PCR, ao utilizar DNA de estirpes de referência de *S. aureus* e, a observação da não formação de bandas no gel de agarose quando utilizado DNA extraído de estirpes padrão de *S. epidermidis* que cresceram em meio BHI.

Nas amostras de leite analisadas utilizou-se como controle positivo os *S. aureus* de referência (ATCC 25923, ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 19095 e ATCC 33591) e como controle negativo *S. epidermidis* (ATCC 12228), assegurando a especificidade dos testes.

3.9. Sensibilidade da técnica de PCR

A sensibilidade da técnica foi avaliada após a inoculação de *S. aureus* (amostras de referência) em meio BHI (Brain Heart Infusion) (marca Oxoid) e incubação a temperatura de 36°C por 24 horas. Após este

período, foram realizadas diluições decimais em tubos de ensaio contendo 9 mL de leite UAT (Ultra Alta Temperatura) estéril, onde no primeiro tubo foi colocado 1 mL da cultura crescida em meio BHI (diluição 10⁻¹), e seguidamente transferidos para os demais até obter a diluição final de 10⁻⁹. Essas amostras foram distribuídas em duplicata nas placas previamente esterilizadas. Em seguida esses tubos de ensaio contendo leite com as sucessivas diluições decimais de *S. aureus* foram congelados para posterior extração de DNA e realização da PCR. Uma amostra sem inoculação (controle negativo) foi congelada para verificar se esse leite UHT não possuía contaminação por DNA de *S. aureus*.

A técnica de profundidade em placa (“pour plate”) para contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL de leite) de *S. aureus* foi utilizada da seguinte forma: o meio BHI fundido e à temperatura de 47°C foi vertido sobre a placa de Petri contendo 1 mL da suspensão diluída da amostra. Esse material foi homogeneizado girando-se a placa por movimentos circulares nos sentidos, horário e anti-horário. Após a solidificação do meio, as placas foram tampadas, invertidas e incubadas em estufa à temperatura de 36 °C. Após 24 h de incubação, as colônias foram contadas e o resultado médio de cada diluição foi registrado e multiplicado pelo fator da diluição, que é a recíproca da diluição. Essa técnica foi utilizada com o objetivo de estimar a quantidade de colônias de *S. aureus* formadas nas amostras de leite contaminadas e dessa forma avaliar a sensibilidade da PCR utilizada.

3.10 – Utilização da técnica de PCR nas amostras de leite de tanque de expansão

As amostras de leite, após extração do DNA, foram inicialmente processadas com o iniciador FEM A. As amostras amplificadas

por este iniciador foram submetidas à avaliação com os demais iniciadores (SEA, SEB, SEC e Mec A). Não foram utilizadas as amostras que não amplificaram com o iniciador FEM A.

3.11 – Análises Estatísticas

Utilizou-se estatística descritiva para análise dos dados e também o teste de χ^2 de Karl Pearson para avaliar se houve relação entre a presença de *S. aureus* identificados nas amostras de leite com maiores CCS e CBT.

Essa análise estatística foi realizada no programa SAS (*Statistical Analysis System*), SAS (1999). Para realização dessa análise estatística dois grupos de CCS e de CBT foram definidos. De acordo com Harmon (1994) quando CCSLT está acima de 500.000 cél/mL ocorrem perdas na produção de leite (Tab.1). Dessa forma os grupos definidos foram as amostras de leite com CCS abaixo e acima de 500.000 cél/mL e amostras com CBT abaixo e acima de 500.000 UFC/mL. Utilizou-se também estatística descritiva.

Tabela 1- Estimativas de prevalência de quartos infectados no rebanho e de perdas de produção em relação à CCSLT.

CCSLT (1.000/mL)	% de quartos infectados no rebanho	% de perdas de produção
200	6	0
500	16	6
1.000	32	18
1.500	48	29

Fonte: Harmon (1994)

4- RESULTADOS

4.1 Especificidade

A especificidade de cada par de iniciador dos genes *fem a*, *sea*, *seb*, *sec* e *mec a* foi demonstrada pela presença de produto amplificado de tamanho esperado ao utilizar como molde, o DNA das amostras de referência e por não amplificar DNA de *S. epidermidis* (Fig. 2).

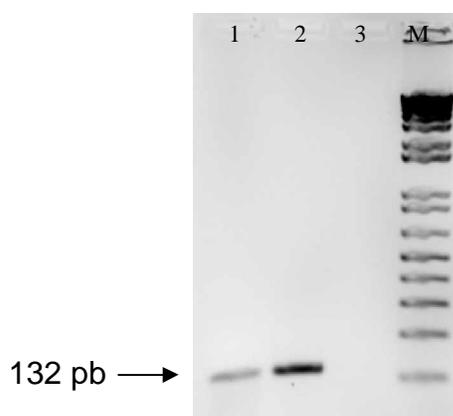


Figura 2: Produtos de PCR utilizando iniciador FEM A. Canaleta 1 DNA de *S. aureus* extraído de leite. Canaleta 2- DNA de *S. aureus* extraído de meio BHI. Canaleta 3 - DNA de *S. epidermidis* extraído de meio BHI e M: Padrão de tamanho molecular (DNA Ladder 100 pb) visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL).

4.2 Sensibilidade

O resultado da contagem bacteriana em placas foi de 120 UFC na diluição de 10^{-7} (Fig.3), ou seja, $1,2 \times 10^{-9}$ UFC/mL de leite, para a amostra ATC 25923, 190 colônias para a amostra ATCC 13565, 132 para a amostra ATCC 14458, 198 para a amostra

ATCC19095 e 207 para a amostra ATCC 33591, todas na diluição de 10^{-7} .

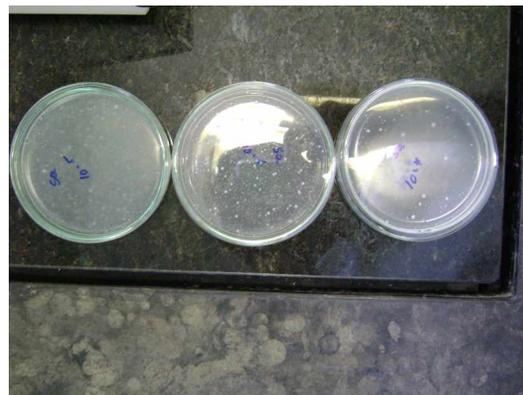


Figura 3: Placas de BHI semeadas com leite contaminado nas diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} apresentando colônias de *S. aureus*.

