

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DA
MASTITE CAPRINA CAUSADA POR *Staphylococcus* spp.**

Flavia Bechelli Tonin

Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

2003

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DA
MASTITE CAPRINA CAUSADA POR *Staphylococcus* spp.**

Flavia Bechelli Tonin

Orientador: Prof. Dr. Antonio Nader Filho

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Medicina Veterinária Preventiva).

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Novembro de 2003

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

FLAVIA BECHELLI TONIN, nascida aos 16 de outubro de 1973, na cidade de São Bernardo do Campo - São Paulo, é Médica Veterinária formada pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, campus de Botucatu em 1995. Participou do programa de Aprimoramento em Medicina Veterinária da FMVZ – UNESP, câmpus de Botucatu, na área de Zoonoses e Saúde Pública, durante os anos de 1996 e 1997, período no qual desenvolveu projetos de pesquisas e praticou atividades laboratoriais e de extensão. Ingressou no curso de pós-graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, em 1998 e obteve título de Mestre em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, em abril de 2000 com o trabalho intitulado “Influência do número de ordenhas e do período de lactação sobre o teor de cloretos, conteúdo celular e condutividade elétrica do leite de cabras”. No mesmo ano, iniciou suas atividades no curso de doutorado e em 2002 passou a desempenhar cargo de docente junto às disciplinas de Inspeção de Produtos de Origem Animal e Tecnologia de Produtos de Origem Animal, no curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP, São José do Rio Preto, onde também exerce a função de médica veterinária responsável pelo Laboratório de Análises Clínicas e Microbiológicas do Hospital Veterinário “Dr. Halim Atique”.

*“...hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
só levo a certeza de que muito pouco eu sei
eu nada sei...”*

Almir Sater/ Renato Teixeira

*Aos meus pais,
Jurandir e Rute*

Verdadeiros exemplos de amor e vida

*Aos meus irmãos,
Fernanda e Fabio*

Partes que me completam

Dedico

*Aos amigos,
Cláudia Yumi, Elaine e Luciano*

Por iluminarem meus dias até nos momentos difíceis

Agradeço

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr Antonio Nader Filho**, pelo respeito, confiança e amizade. Sua orientação foi um exemplo de profissionalismo a ser seguido.

À médica veterinária **Rosane Pereira de Oliveira**, pós-graduanda do curso de doutorado em medicina veterinária da FCAV – UNESP, câmpus de Jaboticabal, pela amizade e valiosa colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

Aos **Profs. Drs. Hélio Langoni e José Luis Morais Vasconcelos “Zequinha”**, pelo agradável convívio desde os tempos de graduação e por me incentivarem a dar os primeiros passos no caminho científico.

Ao **Prof. Dr. Raul José da Silva Gírio**, pela confiança e incentivo em minha carreira profissional.

Aos **Profs. Drs. Luiz Augusto do Amaral, Ruben Pablo Schocken-Iturrino e José Jurandir Fagliari**, pelo carinho e pela eterna colaboração.

Ao **Prof. Dr. Hélio José Montassier**, pela oportunidade de receber seus conhecimentos.

À **Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado**, por haver colocado seu laboratório à nossa disposição.

Às **Profas. Dras. Adolorata Bianco Carvalho e Maria da Glória Buzinaro**, pela amizade e auxílio sempre presentes.

Aos demais **professores** do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pelos conhecimentos compartilhados e pelo agradável convívio.

Aos amigos **Waldemar Dibelli Júnior “Diba” e Liliana Biondi Naka “Lila”**, pela colaboração durante a realização desse trabalho e pelas boas risadas desde os tempos de mestrado.

Aos demais **funcionários** do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pela convivência amistosa e pela disponibilidade em colaborar no que fosse necessário.

Aos **pós-graduandos e residentes** da equipe do Prof. Dr. Hélio Langoni, pela valiosa colaboração durante a realização desse trabalho.

À pós-graduanda **Erika de Oliveira**, pelo companheirismo durante as exaustivas jornadas de trabalho laboratoriais.

À **Neide, Bruna e Ludmilla**, pela amizade e todos os momentos de alegria compartilhados.

A **Luís Francisco Zafalon e Lucif Abraão Nacif Júnior**, pela convivência divertida e pelo companheirismo em compartilhar o mesmo orientador.

Aos queridos companheiros de pós-graduação, **Juliana Peiró, Fátima, Renato e Marcelo**, pelos momentos agradáveis vividos durante a disciplina do Prof. Dr. Hélio José Montassier.

Aos demais **colegas** do curso de pós-graduação em Medicina Veterinária da FCAV – UNESP, câmpus de Jaboticabal.

À **minha família**, presente mais precioso que tenho, pelo apoio constante.

A **André Antonio Cutolo**, pela compreensão e amizade, e por entender que a distância só fortaleceu nosso amor.

Em especial a **Deus**, por guiar meus pasos e me fortalecer nos momentos de dificuldade.

A todos aqueles que me ajudaram a chegar até aqui, **o meu obrigada mais sincero!**

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	8
3.1 Características das propriedades rurais e dos rebanhos.....	8
3.2 Realização do teste da caneca telada de fundo preto e do California Mastitis test (CMT).....	9
3.3 Colheita das amostras.....	9
3.3.1 Amostras de leite.....	9
3.3.2 Amostras obtidas do óstio papilar.....	10
3.3.3 Amostras obtidas da ordenhadeira.....	10
3.3.4 Amostras obtidas do ordenhadores.....	10
3.3.5 Amostras de água.....	11
3.4 Exames laboratoriais.....	11
3.4.1 Isolados bacterianos.....	11
3.4.2 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos.....	12
3.4.3 Extração de DNA.....	12
3.4.4 Tipificação a partir da amplificação do gene codificador do espaçador intergênico do 16S-23S.....	13
3.5 Cálculo da capacidade discriminatória.....	14
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
V. CONCLUSÕES.....	26
VI. REFERÊNCIAS.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Resultados do teste da caneca (presença de grumos) e do California Mastitis Test (CMT) realizados em 196 amostras de leite de cabras provenientes de três propriedades localizadas no estado de São Paulo.....	15
2	Resultados do exame bacteriológico realizado em 56 amostras de leite positivas ao California Mastitis Test (CMT) de cabras provenientes de três propriedades localizadas no estado de São Paulo.....	16
3	Número e porcentagem de glândulas mamárias sadias e com mastite subclínica em cabras provenientes de três propriedades localizadas no estado de São Paulo.....	17
4	Padrões de resistência de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas em leite, tetos, insufladores de ordenhadeira, ferida de pele do teto, mãos e fossas nasais de ordenhadores frente aos antimicrobianos testados.....	18
5	Padrões de resistência aos antimicrobianos de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidas na propriedade I.....	20
6	Padrões de resistência aos antimicrobianos de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidas na propriedade II.....	20
7	Padrões de resistência aos antimicrobianos de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidas na propriedade III.....	21
8	Padrões de amplificação da região intergênica 16S-23S do RNA ribossomal de acordo com a origem das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp.....	22