Após esse procedimento, os tubos de ensaio contendo leite com as diluições de *S. aureus* na base 10, foram descongelados e após a extração do DNA foi realizada a reação de PCR. Foram utilizados os iniciadores Fem A, SEA, SEB, SEC e MEC A com o objetivo de verificar em até qual diluição ocorreria a formação de produtos de PCR. Os resultados mostram que o limite de detecção ocorreu na diluição de 10^{-9} UFC/mL de leite, observando-se a formação de uma banda de 132 pb, utilizando como marcador o gene *fem A* (Fig. 4).

O mesmo limite de detecção foi observado para os genes de *sea*, *seb*, *sec* e *mec A* com a amplificação de produtos de PCR dentro dos tamanhos esperados (Figs 4 5, 6,7 e 8).

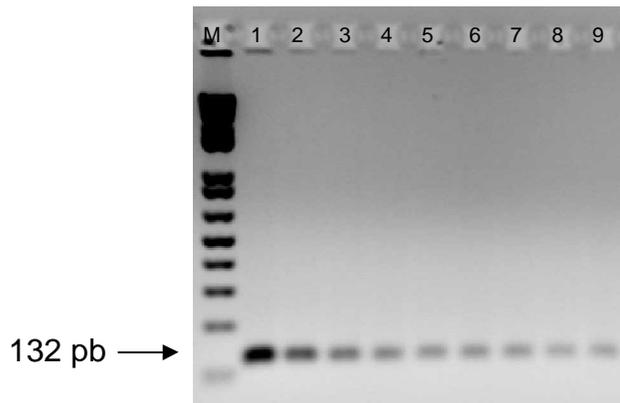


Figura 4: Produtos de PCR obtidos com DNA extraído a partir de diluições seriadas de *S. aureus*, utilizando iniciador FEM A (132 pb), M: Padrão de tamanho molecular (DNA Ladder 1 Kb); 1- Diluição 10^{-1} ; 2- Diluição 10^{-2} ; 3- Diluição 10^{-3} ; 4- Diluição 10^{-4} ; 5- Diluição 10^{-5} ; 6- Diluição 10^{-6} ; 7- Diluição 10^{-7} ; 8- Diluição 10^{-8} ; 9- Diluição 10^{-9} , visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL).

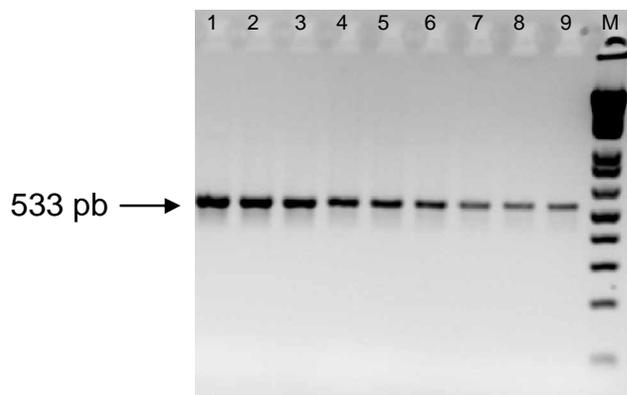


Figura 5: Produtos de PCR obtidos com DNA extraído a partir de diluições seriadas de *S. aureus*, utilizando iniciador MEC A (533 pb): Diluição 10^{-1} ; 2- Diluição 10^{-2} ; 3- Diluição 10^{-3} ; 4- Diluição 10^{-4} ; 5- Diluição 10^{-5} ; 6- Diluição 10^{-6} ; 7- Diluição 10^{-7} ; 8- Diluição 10^{-8} ; 9- Diluição 10^{-9} ; M: Padrão de tamanho molecular (DNA Ladder 1 Kb), visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL).

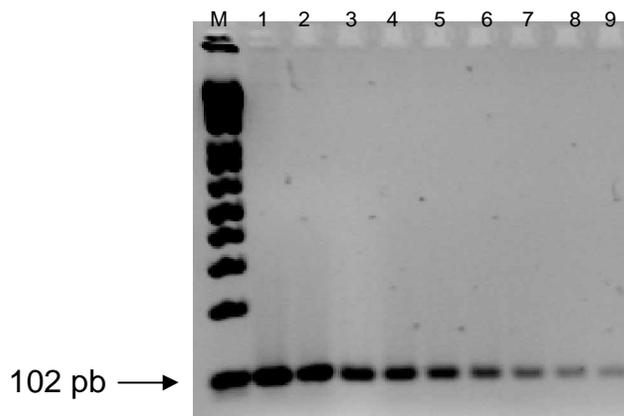


Figura 6: Produtos de PCR obtidos com DNA extraído a partir de diluições seriadas de *S. aureus*, utilizando iniciador SEA (102 pb). M: Padrão de tamanho molecular (DNA Ladder 1 Kb); 1- Diluição 10^{-1} ; 2- Diluição 10^{-2} ; 3- Diluição 10^{-3} ; 4- Diluição 10^{-4} ; 5- Diluição 10^{-5} ; 6- Diluição 10^{-6} ; 7- Diluição 10^{-7} ; 8- Diluição 10^{-8} ; 9- Diluição 10^{-9} visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL).

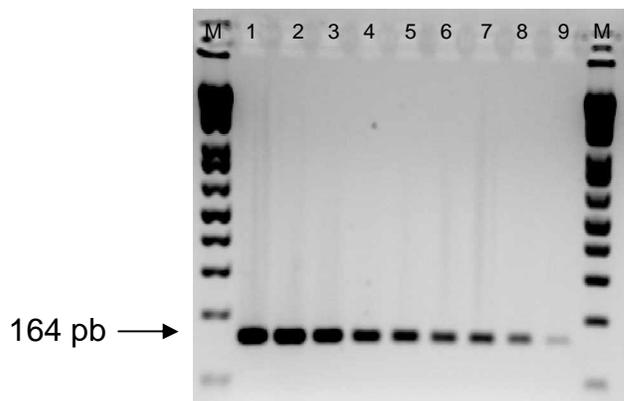


Figura 7: Produtos de PCR obtidos com DNA extraído a partir de diluições seriadas de *S. aureus*, utilizando iniciador SEB (164 pb). M: Padrão de tamanho molecular (DNA Ladder 1 Kb); 1- Diluição 10^{-1} ; 2- Diluição 10^{-2} ; 3- Diluição 10^{-3} ; 4- Diluição 10^{-4} ; 5- Diluição 10^{-5} ; 6- Diluição 10^{-6} ; 7- Diluição 10^{-7} ; 8- Diluição 10^{-8} ; 9- Diluição 10^{-9} , visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL).