9	Padrões de amplificação da região intergênica 16S-23S do RNA ribossomal das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidas na propriedade I.....	23
10	Padrões de amplificação da região intergênica 16S-23S do RNA ribossomal das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidas na propriedade II.....	24
11	Padrões de amplificação da região intergênica 16S-23S do RNA ribossomal das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidas na propriedade III.....	24

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO ESTUDO DA MASTITE CAPRINA CAUSADA POR *Staphylococcus* spp.

RESUMO – o presente estudo teve como objetivo verificar a prevalência da mastite caprina causada por *Staphylococcus* spp. em três rebanhos do Estado de São Paulo, bem como conhecer as características fenotípicas e genotípicas das cepas isoladas. Por outro lado, através dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos e da PCR-ribotipagem, pretendeu-se, também, verificar a relação epidemiológica existente entre as cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas em amostras de leite, óstio do teto, lesão em pele do teto e ordenhadeira, assim como de mãos, tonsilas e fossas nasais de ordenhadores. A prevalência da mastite subclínica foi de 12,0%, 10,7% e 26,6% nos rebanhos pertencentes às três propriedades estudadas, nos quais *Staphylococcus* coagulase negativa foi o principal agente envolvido na etiologia dos casos. O teste de susceptibilidade a antimicrobianos revelou que 100% das cepas foram sensíveis à gentamicina, a neomicina e ao cefoperazone e, ainda, que a resistência frente a ampicilina e penicilina foi observada em 25,2% das cepas. A análise molecular revelou estreita relação entre as cepas isoladas de amostras de leite e óstio de teto. Cepas isoladas dos insufladores da ordenhadeira, assim como as de fossas nasais dos ordenhadores, têm participação na epidemiologia das mastites em cabras. A PCR-ribotipagem permitiu avaliar a relação epidemiológica existente entre as cepas isoladas de forma mais eficiente que o teste de susceptibilidade a antimicrobianos. A compreensão dessas relações epidemiológicas é necessária para a implementação de medidas eficazes no controle e prevenção das mastites em cabras.

Palavras-Chave: epidemiologia, mastite caprina, *Staphylococcus*

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY APPLIED ON STUDIES OF GOAT MASTITIS CAUSED BY *Staphylococcus* spp.

SUMMARY – the present study aimed to investigate the prevalence of goat mastitis due to *Staphylococcus* spp. in three flocks from São Paulo State, as well as understand the phenotypic and genotypic characteristics of the strains isolated. Otherwise, epidemiological relationship between the strains isolated from milk, teat ends, skin lesions, milking units and milking personnel was investigated by the antimicrobial susceptibility and PCR-ribotyping. The prevalence of subclinical mastitis was 12,0%, 10,7% and 26,6% for the three flocks studied and coagulase negative *Staphylococcus* was the most prevalent agent isolated. Antimicrobial susceptibility test revealed 100% of sensibility to gentamicin, neomycin and cephoperazon and, in addition, the resistance to ampicillin and penicillin in 25,2% of the strains isolated. Molecular analysis showed close relationship between strains isolated from milk and teat ends. Strains isolated from milking units, as well as strains isolated from nasal swabs of the milking personnel, play an important role on goat mastitis epidemiology. PCR-ribotyping was more efficient than antimicrobial susceptibility test to evaluate the epidemiological relationship between the strains isolated. An understanding of these epidemiological relationships is necessary for the design of more effective mastitis control programs.

Keywords: epidemiology, goat mastitis, *Staphylococcus*

I. INTRODUÇÃO

A importância do leite de cabra na alimentação humana não reside apenas no valor biológico de seus nutrientes, mas também em suas características de hipoalergenicidade, o que o torna um alimento diferenciado e desperta o interesse da pecuária nacional pela expansão da caprinocultura.

Apesar da rusticidade e capacidade de adaptação dos caprinos a uma ampla variedade de condições climáticas, o desenvolvimento da caprinocultura leiteira tem levado a um aumento na incidência e na severidade das patologias da glândula mamária, especialmente as mastites.

A mastite, causada por uma grande variedade de microrganismos, é a enfermidade mais freqüente e dispendiosa do gado leiteiro. Para sua prevenção e controle faz-se necessária a adoção de medidas relacionadas ao animal e ao ambiente com o intuito de diminuir as fontes de infecção e as vias de transmissão da mesma. Além disso, é essencial o conhecimento das características de seus agentes etiológicos uma vez que o tratamento das mastites vem sendo prejudicado pelo crescente número de microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado (MOTA et al., 2000).

Atualmente, a biologia molecular tem sido amplamente utilizada em estudos epidemiológicos de enfermidades, principalmente nos casos de infecções hospitalares causadas por *Staphylococcus aureus* em humanos. Os métodos genotípicos têm substituído com êxito os métodos fenotípicos que apresentam baixa reprodutibilidade e são baseados em características instáveis dos microrganismos (OLIVEIRA e RAMOS, 2002).

A carência de estudos relacionados à mastite caprina justifica o desenvolvimento de pesquisas voltadas às particularidades da enfermidade nessa espécie, ainda mais quando se considera a importância que a mesma desempenha em saúde animal e saúde pública. No que diz respeito à prevenção da mastite é de grande valor o estudo epidemiológico de isolados de *Staphylococcus* spp. envolvidos na etiologia da

enfermidade, uma vez que o conhecimento dos elementos envolvidos na cadeia epidemiológica possibilita a aplicação de medidas de profilaxia específicas ao controle da mesma.

II. REVISÃO DA LITERATURA

A mastite é uma enfermidade complexa, resultante da interação entre o animal e o ambiente, associada à presença de microrganismos na maioria dos casos. Constitui-se em importante problema de saúde animal e de saúde pública, com grande repercussão econômica em praticamente todos os países do mundo.

Os agentes bacterianos associados à mastite podem ser agrupados em duas categorias, ou seja, os patógenos encontrados primariamente no ambiente em que vivem os animais como, por exemplo, os coliformes, e os patógenos estreitamente associados com a glândula mamária e a pele do teto, como o *Staphylococcus aureus* (SANDHOLM e PYÖRÄLÄ, 1995).

A mastite caprina gera graves prejuízos econômicos devido ao descarte do leite, custos com medicamentos e assistência veterinária, aumento da mão de obra, redução da qualidade e quantidade do leite e seus subprodutos (DULIN et al., 1983; STEHLING et al., 1986; BARROS e LEITÃO, 1992; CASTRO et al., 2001), além de ser importante problema de saúde pública (MOTA et al., 2000).

Dentre os agentes etiológicos identificados na mastite caprina, a maioria é similar àqueles encontrados na espécie bovina, entre eles *Staphylococcus coagulase positiva* e negativa, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Micrococcus spp.* e *Pasteurella spp.* (MANSER, 1986; STEHLING et al., 1986; BARCELLOS et al., 1987; GUHA et al., 1989; CASTRO, 1992; LIMA JÚNIOR et al., 1993).

Apesar da grande variedade de microrganismos que podem ser isolados a partir da glândula mamária, existem alguns patógenos que, invariavelmente, são predominantes, sendo relatados isolamentos destes em diversos países.

Na forma subclínica da doença, os *Staphylococci coagulase negativa* (SCN) têm sido isolados com maior frequência (POUTREL e LERONDELLE, 1983; KALOGRIDOU-VASSILIADOU et al., 1992; POUTREL et al., 1997). Dentre as espécies de SCN podemos citar algumas mais comumente isoladas em leite caprino, tais como S.

epidermididis, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. hyicus*, *S. caprae*, *S. hominis* e *S. lugdunensis* (CONTRERAS et al., 1997a).

No Brasil, diversos pesquisadores constataram a elevada prevalência de SCN isolados de amostras de leite de fêmeas caprinas com mastite subclínica (CASTRO et al., 1992; LIMA JÚNIOR et al., 1993; LIMA JÚNIOR e VIANNI, 1995; RIBEIRO et al., 1999). Estudos realizados em outros países também confirmam o predomínio do isolamento de SCN em relação a outros agentes envolvidos na etiologia da mastite. (HUNTER, 1984; MANSER, 1986; EAST et al., 1987; RYAN e GREENWOOD, 1990; BOSCOS et al., 1996; CONTRERAS et al., 1997b; POUTREL et al., 1997; SUNG et al., 1999).

Segundo MAISI e RIIPINEN (1991) o *Staphylococcus aureus* é o estafilococo mais patogênico para a glândula mamária da cabra, tanto sob a forma de enfermidade subclínica quanto clínica, da mesma forma que para os bovinos (MYLLYS et al., 1994). Em caprinos, o *S. aureus* é o principal agente envolvido na etiologia das mastites gangrenosas (ABU-SAMRA et al.; 1988, LIMA JÚNIOR et al.; 1992), inclusive os produtores de TSST-1 (Toxina da Síndrome do Choque Tóxico) e enterotoxina C (BEZEK e HULL, 1995).

A patogenicidade dos SCN ainda é tema de discussão para diversos pesquisadores, mas sabe-se que algumas espécies apresentam potencial patogênico para a glândula mamária como observado por POUTREL (1984), que isolou *Staphylococcus sciuri* subsp *lentus* de caso de mastite clínica caprina. O fato dos SCN serem transmitidos durante e após a ordenha preocupa ainda mais os pesquisadores uma vez que essa característica dificulta a prevenção e controle da infecção no rebanho (HARMON e LANGLOIS, 1989).

Outro fator a ser levado em consideração no controle das mastites é a resistência aos antimicrobianos. Vários autores têm demonstrado a importância de se conhecer a etiologia e o perfil de sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos dos agentes causadores de mastite em cabras (BARCELLOS et al., 1987; GUHA et al., 1989; LIMA JÚNIOR et al., 1992; LIMA JÚNIOR et al., 1993).

O sucesso na terapia das mastites vem sendo prejudicado pelo crescente número de cepas resistentes aos antimicrobianos usados indiscriminadamente em medicina veterinária. Tem sido demonstrado que a resistência do *S. aureus* à meticilina, se deve à presença de uma proteína de ligação à penicilina (PBP, do inglês “penicillin-binding protein”) adicional, denominada PBP 2’ ou PBP 2a, a qual é codificada pelo gene *mecA*. Essa proteína exibe baixa afinidade para a maioria das penicilinas e cefalosporinas, resultando em reação cruzada com os antibióticos beta lactâmicos. Sabe-se que cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA, do inglês “methicillin resistant *Staphylococcus aureus*”) podem apresentar resistência à penicilina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, cefalotina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprim, ciprofloxacina e clindamicina, como observado em estudos realizados com cepas de origem humana (TEIXEIRA et al., 1995).

A presença da proteína de ligação à penicilina em *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. simulans* resistentes à meticilina parece ser semelhante à presença da PBP 2’ nos *S. aureus* resistentes à meticilina (PIERRE et al., 1990).

Em animais, a presença do gene *mecA* em MRSA foi demonstrada pela primeira vez por KAWANO et al. (1996), em estudo realizado em galinhas. Essas cepas foram resistentes à maioria dos antibióticos beta-lactâmicos, sendo que algumas cepas foram resistentes, também, aos macrolídeos e aminoglicosídeos. A pesquisa do gene *mecA* e o estudo do perfil de resistência de cepas de *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos vêm sendo amplamente utilizados como ferramenta em estudos epidemiológicos de casos de infecção hospitalar em humanos (ICHIYAMA et al., 1991; CARLES-NURIT et al., 1992; UDO et al., 1996; BELKUM et al., 1997; MORVAN et al., 1997). A aplicação da epidemiologia molecular, relacionada ao perfil de resistência aos antimicrobianos, ainda é pouco estudada em medicina veterinária.

Sabe-se que a diferenciação de cepas é importante no estudo epidemiológico de doenças infecciosas. Para tanto, deve-se utilizar um marcador epidemiológico que possibilite discriminar cepas não relacionadas, bem como agrupar cepas epidemiologicamente relacionadas (FRENAY et al., 1996).