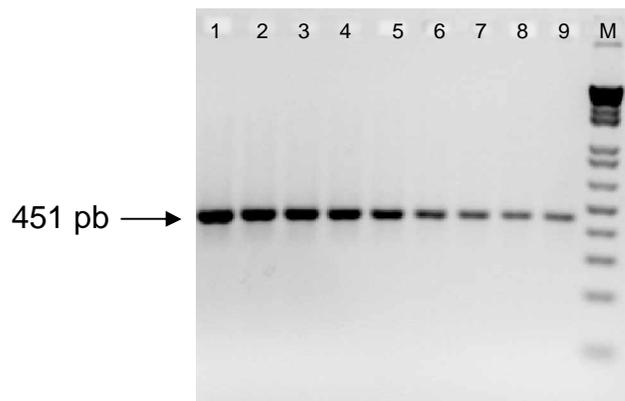


Figura 8: Produtos de PCR obtidos com DNA extraído a partir de diluições seriadas de *S. aureus*, utilizando iniciador SEC (451 pb): 1- Diluição 10^{-1} ; 2- Diluição 10^{-2} ; 3- Diluição 10^{-3} ; 4- Diluição 10^{-4} ; 5- Diluição 10^{-5} ; 6- Diluição 10^{-6} ; 7- Diluição 10^{-7} ; 8- Diluição 10^{-8} ; 9- Diluição 10^{-9} ; M: Padrão de tamanho molecular (DNA Ladder 1 Kb), visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio (1,5 mg/mL).

4.2.1 Resultados da avaliação da sensibilidade

Foi verificada a presença de produtos de PCR até a diluição 10^{-9} para os cinco pares de iniciadores utilizados. Nas amostras clínicas observou-se produtos de PCR em amostras com CCS de até 36.000 cél/mL e CBT de 12.000 UFC/mL (ANEXO 1).

4.3 Amostras Clínicas

Das 200 amostras de leite analisadas, 145 (72,5%) foram consideradas como positivas para a presença de *S. aureus* por apresentarem produtos que amplificaram na reação de PCR para o gene *fem A* e 55 amostras foram consideradas como negativas para a presença desta bactéria por apresentarem resultado negativo na PCR para esse gene.

Foi analisado estatisticamente pelo teste do χ^2 , se houve relação entre a presença de *S. aureus* identificados nas amostras de leite com maiores CCCS e CBT. Para isso foi identificado que as amostras analisadas possuíam CBT que variavam entre 5.000 e 9.156.000 UFC/mL. Essas amostras foram

então divididas em dois grupos: CBT (5.000 a 496.000 UFC/mL) e CBT (530.000 a 9.156.000 UFC/mL), (Tab. 2). Dessas amostras, 125 apresentaram CBT entre 5.000 a 496.000 UFC/mL, sendo que 91 (72,8%) foram positivas quanto a presença de *S. aureus*, enquanto que nas 75 amostras do outro grupo (CBT entre 530.000 a 9.156.000 UFC/mL), 54 (72%) foram positivas quanto a presença de *S. aureus*.

Com relação à CCS as amostras variavam entre 34.000 e 3.715.000 céls/mL de leite. Essas amostras também foram divididas em dois grupos de CCS (34.000 a 497.000 céls/mL) e CCS (500.000 a 3.715.000 céls/mL) (Tab. 3). Dessas amostras, 126 apresentaram CCS entre 34.000 a 497.000 céls/mL, sendo que 87 (69,05%) foram positivas para a presença de *S. aureus*, enquanto que para as 74 amostras do outro grupo (CCS entre 500.000 a 3.715.000 céls/mL) constatou-se 58 (78,38 %) positivas quanto à presença de *S. aureus*.

Utilizando o teste de χ^2 constatou-se que não há diferença estatística entre os grupos avaliados.

Tabela 2. Distribuição das amostras de leite com relação à CBT e a presença de *S. aureus*, identificadas pela amplificação do gene *fem A* , procedentes de produtores rurais da microrregião de Sete Lagoas-MG, 2009.

Presença do gene <i>femA</i>	CBT x 1.000 (5 a 496 UFC/mL)	CBT x 1.000 (530 a 9.156/ UFC/mL)	TOTAL
NEGATIVO	34 (17%)	21 (10,5 %)	55 (27,5 %)
POSITIVO	91(45,5 %)	54 (27 %)	145 (72,5 %)
TOTAL	125 (62,5 %)	75 (37,5 %)	200 (100%)

Tabela 3: Distribuição das amostras de leite com relação à CCS e a presença de *S. aureus*, identificadas pela amplificação do gen *fem a*, procedentes de produtores rurais da microrregião de Sete Lagoas-MG, 2009.

Presença do gene <i>femA</i>	CCS x 1.000 (34 a 497 cels/mL)	CCS x 1.000 (500 a 3715 cels/mL)	TOTAL
NEGATIVO	39 (19,5%)	16 (8 %)	55 (27,5 %)
POSITIVO	87 (43,5 %)	58 (29 %)	145 (72,5 %)
TOTAL	126 (63 %)	74 (37 %)	200 (100%)

145 amostras foram analisadas quanto à presença de enterotoxinas A, B e C e resistência aos antibióticos pela amplificação de genes específicos.

Das 145 amostras de leite que amplificaram o gene *fem A*, 87 (60%) amplificaram *sea*, sendo este o gene mais prevalente, seguido por *seb* que apresentou 55 (37,91 %)

amostras amplificadas e, posteriormente *sec* que apresentou 10 (6,9%) amostras amplificadas. 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, demonstradas na Fig 9.