Diversas técnicas fenotípicas e genotípicas vêm sendo utilizadas em estudos epidemiológicos, como o antibiograma, a fagotipagem, a biotipagem, o *immunoblotting*, a eletroforese enzimática *multilocus*, a análise de restrição de DNA plasmidial, a eletroforese em campo pulsátil (PFGE, do inglês “pulsed-field gel electrophoresis”), a análise de restrição do gene da coagulase por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “polymerase chain reaction”), o polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP, do inglês “restriction fragment length polymorphism”) e a ribotipagem, dentre outras. O antibiograma é a técnica mais barata, simples e acessível para qualquer laboratório e pode ser utilizada como método de triagem para a avaliação de cepas correlacionadas. Os métodos que envolvem biologia molecular são mais caros e laboriosos mas, por outro lado, são mais eficazes para estudos epidemiológicos. A combinação de dois ou mais métodos seria, ainda, a maneira mais eficaz de discriminar cepas correlacionadas (TENOVER et al., 1994).

Uma técnica que vem sendo amplamente utilizada em estudos epidemiológicos é a PCR-ribotipagem. Esse método foi desenvolvido para permitir a amplificação de regiões polimórficas do espaçador intergênico da região 16S-23S do RNA ribossomal, o que permite a tipificação de isolados de *Staphylococcus* spp. de importância epidemiológica de forma simples e rápida (KOSTMAN et al., 1995; FORSMAN et al., 1997).

Para DOLZANI et al. (1994) a técnica de PCR-ribotipagem apresenta um bom poder discriminatório, particularmente entre as cepas MRSA. Apesar de não ser o método mais sensível possui boa reprodutibilidade e facilidade de execução.

A PCR-ribotipagem que utiliza *primers* universais pode ser utilizada para várias espécies de microrganismos, mas se forem utilizados *primers* espécie-específicos o método serve tanto para se diagnosticar a bactéria alvo como para tipificar o microrganismo. A técnica é uma excelente ferramenta em epidemiologia molecular (KOSTMAN et al., 1995).

Diante do exposto, idealizou-se o presente trabalho com o objetivo de verificar a prevalência da mastite caprina causada por *Staphylococcus* spp. em três rebanhos do Estado de São Paulo, bem como conhecer as características fenotípicas e genotípicas

das cepas isoladas. Por outro lado, por meio dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos e da PCR-ribotipagem, pretendeu-se, também, verificar a relação epidemiológica existente entre as cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas em amostras de leite, óstio papilar, lesão em pele do teto, água e ordenhadeira, assim como de mãos, tonsilas e fossas nasais de ordenhadores.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Características das propriedades rurais e dos rebanhos

As amostras foram obtidas em rebanhos caprinos pertencentes a três propriedades rurais situadas no Estado de São Paulo. Nessas propriedades, apenas em uma se realizava ordenha manual (propriedade II), uma vez ao dia, enquanto que nas demais a ordenha era mecânica, também uma vez ao dia (propriedades I e III). Nas três propriedades eram obedecidas práticas de higiene durante a ordenha, quais sejam, a realização do teste da caneca telada de fundo preto utilizando-se os primeiros jatos de leite, a realização da anti-sepsia dos tetos antes e após a ordenha com solução a base de iodo e sua secagem com papel toalha descartável.

Os rebanhos estudados compreenderam 38, 28 e 32 fêmeas lactantes, nas propriedades I, II e III, respectivamente. Os animais eram pertencentes às raças Saanen e Parda Alpina e a produção média diária era de 2 litros por animal. Na propriedade I, a higienização diária do equipamento de ordenha era realizada manualmente com a utilização de detergente alcalino específico para tal finalidade. Na propriedade III a ordenhadeira era higienizada em lavador automático, diariamente, na seguinte seqüência: água fria por três minutos, detergente alcalino diluído em água aquecida por 15 minutos (detergente ácido era utilizado uma vez por semana) e, finalmente, água fria por mais três minutos. As propriedades II e III possuíam sala de ordenha azulejada, diferentemente da propriedade I em que a sala de ordenha era apenas cimentada. O leite produzido nas propriedades I e II era comercializado cru ou doado para instituições de caridade, enquanto que o leite produzido na propriedade III era pasteurizado e envasado em sistema de mini-usina e comercializado localmente.

3.2 Realização do teste da caneca telada de fundo preto e do California Mastitis Test (CMT)

O teste da caneca foi realizado em todas as fêmeas lactantes, desprezando-se os primeiros jatos de leite com o intuito de se verificar a presença de grumos sugestivos de mastite clínica. Em seguida, realizou-se o CMT como triagem para possíveis casos de mastite subclínica no rebanho, sendo consideradas positivas as amostras de leite das metades mamárias que apresentaram score ≥ 1 ao CMT. O teste da caneca e o CMT foram realizados em 76, 56 e 64 tetos de fêmeas lactantes provenientes das propriedades I, II e III, respectivamente.

3.3 Colheita das amostras

As amostras de leite foram colhidas em tubos esterilizados individuais, após a realização do teste da caneca e do CMT. Adicionalmente, foram colhidas amostras dos óstios papilares, de lesões na pele do teto, das ordenhadeiras, assim como das mãos, das fossas nasais e das tonsilas dos ordenhadores. Foram colhidas, ainda, amostras de água utilizada para a lavagem do úbere, das ordenhadeiras e para o abastecimento da sala de ordenha.

3.3.1 Amostras de leite

As amostras de leite foram colhidas de acordo com os procedimentos recomendados pelo NMC (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1987). Assim sendo, após limpeza do óstio papilar com álcool etílico 70% (v/v) foram colhidas, em tubos de ensaio esterilizados, amostras individuais de 2 a 5 mL de leite de cada metade mamária, independentemente do resultado obtido no CMT.

3.3.2 Amostras obtidas do óstio papilar

Imediatamente após a anti-sepsia efetuada pelo ordenhador, colhiam-se amostras do óstio papilar com o auxílio de suabe estéril, por meio da realização de movimentos circulares sobre o mesmo (INGAWA et al., 1992). Os suabes foram transportados em tubos de ensaio individuais contendo água peptonada estéril.

3.3.3 Amostras obtidas da ordenhadeira

Suabes estéreis foram friccionados em movimentos circulares na porção final de cada um dos insufladores (dois por cada conjunto de ordenha), em todos os conjuntos de ordenhadeiras conforme recomendação de McDONALD et al. (1993). Assim como descrito no item anterior, os suabes foram transportados em tubos de ensaio individuais contendo água peptonada estéril. As colheitas foram realizadas antes e após as ordenhas, com o intuito de aumentar a probabilidade de isolamento de *Staphylococcus*, bem como para avaliar a participação do equipamento de ordenha na veiculação desse patógeno. A propriedade I possuía dois conjuntos de ordenha; portanto foram colhidas oito amostras (quatro antes e quatro depois da ordenha), enquanto a propriedade III possuía quatro conjuntos de ordenha dos quais foram colhidas 16 amostras (oito antes e oito depois da ordenha).