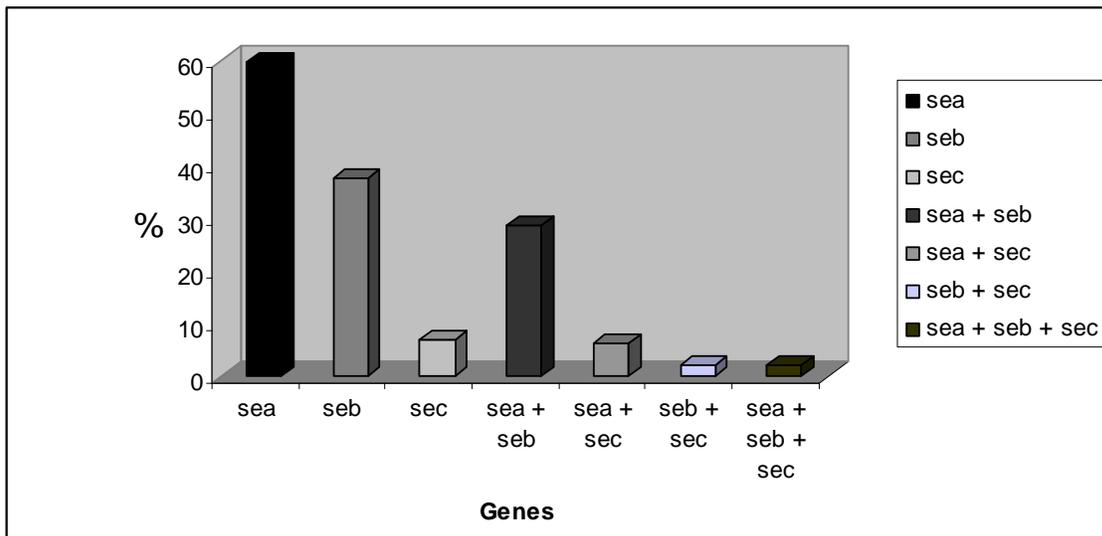


Figura 9: Distribuição dos genes produtores de enterotoxinas das 145 amostras de *S. aureus* identificadas pela presença do gene *fem A* em amostras de leite da microrregião de Sete Lagoas-MG, 2009.

5- DISCUSSÃO

A correta identificação das espécies bacterianas que causam a mamite bovina é de importância não apenas no aspecto clínico, mas também no biotecnológico, epidemiológico e em estudos ambientais. Esses conhecimentos podem ajudar no desenvolvimento de estratégias preventivas, indicando formas de tratamento do animal durante a lactação, descarte ou servir de base para a administração do tratamento seletivo no período seco, segundo afirmações de Reis *et al.* (2003) e Zschöck *et al.* (2005), justificando um diagnóstico mais preciso.

Os métodos comumente utilizados para diagnóstico etiológico dos casos de mamite 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 microrganismo. Culturas

negativas também podem ocorrer quando resíduos de antibióticos estão presentes na amostra, inibindo crescimento microbiano. Por outro lado, a presença de leucócitos e alta contagem de células somáticas no leite também têm um potencial de inibição do crescimento (Phuektes *et al.*, 2001; Cremonesi *et al.*, 2005). Por este motivo métodos moleculares utilizados para detecção de microrganismos em amostras de leite é de grande relevância. Neste trabalho a especificidade foi constada pela presença de produto amplificado de tamanho esperado ao utilizar como molde, o DNA das amostras de referência e por não amplificar DNA de *S. epidermidis*. A especificidade dessa técnica foi também estudada por Costa (2008) ao submeter 360 amostras de bactérias isoladas de casos de mamite clínica e subclínica, identificadas fenotipicamente como *S. aureus* e pela PCR, constatou a amplificação do gene *fem A* em 97,77 % destas amostras.

A utilização do gene *fem A*, como marcador epidemiológico para detecção e identificação de *S. aureus*, a partir de amostras de leite, mostrou-se útil em estudos populacionais sobre a dinâmica das infecções intramamárias (Veras, 2004; Costa, 2008). Constatou-se a presença deste microrganismo em 72,5% das amostras de leite estudadas nos rebanhos bovinos leiteiros da microrregião de Sete Lagoas-MG, mostrando ser este um dos principais agentes causadores de casos de mamite naquela região, considerando que das 145 amostras que amplificaram o gene *fem A*, 123 (84,83%) amostras possuíam CCS acima de 200.000 cél/mL e, segundo Harmon (1994), CCSLT superiores a 200.000 constituem um forte indício da mamite subclínica. Este fato também foi constatado em levantamentos realizados em diversas regiões do Brasil que apontaram a mamite contagiosa como a mais freqüente, tendo como agente principal o *S. aureus* (Silva *et al.*, 1983; Nader Filho *et al.*, 1984; Costa *et al.*, 1995; Brito *et al.*, 1999; Donatele *et al.*, 2002; Costa, 2008). A frequência de *S. aureus* identificados em amostras de leite neste trabalho de 72,5% foi intermediária entre os diferentes registros encontrados na literatura, entre 9,1% a 85% (Langenegger *et al.*, 1986; Costa, 1986; Vianni e Nader Filho, 1989; Trinidad *et al.*, 1990; Langoni *et al.*, 1991; Wilson *et al.*, 1997). Segundo Pinheiro de Sá *et al.* (2004), estas diferenças são devidas aos aspectos multivariáveis referentes às raças, idade, ambiente e os de manejo na criação, além de que muitos casos tratam de estudos retrospectivos com números de amostras diferentes, o que deve influenciar na variação dos resultados.

Com a finalidade de se obter técnicas acuradas, rápidas e específicas para o diagnóstico e estudos epidemiológicos da mamite bovina, métodos moleculares têm sido crescentemente utilizados em

diagnósticos microbiológicos (Zschöck *et al.*, 2005), entre eles a reação em cadeia da polimerase. Apesar destes aspectos, a utilização da PCR em amostras clínicas, como o leite, pode ser comprometida em termos de sensibilidade, posto que no leite substâncias como Ca^{2+} , gordura e proteínas podem diminuir a sensibilidade da técnica ou até mesmo inibi-la, conforme relataram Cremonesi *et al.* (2005) e Ramesh *et al.* (2005). Entre elas, destaca-se a caseína, um dos principais inibidores presentes no leite, que em associação com o cálcio formam micelas. A adição de soluções com altas concentrações de EDTA quelam o cálcio dissolvendo as micelas de caseína (Silva, 2008). Neste experimento utilizou-se tampão TE e solução de lavagem alcalina durante a extração de DNA para diminuir esses inibidores.

Assim os limites de detecção de *S. aureus* de 10 UFC/mL de leite, alcançados neste trabalho foram menores que os obtidos por Ramesh *et al.* (2005) e Silva (2008) ao detectarem, por PCR, concentrações entre 10 a 100 vezes maiores deste patógeno no leite. Essa diferença de sensibilidade pode ser explicada pela metodologia empregada na extração de DNA de *S. aureus* diretamente do leite e também pela diferença dos iniciadores utilizados para a reação de PCR, entre os trabalhos. Neste trabalho foram utilizados iniciadores descritos por Betley e Mekalanos (1988) (*sea*), Jones e Khan (1986) (*seb*), Bohach e Schillievert (1987) (*sec*) e Berger-Bachi *et al.* (1989) (*fem A*) e Lee (2003) (*mec A*) que foram específicos para os genes desejados, não havendo amplificação de nenhum DNA de outro microrganismo testado.