3.3.4 Amostras obtidas dos ordenhadores

Amostras das fossas nasais dos ordenhadores foram obtidas conforme descrito por NISHIJIMA et al. (1995), a partir da utilização de suabes estéreis introduzidos e rotacionados delicadamente nas narinas dos mesmos. Além disso, suabes estéreis foram umedecidos com água peptonada estéril e passados entre os dedos, nos espaços subungueais e sobre as palmas das mãos. Da mesma forma, as amostras das tonsilas foram colhidas por meio de suabes estéreis umedecidos em água peptonada. O transporte dos suabes foi realizado em tubos de ensaio individuais contendo água

peptonada estéril. As colheitas foram realizadas antes das ordenhas. Nas propriedades I, II e III foram colhidas amostras de duas, três e novamente três pessoas, respectivamente, totalizando oito amostras de cada origem, quais sejam, mãos, tonsilas e fossas nasais.

3.3.5 Amostras de água

As amostras de água foram colhidas diretamente das torneiras e mangueiras existentes na sala de ordenha, após escoamento por três minutos, de acordo com o recomendado pela APHA (1992). Desse modo, foram colhidas quatro, duas e uma amostras das propriedades I, II e III, respectivamente. Em todas as propriedades a água disponível era oriunda de rede de abastecimento público.

3.4 Exames laboratoriais

3.4.1 Isolados bacterianos

As amostras de leite foram semeadas diretamente em placas de petri contendo ágar sangue a 5% com auxílio de alça de platina, enquanto que as amostras oriundas do óstio papilar, das ordenhadeiras, das mãos, das tonsilas e das fossas nasais dos ordenhadores foram semeadas diretamente com os suabes utilizados na colheita das mesmas. Após a incubação por 18 a 24 horas, a 37°C, as colônias suspeitas foram isoladas e identificadas a partir de suas características morfológicas e tintoriais, com posterior realização das provas de catalase e coagulase. Como descrito por KLOOS e LAMBE JR. (1991), a atividade da coagulase foi determinada a partir da utilização de mistura de plasma de coelho heparinizado e cultura de 18-24 horas do isolado, em quantidades definidas, em tubo de ensaio incubado em banho-maria a 37°C, com observação de hora em hora durante quatro horas e leitura final após 24 horas.

As amostras de água foram diluídas 1:10 em água peptonada estéril (10 mL da amostra em 90 mL de água peptonada) e submetidas à técnica de membrana filtrante (membrana Schleicher e Schuell de 0,45 μ e 47mm de diâmetro, ref. nº 1794-0) em sistema de filtro acoplado em kitasato conectado à bomba de vácuo. Inicialmente filtravam-se 10 mL da amostra diluída e posteriormente filtravam-se 10 mL da amostra pura. Entre cada amostra filtravam-se 100 mL de água destilada estéril. Para cada amostra utilizava-se uma membrana que era colocada em placa de petri contendo ágar Baird-Parker. As colônias suspeitas foram avaliadas segundo suas características morfológicas e tintoriais.

3.4.2 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

A susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados foi determinada a partir da técnica de difusão em disco (BAUER et al., 1966), em placas de ágar Mueller-Hinton, de acordo com o recomendado pelo Comitê Nacional para Padrões em Laboratório Clínico - NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2000). Os antimicrobianos utilizados foram: ampicilina, cefoperazone, gentamicina, neomicina, oxacilina, penicilina, sulfazotrim e tetraciclina.

3.4.3 Extração de DNA

De acordo com o estabelecido por HOOKEY et al. (1998), as colônias de *Staphylococcus* foram removidas diretamente da placa de ágar sangue e ressuspensas em 1 mL de tampão TE-glicose (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 5% D-glicose). Após centrifugação a 10.000 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 100 μ L de solução de lisostafina (500 μ g/mL em TE-glicose) e 50 μ L de solução de lisozima (50mg/mL em TE-glicose). Após incubação a 37°C por 2 horas, foram acrescentados 100 μ L de solução 5M de NaCl e 30 μ L de solução de proteinase K (4mg/mL em TE glicose) e o lisado foi submetido a incubação a 56°C por 30 minutos. Cinco microlitros do lisado foram

diluídos em 45 µL de água destilada estéril. Dez microlitros de resina Chelex 100 (5% p/v) foram adicionados e as amostras foram submetidas a nova incubação a 56°C durante 30 minutos. Para desnaturação da proteinase K, o lisado foi aquecido a 99°C por 20 minutos. Os DNAs extraídos de todas as cepas foram armazenados a 4°C até o momento da utilização nas reações de PCR.

3.4.4 Tipificação a partir da amplificação do gene codificador do espaçador intergênico do 16S-23S rRNA

A discriminação entre as cepas de *Staphylococcus* spp. foi realizada de acordo com o protocolo descrito por CUNY et al. (1996), com modificações referentes às concentrações dos reagentes utilizados para as reações. As reações de amplificação consistiram em 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200µM de cada desoxinucleotídeo, 10µM de cada primer rRNA1 (5'-TTG TAC ACA CCG CCC GTC A-3') e rRNA2 (5'-GGT ACC TTA GAT GTT TCA GTT C-3'), e 1U de *Taq* polimerase, em volume final de 20µL. As condições de amplificação compreenderam desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 4 minutos. Os produtos amplificados foram observados em gel de agarose em concentração de 1.5% corado com brometo de etídio. Ladder 100bp foi utilizado como padrão de peso molecular.

Durante o período do experimento, foram analisadas 196 amostras de leite, 196 amostras colhidas dos óstios papilares, duas amostras de lesões cutâneas na região do úbere, 24 amostras dos insufladores das ordenhadeiras, sete amostras de água utilizada para abastecimento do local da ordenha, oito amostras das mãos dos ordenhadores, oito amostras das fossas nasais e oito amostras das tonsilas dos ordenhadores.

3.5 Cálculo da capacidade discriminatória

A capacidade discriminatória foi determinada de acordo com o índice numérico descrito por HUNTER e GASTON (1988). O valor- D indica a probabilidade de duas cepas isoladas de forma aleatória em uma população-teste serem relacionadas em grupos distintos no método de tipagem avaliado. A fórmula abaixo foi utilizada para o cálculo dos valores D , sendo s = número total de tipos (padrões) diferentes, n_j = número de isolados representativos de cada padrão e N = número de isolados na população-teste.

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 196 amostras de leite analisadas, 76, 56 e 64 foram provenientes das propriedades I, II e III, respectivamente. Como observado na Tabela 1, a propriedade II foi a que apresentou menor porcentagem (16,1%) de amostras de leite positivas ao CMT e a propriedade III foi a que apresentou maior porcentual (43,8%) de amostras reativas ao teste.

Tabela 1. Resultados do teste da caneca (presença de grumos) e do California Mastitis Test (CMT) realizados em 196 amostras de leite de cabras provenientes de três propriedades localizadas no estado de São Paulo.

Condição	Propriedade I		Propriedade II		Propriedade III		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Presença de grumos	1	1,3	0	0	0	0	1	0,5
CMT negativo	56	73,7	47	83,9	36	56,2	139	70,9
CMT positivo	19	25,0	9	16,1	28	43,8	56	28,6
Total	76	100	56	100	64	100	196	100

Apesar de existir uma amostra de leite positiva ao teste da caneca (presença de grumos) na propriedade I, esta se mostrou negativa ao isolamento bacteriano provavelmente porque, segundo informações do funcionário da ordenha, o animal estava sob tratamento com antimastítico à base de gentamicina nos dias que antecederam a visita.

Na Tabela 2 observa-se que entre as 56 amostras de leite positivas ao CMT, houve isolamento de *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) em 8 (42,1%), 5 (55,6%) e 14 (50,0%), nas propriedades I, II e III, respectivamente. Por outro lado, o isolamento de *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP) foi obtido em apenas 1 (5,3%), 1 (11,1%) e 3 (10,7%) amostras nas propriedades I, II e III, respectivamente. Quando consideradas somente as amostras positivas ao isolamento bacteriano as frequências

de isolamento de SCN sobem para 88,9%, 83,3% e 82,3% nas propriedades I, II e III, respectivamente. O predomínio do isolamento de bactérias do gênero *Staphylococcus* nos casos de mastite subclínica em caprinos está de acordo com os achados de RIBEIRO et al. (1999), MOTA et al. (2000) e CASTRO et al. (2001).

Apesar de alguns pesquisadores não encontrarem diferenças significativas entre as contagens de células somáticas em amostras de leite com presença ou ausência de SCN (HUNTER, 1984; MANSER, 1986), outros estudos sugerem a participação dos SCN na etiologia dos casos de mastite subclínica em cabras (DEINHOFER e PERNTANER, 1995; POUTREL et al, 1997).

Tabela 2. Resultados do exame bacteriológico realizado em 56 amostras de leite positivas ao California Mastitis Test (CMT) de cabras provenientes de três propriedades localizadas no estado de São Paulo.

Exame bacteriológico	Propriedade I		Propriedade II		Propriedade III		Total		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
Negativo	10	52,6	3	33,3	11	39,3	24	42,9	
Positivo	SCN*	8	42,1	5	55,6	14	50,0	27	48,2
	SCP**	1	5,3	1	11,1	3	10,7	5	8,9
Total	19	100	9	100	28	100	56	100	

* SCN = *Staphylococcus* coagulase negativa.

** SCP = *Staphylococcus* coagulase positiva.

Considerando-se como doentes as fêmeas cujas amostras de leite mostraram-se reagentes ao CMT e positivas ao isolamento bacteriano, a Tabela 3 mostra a ocorrência de 32 (16,4%) casos de mastite subclínica causada por *Staphylococcus* spp nos rebanhos estudados. Os dados desta tabela, evidenciam, ainda que a propriedade III foi a que apresentou maior frequência (26,6%) de casos, seguida pelas propriedades I (12,0%) e II (10,7%).

Salienta-se, entretanto, que das 139 amostras negativas ao CMT, 34 (24,5%) apresentaram-se positivas ao exame bacteriológico revelando isolamento de SCN.

CASTRO et al. (1992) atribui a ocorrência deste achado a alguns fatores, dentre os quais destacam-se uma eventual contaminação durante a colheita da amostra, as alterações decorrentes da fase inicial do processo infeccioso, a menor precisão do CMT para a espécie caprina, ou mesmo a uma baixa resposta inflamatória frente a esse grupo de patógenos. Entretanto, esse achado evidencia a participação dos animais portadores como fonte de infecção das mastites causadas pelas bactérias do gênero *Staphylococcus* principalmente durante o momento da ordenha, fato este que pode dificultar o controle da infecção no rebanho uma vez que esses animais, por serem considerados sadios, atuam livremente na manutenção do agente na propriedade.

Tabela 3. Número e porcentagem de glândulas mamárias sadias e com mastite subclínica em cabras provenientes de três propriedades localizadas no estado de São Paulo.

Glândulas mamárias	Propriedade I		Propriedade II		Propriedade III		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Sadias	66	88,0	50	89,3	47	73,4	163	83,6
Mastite subclínica	9	12,0	6	10,7	17	26,6	32	16,4
Total	75	100	56	100	64	100	195	100

Durante a realização do experimento foram isoladas 199 cepas em amostras de leite, dos tetos, das ordenhadeiras, de lesão em pele do teto, de mãos e de fossas nasais, as quais foram caracterizadas como sendo cocos Gram positivos, que se apresentaram positivas nos testes da catalase, sendo, portanto, classificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. No entanto, a amplificação do espaçador intergênico da região 16S-23S do RNA ribossomal não foi obtida em 56 cepas. Dessa forma, as análises posteriores foram realizadas com as 143 cepas restantes, as quais compreenderam 59 cepas isoladas em amostras de leite, 72 cepas em amostras de óstio papilar (tetos), seis cepas em insuflador da ordenhadeira, uma cepa de lesão em pele do teto e, por fim, quatro e uma cepas isoladas das fossas nasais e das mãos dos

ordenhadores, respectivamente. As cepas isoladas dos insufladores das ordenhadeiras foram provenientes da propriedade III a partir das amostras colhidas após a ordenha. Em nenhuma das propriedades foram isoladas cepas caracterizadas como *Staphylococcus* a partir das amostras das tonsilas dos ordenhadores e de água.