Entre as amostras analisadas, 16 (11,0 %) delas amplificaram o gene *mec A*, identificando a existência de amostras de

MRSA, no leite produzido na microrregião de Sete Lagoas. O primeiro trabalho a analisar diretamente do leite os MRSA, a partir da detecção do gene *mec A*, foi o realizado por Silva (2008), identificando uma (3,3%) entre 30 amostras de leite de tanque de expansão procedentes de outras regiões produtoras de leite de Minas Gerais. O maior número de amostras utilizadas neste trabalho, todas procedentes de uma mesma microrregião, torna-se mais representativo, evidenciando a disseminação deste tipo de microrganismo entre rebanhos produtores de leite o que sugere serem as infecções mamárias por MRSA, em bovinos leiteiros, um sério problema no campo, como afirmaram Lee *et al.* (2004).

A identificação de MRSA em 11,03% das amostras de leite nesse trabalho pode ter correlação com outros estudos em nosso País, como o observado por Cardoso *et al.* (2000) que constataram através de antibiograma a baixa eficiência de ampicilina e penicilina G entre isolados de *S. aureus* provenientes de leite de 23 municípios do estado de Minas Gerais, e por Donatele *et al.* (2002) que verificaram elevados índices de resistência para os antibióticos β -lactâmicos (82,9%) e tetraciclina (24,4%) em 180 amostras de *S. aureus* isolados de casos de mamite subclínica em rebanhos do estado do Rio de Janeiro.

S. aureus geralmente está associado com a mamite subclínica, subaguda ou crônica, mas eventualmente pode determinar casos severos de mamite. Nos casos de infecções intramamárias, a presença desta bactéria ou de seus produtos estimula a formação de mediadores inflamatórios endógenos que disparam o recrutamento de polimorfo nucleados (PMN) do sangue e estimulam a diapedese. Os PMN podem então justificar a elevação significativa na CCS durante os

processos inflamatórios, que passa de 50.000 cels/mL de leite para milhões de células por mililitro (Silveira Filho, 2007). Costa (2008) observou elevados índices de mamite clínica e de mamite subclínica causados por *S. aureus*, associados com elevadas CCS no leite de tanque de expansão, entre rebanhos bovinos leiteiros no Sul de Minas Gerais, entretanto, não encontrou correlação entre as taxas de isolamento de *S. aureus* e altas CCSLT e CBT. Os resultados encontrados nesta pesquisa, realizada na microrregião de Sete Lagoas-MG, são semelhantes aos apresentados por Costa (2008), mesmo não se estabelecendo os índices de mamite clínica ou subclínica entre os rebanhos trabalhados. Esse resultado pode ser atribuído a alta sensibilidade da técnica utilizada.

Pinheiro de Sá *et al.* (2004) verificaram uma correlação entre a produção de enterotoxinas e a resposta celular verificada pela CCS, revelando que nos casos de detecção de enterotoxinas as amostras eram provenientes de quartos mamários com CCS superior a 1000×10^3 células por mL de leite, o que pode sugerir possível fator de virulência para este agente. Neste trabalho não foi possível avaliar o leite proveniente diretamente dos quartos mamários de vacas, porém, das 145 amostras analisadas para a presença do gene de enterotoxinas, somente 17 amostras (11,72%) apresentaram CCS maior do que 1000×10^3 células por mL de leite, dessa forma não foi possível relacionar a importância da produção de enterotoxinas e o grau de resposta celular da glândula mamária.

Mesmo assim, vale discutir os resultados das CCS e CBT observadas entre as 145 amostras de leite positivas para presença de *S. aureus*. As contagens de células somáticas variavam entre 34.000 e 3.715.000 cels/mL de leite, enquanto que as contagens do número de

bactérias presentes variaram entre 5.000 e 9.156.000 UFC/mL. Por estes achados, pode-se deduzir que as infecções subclínicas predominaram entre os rebanhos que compuseram essas amostras de leite, posto que os valores médios de CCS e CBT para leite de tanque se enquadram nas estimativas de conteúdos celulares e bacterianos apresentados em rebanhos com mamite estafilocócica subclínica (Silveira Filho, 2007; Costa, 2008).

Quanto à pesquisa do potencial toxigênico, do total de 145 amostras de *S. aureus*, 87 (60%) amplificaram o gene *sea*, sendo este mais prevalente, 55 (37,93%) das amostras com o gene *seb* e, posteriormente, 10 (6,9%) com o gene *sec*. A co-amplificação dos genes *sea* + *seb* por 42 amostras (28,9%), *sea* + *sec* por 9 amostras (6,2%) , *seb* + *sec* por 3 amostras (2,06%) e co-amplificação dos três genes *sea*, *seb*, *sec* por 3 amostras (2,06%). Os resultados observados nesse estudo foram coerentes aos encontrados por Veras (2004), Silva (2004) e Nader Filho *et al.* (2007), que também utilizaram a técnica de PCR, com predominância de amostras de *S. aureus* que possuíam o gene de SEA, seguida de SEB e posteriormente SEC. A associação de SEA+SEB também predominou entre os achados destes autores.

Resultados divergentes são apresentados por Cardoso *et al.* (1999) ao caracterizarem a produção de enterotoxinas estafilocócicas por 127 amostras de *S. aureus*, isoladas de leite proveniente de vacas com mamite em Minas Gerais, pela técnica de OSP, observaram o predomínio de amostras produtoras de SED, seguida de SEB, SEC e SEA. Estes autores ainda descrevem a presença da TSST-1 entre as amostras de *S. aureus*. Já Luz (2008) também obteve resultado divergente ao deste trabalho no que se refere à presença das enterotoxinas clássicas, pois nos 94 isolados

de *S. aureus* de amostras de leite provenientes de vacas com mamite e queijo coalho, nenhum apresentava os genes *sea*, *seb* e *sec*, havendo apenas a amplificação dos segmentos de tamanho esperado nas amostras de referência (FRI) usadas como controle positivo. Os genes identificados foram os responsáveis pela produção das enterotoxinas SEG, SEH, SEI e SEJ.

Segundo Pinheiro de Sá *et al* (2004), as SEB predominaram em estudo realizado em amostras de *S. aureus* isoladas de rebanhos com infecções subclínicas. Para estes autores os resultados apresentados diferem em sua grande maioria, o que deve refletir a importância da genotipagem de amostras de *S. aureus* para uma melhor interpretação. As variações observadas na distribuição dos genes toxigênicos neste e em outros estudos realizados podem estar relacionadas às diferenças geográficas, devido a diferentes condições ambientais, bem como à natureza dos isolados de *S. aureus*.

6- CONCLUSÕES

De acordo com os resultados pode-se concluir:

- O alto percentual de amostras de leite que amplificaram o gene *fem A* sugere que o *S. aureus* constitui um dos principais agentes causadores de infecções intramamárias na microrregião de Sete Lagoas-MG;
- A técnica de PCR utilizada neste estudo apresentou alta sensibilidade e especificidade para diagnóstico de *S. aureus*, enterotoxinas estafilocócicas e MRSA no leite;
- O gene *sea* foi o mais prevalente nas amostras analisadas, seguidos dos genes *seb* e *sec*;

- Em uma mesma amostra constatou-se a presença de mais de um gene para enterotoxinas;

- Não houve correlação entre as taxas de identificação de *S. aureus* e altas taxas CCSLT e CBT;

- A técnica de PCR, utilizando DNA de extrações realizadas diretamente do leite, para identificação de *S. aureus* e determinação do seu potencial enterotoxigênico, mostrou-se útil para estudos epidemiológicos sobre as infecções intramamárias causadas por *S. aureus*.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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, 2008.

ANDRADE, M. A. *Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em Staphylococcus aureus isolados de amostras clínicas*. 2008. 124f. (Mestrado em Saúde Pública) Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Review: Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, v. 61, p. 1-10, 2000.

BERGER-BACHI, B.; BARBERIS-MAINO, L.; STRASSLE, A. et al. *FemA*, a hostmediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. *Molecular and General Genetics*, v. 219, n. 1-2, p. 263-269, 1989.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker, 1989, p.463-523.

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

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

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

BOYLE-VAVRA S, LABISCHINSKI H, EBERT CC, EHLERT K, DAUM RS. A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, p. 280-287, 2001.

BRASIL. Instrução Normativa SDA/n.51 de 18 de Setembro de 2002. Estabelece os parâmetros técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e seu transporte a granel, em conformidade com os Anexos a esta Instrução Normativa. *Diário Oficial da União*, 18/09/2002.

BRANT, L.M.F.; FONSECA L.M.; SILVA M.C.C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, vol.59, n.6, 2007

- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; RIBEIRO, M.T. et al. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.*, v. 51, n 2, p. 129-135, 1999.
- CARDOSO, H.F.T.; COSTA, G.M.; SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 22, n. 5, p. 199-206, 2000.
- 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. *Letters in Applied Microbiology*, v. 29, p. 347-349, 1999.
- 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.
- CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F. Impacto da Instrução Normativa 51 na qualidade do leite. In: *ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES*, 4, 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ – UNESP, 2007, p.30-37.
- CHAMBERS HF. Methicillin-resistant staphylococci. *Clin Microbiol Rev.*, v1, p.173-186, 1988.
- CHEN, T.R.; HSIAO, M.H.; CHIOU, C.S. et al. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxins types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. *International Journal of Microbiology*, v. 71, n. 1, p. 63-70, 2001.
- CHIANG, Y-C., LIAO, W-W., FAN, C-M., PAI, W-Y., CHIOU, C-S., TSEN, H-Y., 2008. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology.*, v.121, p. 66-73.
- COSTA, E. O. Etiologia bacteriana da mastite bovina no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Microbiologia*, v. 17, p. 107-112, 1986.
- COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R. et al. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 17, n. 5, p. 215-217, 1995.
- COSTA, G. M. *Mastite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais*.- 2008. 123 p. Tese (doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- COUCH, J. L.; BETLEY, M. J. Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 171, p. 4507-4510, 1989.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Mol. Cel. Probes*, v. 19, p. 299-305, 2005.

CUNHA, M.L.R.S. *Staphylococcus aureus*: toxinas e saúde pública. In: *ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES*, 4, 2007, Botucatu. *Anais...* Botucatu: FMVZ – UNESP, 2007. p.56-63.

DE LENCASTRE, H.S.A.; FIGUEIREDO, A. S, URBAN, C., TOMASZ, A. Multiple mechanisms of methicillinresistance and improved methods for detection in clinical isolates of *S. aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, p. 632-639, 1991.

DEVRIESE, L.A.; VANDAMME, L. R.; FAMEREE, L. Methicilin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated from bovine mastitis cases. *Zbl. Vet. B.*, v. 19, p. 598-605, 1972.

DONATELE, D.M.; MOTTA, O.V.; FOLLY, M.M. Perfil antimicrobiano de linhagens de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva na mastite subclínica de vacas leiteiras nas regiões norte e noroeste do Estado do Rio de Janeiro. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 5, n. 2, p. 3-6, 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA (EMBRAPA), 2009 a. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/Abertura.html>, acessado em 25/08/2009 .

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA (EMBRAPA), 2009 b. Disponível em www.cnpgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0244.php, acessado em 15/06/2009.

EVENSON, M. L. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 7, p. 311-316, 1988.

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

FITZGERALD, J.R.; MEANEY, W.J.; HARTIGAN, P.J. et al. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiology and Infection*, v. 119, p. 261-269, 1997.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. *Microbiologia de los Alimentos*. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 681 p.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. Statistical data please, Disponível em: <<http://faostat.fao.org>> Acesso em 20/01/2010.

FREITAS, M. F. L. Exotoxinas Estafilocócicas. *Ciência Veterinária Tropical*, Recife, v.7, p. 63-74, 2004.

FUEYO, J. M. Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 243, p. 447-454, 2005.

GALTON, D. M.; ADKINSON, R. W.; THOMAS, C. V. et al. Effects of premilking udder preparation on environmental bacterial contamination of milk. *Journal of Dairy Science*, v 65, p.1540, 1982.

GUIMARÃES, F.F. Modificação da geografia da produção mundial de leite. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 9, n. 1, p. 19-23, 2006.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Sciences*, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.

HIROOKA, E. Y. et al. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *International Journal Food Microbiology*. v. 7, p. 185-191, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS (IBGE), 2009. Disponível em www.ibge.gov.br, acessado em 25 ago. 2009.

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

JUDICIAL COMMISSION. Conservation of the generic name *Staphylococcus* Rosembach, designation of *Staphylococcus aureus* Rosembach and designation of a neotype culture of *Staphylococcus aureus* Rosembach. Opinion 17. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*., v. 8, p. 153-154, 1958.

KLOSS, W. E.; LAMBE, J. R. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A. *Manual of Clinical Microbiology*. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991, 1500 p.

LAFFRANCHI, A.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C. et al.. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. *Ciência Rural*, v. 31, n. 6, p. 1027- 1032, 2001.

LAMAITA H. C., CERQUEIRA M. M.O.P., CARMO L.S. et al. Contagem de *Staphylococcus sp.* 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.