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos revelou que 90 (62,9%) cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, enquanto que as 53 (37,1%) cepas restantes puderam ser agrupadas em 9 padrões de resistência diferentes. Conforme consta na Tabela 4, o padrão de resistência Amp/ Pen foi o predominante e compreendeu 36 (25,2%) e 7 (4,9%) das 143 cepas testadas, quando analisado de forma particular ou em conjunto com a resistência aos demais antimicrobianos, respectivamente.

Tabela 4. Padrões de resistência de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas em leite, tetos, insufladores de ordenhadeira, ferida de pele do teto, mãos e fossas nasais de ordenhadores frente aos antimicrobianos testados.

Padrão	Fenótipo de resistência aos antimicrobianos	Número de isolados	Origem
1	Sut	1	Tetos
2	Pen	1	Tetos
3	Amp	4	Leite (3) Tetos (1)
4	Te	4	Teto (2) Leite (1) FN (1)
5	Amp/ Pen	36	Leite (22) Tetos (11) IO (2) Mãos (1)
6	Amp/ Pen/ Ox	2	Leite (1) FN (1)
7	Amp/ Pen/ Te	2	Leite (1) FN (1)
8	Amp/ Pen/ Sut	2	Leite
9	Amp/ Pen/ Ox/ Te	1	FN
10	-	90	Tetos (56) Leite (29) IO (4) FP (1)
Total		143	Teto (72) Leite (59) IO (6) FP (1) FN (4) Mão (1)

* Ampicilina (Amp), Oxacilina (Ox), Penicilina (Pen), Sulfazotrim (Sut), Tetraciclina (Te).

IO= insufladores de ordenhadeira; FP= ferida de pele do teto; FN= fossas nasais.

O predomínio da resistência das cepas estudadas frente a ampicilina e a penicilina deve-se, provavelmente, a capacidade de produção de beta-lactamase pela maioria dos estafilococos isolados (ARCHER e CLIMO, 1994).

As 143 cepas testadas apresentaram 100% de sensibilidade ao cefoperazone, à gentamicina e à neomicina. De forma semelhante, LIMA JÚNIOR. et al. (1993) e MOTA et al. (2000) observaram em seus estudos que a gentamicina foi o antibiótico que apresentou 100% de eficácia quando testado frente as bactérias isoladas de casos de mastite subclínica caprina.

Deve-se salientar que, apesar da sensibilidade aos antimicrobianos observada *in vitro* no presente estudo, o tratamento e o controle da mastite acaba sendo prejudicado devido à ausência de formulações específicas para cabras. Novos protocolos utilizando dose e tempo de tratamento reduzidos vêm sendo estudados para a espécie caprina e os resultados são promissores uma vez que, além da eliminação das bactérias, há um menor prejuízo com descarte do leite durante o tratamento e a menor concentração de resíduos de antibióticos no leite consumido (CASTRO et al., 2001).

É preocupante constatar que estafilococos de origem humana apresentam resistência aos antimicrobianos utilizados em medicina veterinária, uma vez que eles podem participar da cadeia epidemiológica da mastite. Como pode ser observado na Tabela 4 as cepas isoladas das fossas nasais (FN) e das mãos das pessoas envolvidas na ordenha puderam ser agrupadas juntamente com as cepas isoladas de amostras de leite. Adicionalmente, observa-se a presença de uma cepa isolada das fossas nasais que apresentou resistência a quatro antimicrobianos testados, quais sejam, ampicilina, penicilina, oxacilina e tetraciclina.

Nas Tabelas 5, 6 e 7 podemos observar a distribuição dos diferentes padrões de resistência aos antimicrobianos para as propriedades I, II e III, respectivamente. Nota-se o predomínio do padrão 5 (Amp/ Pen) nas propriedades I e III.

Tabela 5. Padrões de resistência aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* spp. obtidas na propriedade I.

Padrão	Fenótipo de resistência aos antimicrobianos	Número de isolados	Origem
2	Pen	1	Teto
3	Amp	3	Leite (2) Teto (1)
4	Te	1	Teto
5	Amp/ Pen	12	Leite (6) Teto (5) Mão (1)
6	Amp/ Pen/ Ox	1	FN
10	-	16	Teto (13) Leite (2) FP (1)
Total		34	Teto (21) Leite (10) FN (1) FP (1) Mão (1)

FP= ferida de pele do teto; FN= fossas nasais.

Tabela 6. Padrões de resistência aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* spp. obtidas na propriedade II.

Padrão	Fenótipo de resistência aos antimicrobianos	Número de isolados	Origem
1	Sut	1	Teto
4	Te	1	FN
5	Amp/ Pen	2	Leite (1) Teto (1)
7	Amp/ Pen/ Te	2	Leite (1) FN (1)
8	Amp/ Pen/ Sut	2	Leite
10	-	59	Teto (40) Leite (19)
Total		67	Teto (42) Leite (23) FN (2)

FN= fossas nasais.

Tabela 7. Padrões de resistência aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* spp. obtidas na propriedade III.

Padrão	Fenótipo de resistência aos antimicrobianos	Número de isolados	Origem
3	Amp	1	Leite
4	Te	2	Leite (1) Teto (1)
5	Amp/ Pen	22	Leite (15) Teto (5) IO (2)
6	Amp/ Pen/ Ox	1	Leite
9	Amp/ Pen/ Ox/ Te	1	FN
10	-	15	Leite (8) Teto (3) IO (4)
Total		42	Leite (26) Teto (9) IO (6) FN (1)

IO= insufladores de ordenhadeira; FN= fossas nasais.

Nota-se, na propriedade III, o envolvimento de cepas isoladas dos insufladores da ordenhadeira (IO), resistentes à Amp/ Pen, que puderam ser agrupadas junto à cepas isoladas de amostras de leite e do óstio papilar, o que sugere a transmissão do agente durante o momento da ordenha.

Apesar da técnica do antibiograma ter utilidade em estudos epidemiológicos, nesse trabalho o método demonstrou um índice numérico de discriminação (D) igual a 0,54. Em contrapartida, a PCR-ribotipagem apresentou melhor poder discriminatório, com valor D igual a 0,81.

LANGE et al. (1999), estudando cepas de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina, também obtiveram melhor índice de discriminação para a técnica de PCR-ribotipagem ($D=0,85$) em relação ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos ($D=0,72$). Anteriormente, outros pesquisadores já haviam utilizado a PCR-ribotipagem com sucesso ($D=0,92$) na tipagem de cepas de *S. aureus* de origem humana, demonstrando que a técnica é eficiente em estudos epidemiológicos em casos de infecção hospitalar (DOLZANI et al., 1994).

Atualmente, a técnica de eletroforese em campo pulsátil (PFGE) tem sido considerada como a ferramenta de referência em estudos genotípicos, mas essa é uma

metodologia cara, demorada e trabalhosa, diferentemente da PCR-ribotipagem que é uma técnica mais rápida, simples e que apresenta resultados satisfatórios (OLIVEIRA e RAMOS, 2002).

Utilizando-se a PCR-ribotipagem, foram obtidos 12 padrões de amplificação distintos. Conforme consta na Tabela 8 o padrão 8 foi o mais freqüente encontrado entre as cepas submetidas ao estudo. Os padrões 10 e 12 agruparam somente cepas oriundas de leite enquanto que o padrão 6 agrupou somente cepas oriundas de óstio papilar. Os padrões 1, 4, 7, 9 e 11 agruparam tanto as cepas de leite como as de óstio papilar e os padrões 2, 3, 5 e 8 incluíram as cepas de origem humana.

Tabela 8. Padrões de amplificação da região intergênica 16S-23S do RNA ribossomal de acordo com a origem das cepas de *Staphylococcus* spp.

PCR-ribotipagem		Número de isolados
Padrão	Origem dos isolados	
1	Teto (2) Leite (1)	3
2	Teto (8) Leite (3) IO (2) FN (2)	15
3	Teto (1) FN (1)	2
4	Leite (5) Teto (2)	7
5	Leite (6) Teto (2) FN (1)	9
6	Teto (3)	3
7	Teto (5) Leite (4)	9
8	Leite (24) Teto (22) IO (4) Mão (1) FP (1)	52
9	Teto (2) Leite (1)	3
10	Leite (11)	11
11	Teto (25) Leite (2)	27
12	Leite (2)	2
Total	Teto (72) Leite (59) IO (6) FP (1) FN (4) Mão (1)	143

IO= insufladores de ordenhadeira; FP= ferida de pele do teto; FN= fossas nasais.

Nas Tabelas 9, 10 e 11 estão listados os padrões obtidos na PCR-ribotipagem para as propriedades I, II e III, respectivamente. Verificar que na propriedade I as cepas

isoladas de amostras de leite estão relacionadas às cepas oriundas de óstio papilar e não estão relacionadas às cepas de origem humana. Nas propriedades II e III algumas cepas de leite foram agrupadas isoladamente e, ainda, foram agrupadas junto às cepas de origem humana.

Na propriedade II, 56% (13) das cepas de leite foram agrupadas isoladamente, enquanto que na propriedade III apenas 30% (8) das cepas de leite não foram relacionadas junto às cepas de outras origens. Na propriedade I todas as cepas de leite foram agrupadas junto às cepas oriundas dos tetos. Ainda, na propriedade III, as cepas isoladas dos insufladores da ordenhadeira puderam ser relacionadas junto às cepas oriundas de amostras de leite. Uma vez que essas cepas foram isoladas após o término da ordenha, sugere-se a participação da ordenhadeira mecânica na veiculação de patógenos durante a mesma.

Tabela 9. Padrões de amplificação da região intergênica 16S-23S do RNA ribossomal das cepas de *Staphylococcus* spp. obtidas na propriedade I.

PCR-ribotipagem		Número de isolados
Padrão	Origem dos isolados	
1	Teto (2) Leite (1)	3
2	Teto	3
3	Teto (1) FN (1)	2
4	Leite (4) Teto (2)	6
5	Leite (5) Teto (2)	7
6	Teto	3
7	Teto	4
8	Teto (2) Mão (1) FP (1)	4
9	Teto	2
Total	Teto (21) Leite (10) FN (1) FP (1) Mão (1)	34

FP= ferida de pele do teto; FN= fossas nasais.

Tabela 10. Padrões de amplificação da região intergênica 16S-23S do RNA ribossomal das cepas de *Staphylococcus* spp. obtidas na propriedade II.

PCR-ribotipagem		Número de isolados
Padrão	Origem dos isolados	
2	Leite (2) Teto (1) FN (1)	4
4	Leite	1
5	Leite (1) FN (1)	2
7	Teto	1
8	Teto (15) Leite (5)	20
9	Leite	1
10	Leite	11
11	Teto (25) Leite (2)	27
Total	Teto (42) Leite (23) FN (2)	67

FN= fossas nasais.

Tabela 11. Padrões de amplificação da região intergênica 16S-23S do RNA ribossomal das cepas de *Staphylococcus* spp. obtidas na propriedade III.

PCR-ribotipagem		Número de isolados
Padrão	Origem dos isolados	
2	Teto (4) Leite (1) IO (2) FN (1)	8
7	Leite	4
8	Leite (19) Teto (5) IO (4)	28
12	Leite	2
Total	Leite (26) Teto (9) IO (6) FN (1)	42

IO= insufladores de ordenhadeira; FN= fossas nasais.

É interessante notar que os padrões 2, 7 e 8 aparecem nas três propriedades estudadas, incluindo cepas oriundas de amostras de leite, teto, fossas nasais e

ordenhadeira. Acredita-se que esse fato esteja relacionado com o trânsito dos animais entre os rebanhos e até mesmo com o contato entre os animais em feiras e leilões.

A ausência de literatura relacionada à epidemiologia molecular aplicada ao estudo da mastite caprina impossibilita a comparação desses achados com os de outros pesquisadores. A utilização de técnicas moleculares em estudos epidemiológicos relacionados à mastite bovina tem sido aplicadas com o intuito de genotipar bactérias do gênero *Staphylococcus* e avaliar sua persistência nos rebanhos (LIPMAN et al., 1996; AARESTRUP et al., 1999; RAIMUNDO et al., 1999), bem como para associar as cepas isoladas de leite às cepas de origem humana (ZADOKS et al., 2000)

Apesar do intenso avanço nas pesquisas utilizando técnicas de biologia molecular, são poucos os estudos relacionados à aplicabilidade da mesma em medicina veterinária preventiva, principalmente em nosso país onde a situação política e econômica dificultam a realização de pesquisas que exigem investimento em equipamentos e material de consumo relativamente caros.

Diante a diversidade da origem das cepas de *Staphylococcus* spp., percebe-se a dificuldade no controle da disseminação desse patógeno entre os animais, principalmente durante a ordenha, fato que pode explicar sua elevada prevalência nos casos de mastite subclínica em cabras.

No