LANGONI, H., SILVA, A.V., CABRAL, K.G. et al. Etiologic aspects on bovine mastitis: aerobic bacterial flora. In: *PANAMERICAN CONGRESS ON MASTITIS CONTROL AND MILK QUALITY*, 1, 1998, Mérida. *Proc...* México: 1998. p. 468-480. *en Ciencias Veterinarias*, v. 9, n. 1, p. 49-55, 1994.

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

LANGENEGGER, J.; FIGUEIREDO, M. P.; REZENDE, E. F. Eficácia terapêutica do cefacetil frente aos microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* isolados de mastites subclínicas. *Hora Veterinária*, v. 30, p. 24-27, 1986.

LANGONI, H., PINTO, M.P., DOMINGUES, P.F. et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 43, n. 6, p. 507-515, 1991.

LANGONI, H., SILVA, A.V., CABRAL, K.G. et al. Etiologic aspects on bovine mastitis: aerobic bacterial flora. In: *PANAMERICAN CONGRESS ON MASTITIS CONTROL AND MILK QUALITY*, 1, 1998, Mérida. *Proc...* México: 1998. p. 468-480.

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.*, Jun., v. 42, n. 6, p. 2780-2782, 2004.

LEE, J. H. Methicillin (Oxacillin)-Resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. Environ. Microbiol.*, Nov., v. 69, n. 11, p. 6489-6494, 2003.

LOUIE, L.; GOODFELLOW, J.; MATHIEU, P. et al. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol*, v. 40, p. 2786-2790, 2002.

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, Recife.

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

MIDDLETON, J. R.; FALES, W. H.; LUBY, C. D. et al. Surveillance of *Staphylococcus aureus* in veterinary teaching hospitals. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, n. 6, p. 2916-2918, 2005.

MILLAR, B. C.; JIRU, X.; MOORE, J. E. et al. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J. Microbiol. Methods*, v. 42, p. 139-147, 2000.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S. et al. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

- NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A. et al. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.5, p.2007.
- NADER FILHO, A.N.; ITURRINO, R.P.S.; ROSSI-JUNIOR, O.D. Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite gordura 3,2%. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 36, n. 5, p. 549-58, 1984.
- OLIVEIRA, A. M.; RAMOS, M. C. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. *Bras. J. Med. Biol. Res.*, v. 35, p. 175-180, 2002.
- OLIVEIRA, D.C.; LENCASTRE, H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 46, p. 2155-2161, 2002.
- PINHEIRO de SÁ, M.E.; CUNHA, M.L.R.S.; ELIAS, A. O. et al. 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.5, São Paulo Sep./Oct. 2004.
- PHUERKTES, 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.*, n. 84, p. 1140-1148, 2001.
- RAJALA-SCHULTZ, P. J. Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Veterinary Microbiology*, p. 33-42, 2004.
- RAMESH, A.; PADMAPRIYA, B. P.; CHANDRASHEKAR, A. et al. Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Mol Cell Probes*, v. 16, p. 307-314, 2005.
- REIS, S.R., SILVA, N., BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n.6, p.651-658, 2003
- RIBEIRO, J.; BOYCE, J. M.; ZANCANARO, P. Q. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among patients visiting the emergency room at a tertiary hospital in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.9, p.52-55, 2005.
- RICH, M.; DEIGHTON, L.; ROBERTS, L. Clindamycin resistance in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Vet. Microbiol.*, v. 111, p. 237-240, 2005.
- ROBBINS, R., GOULD, S., BERGDOLL, M.S. Detecting the enterogenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, v.28, p.946-950, 1974.
- ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *International Journal of Food Microbiology*, v. 25, p. 61-67, 2002.
- RUEGG, P. L.; REINEMANN, D. J. Milk quality and mastitis test. *Bovine Practitioner, Stillwater*, v. 36, p. 41-54, 2002.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.S.R.S.; ELIAS, A.O.; et al. 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, p.321-326, 2004.

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

SANTOS, F. G. B.; OLIVEIRA, W. L. M.; GARINO JÚNIOR, F. et al. Investigação dos mecanismos de resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina. *Rev. Napgama*, v. 8, n. 2, p. 14-18, 2005.

SANTOS, M.V; FONSECA, L.F.L. *Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite*. São Paulo: Manole Ltda, 2007, 314p.

SAS INSTITUTE (1999). *SAS User's Guide: Statistics*. V 8, SAS Institute, Inc., Cary , North Carolina.

SHAFFER, W. M.; IANDOLO, J. J. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. *Infection and Immunity*, Washington, v. 20, p. 273-278, 1978.

SILVA, N., FIGUEIREDO, J.B., OLIVEIRA, M. Mastite no Rebanho Bovino da Escola Média de Agricultura de Florestal-UFV-MG. Parte II. Frequência e Etiologia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 35, n. 1, p. 85-91, 1983.

SILVA, N. Doença da glândula mamária. In: MARQUES, D. C. *Criação de Bovinos*. 7. ed. Belo Horizonte: CVP – Consultoria Veterinária e Publicações, 2003. p. 435-451.

SILVA, E. R. *Genotipagem e avaliação do potencial enterotoxigênico de amostras de Staphylococcus aureus isoladas de mastite caprina e bovina*. 2004. 57f. Tese (doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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. 35 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVEIRA-FILHO, V. M. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina no Estado de Pernambuco, 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, 2007.

TOMASZ, A.; DRUGÉON, H.B; LENCASTRE, H.M; et al. New mechanism for methicillin-resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother*, v.33, p. 1869-1874, 1989.

TRINIDAD, P., NICKERSON, S. C., ALLEY, T. K. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. *J. of Dairy Sci.*, v. 73, p. 107-114, 1990.

VAN DER FLIER, M.; VAN DIJK, N.B.; FLUIT, A.C. et al. Fatal pneumonia in an adolescent due to community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* positive for Panton-Valentine-leukocidin. *Ned. Tijdschr Geneesk.*, v. 147, p. 1076-1079, 2003.

VANNUFFELD, P.; GIGI, J.; EZZEDINE, H. et al. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 2864-67, 1995.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M.K.M.; ANNAMALAI, T.A. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiology.*, v. 92, p.179-185, 2003.

VERAS, J.F. *Identificação por PCR de genes para produção de SEA, SEB, SEC e SED em linhagens de Staphylococcus sp. Isolados de surtos de toxinfecção alimentar por leite e derivados.* 2004. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VIANNI, M. C. E., NADER FILHO, A. Determinação do número de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* em amostras de leite de vacas com mastite

subclínica. *Ciência Veterinária*, v. 3, p. 5-6, 1989.

VOSS, A.; MILATOVIC, D.; WALLRAUCH, S.C.; et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, v.13, p. 50-55, 1994.

WILSON, D. J.; GONZALES, R. N.; DAS, H. H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. *J. of Dairy Sci.*, v. 80, p. 2592-2598, 1997.

ZAFALON, L.F.; AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A. et al. Influência de bactérias do gênero *Corynebacterium* e estafilococos coagulase positivos e negativos sobre a contagem de células somáticas e a produção láctea de quartos mamários com mastite subclínica. *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 2, n. 6, p. 4-6, 1999.

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.

ZSCHÖCK, M.; MANHOLD-MAURER, S.; WESCHER, A. et al. Evaluation of tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis as a molecular method for species identification of streptococcal isolates from bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*, v. 72, p. 333-337, 2005.

Anexo 01 – Resultados das amostras analisadas.

CCS X 1000	CBT X 1000	FEM A	MEC A	SEA	SEB	SEC
556	5794	NEGATIVO	-	-	-	-
115	395	NEGATIVO	-	-	-	-
412	313	NEGATIVO	-	-	-	-
393	107	NEGATIVO	-	-	-	-
129	25	NEGATIVO	-	-	-	-
382	11	NEGATIVO	-	-	-	-
1267	5845	NEGATIVO	-	-	-	-
497	984	NEGATIVO	-	-	-	-
412	429	NEGATIVO	-	-	-	-
941	4559	NEGATIVO	-	-	-	-
223	1855	NEGATIVO	-	-	-	-
1416	327	NEGATIVO	-	-	-	-
262	1762	NEGATIVO	-	-	-	-
180	6106	NEGATIVO	-	-	-	-
512	3536	NEGATIVO	-	-	-	-
174	3228	NEGATIVO	-	-	-	-
608	206	NEGATIVO	-	-	-	-
743	276	NEGATIVO	-	-	-	-
478	3897	NEGATIVO	-	-	-	-
220	1202	NEGATIVO	-	-	-	-
431	137	NEGATIVO	-	-	-	-
384	42	NEGATIVO	-	-	-	-
331	1025	NEGATIVO	-	-	-	-
762	898	NEGATIVO	-	-	-	-
1091	6807	NEGATIVO	-	-	-	-
801	187	NEGATIVO	-	-	-	-
774	44	NEGATIVO	-	-	-	-
148	1366	NEGATIVO	-	-	-	-
185	119	NEGATIVO	-	-	-	-
475	137	NEGATIVO	-	-	-	-
235	254	NEGATIVO	-	-	-	-
148	307	NEGATIVO	-	-	-	-
135	309	NEGATIVO	-	-	-	-
409	2928	NEGATIVO	-	-	-	-
34	139	NEGATIVO	-	-	-	-
174	331	NEGATIVO	-	-	-	-
408	185	NEGATIVO	-	-	-	-
264	809	NEGATIVO	-	-	-	-

CCS X 1000	CBT X 1000	FEM A	MEC A	SEA	SEB	SEC
364	5871	NEGATIVO	-	-	-	-
114	383	NEGATIVO	-	-	-	-
761	7020	NEGATIVO	-	-	-	-
316	756	NEGATIVO	-	-	-	-
746	129	NEGATIVO	-	-	-	-
251	20	NEGATIVO	-	-	-	-
394	14	NEGATIVO	-	-	-	-
1520	975	NEGATIVO	-	-	-	-
309	479	NEGATIVO	-	-	-	-
1234	275	NEGATIVO	-	-	-	-
293	441	NEGATIVO	-	-	-	-
110	27	NEGATIVO	-	-	-	-
428	23	NEGATIVO	-	-	-	-
798	68	NEGATIVO	-	-	-	-
75	5	NEGATIVO	-	-	-	-
221	167	NEGATIVO	-	-	-	-
426	34	NEGATIVO	-	-	-	-
3038	5691	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
732	107	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
223	2119	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
405	369	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
513	3591	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
1207	266	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
497	2104	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
377	214	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
76	246	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
285	562	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
452	543	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
507	302	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
133	3827	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
462	8485	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
1552	1316	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
153	118	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
491	1540	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
36	1080	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
458	180	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
741	164	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
131	6646	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
386	366	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO

CCS X 1000	CBT X 1000	FEM A	MEC A	SEA	SEB	SEC
729	148	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
516	259	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
653	592	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
135	120	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
753	853	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
679	9156	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
388	215	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
462	3120	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
411	2540	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
565	257	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
2658	2111	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
212	2610	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
296	1864	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
573	249	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
229	1816	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
138	138	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
210	4129	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
283	2362	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
467	4055	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
649	392	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
119	416	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
490	2576	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
3715	3817	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
585	216	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
259	107	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
458	24	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
1893	413	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
984	242	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
500	184	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
1380	327	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
2593	1698	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
232	1795	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
210	240	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
849	4514	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
225	217	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
207	404	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
122	454	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
408	190	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
847	274	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

CCS X 1000	CBT X 1000	FEM A	MEC A	SEA	SEB	SEC
323	215	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
190	117	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
432	879	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
1214	171	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
215	1365	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
230	104	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
520	191	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
157	103	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
441	366	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
432	614	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
732	854	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
979	53	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
1134	226	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
1218	172	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
98	182	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
555	530	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
557	477	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
301	269	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
620	4761	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
70	354	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
504	899	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
254	309	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
475	182	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
258	5359	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
346	164	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
779	590	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
650	264	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
388	476	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
2800	666	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
534	492	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
1969	974	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
237	295	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
339	330	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
333	418	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
1203	121	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
289	558	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
53	219	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
324	157	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
441	100	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO

CCS X 1000	CBT X 1000	FEM A	MEC A	SEA	SEB	SEC
907	182	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
401	246	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
672	383	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
419	321	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
632	17	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
504	1163	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
527	214	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
985	683	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
282	483	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
286	192	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
283	981	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
184	308	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
524	2525	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
546	174	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
526	466	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
224	7411	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
87	765	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
143	644	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
720	416	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
140	346	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
201	240	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
174	4197	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
196	192	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
802	216	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
238	305	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
651	100	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
326	4653	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
257	6297	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
1182	1045	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
281	1325	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
456	105	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
328	303	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
465	116	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
1090	207	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
374	185	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
63	228	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
182	7091	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
2525	496	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
201	26	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO

CCS X 1000	CBT X 1000	FEM A	MEC A	SEA	SEB	SEC
647	36	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
465	12	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
634	432	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
456	85	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
286	36	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
464	26	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO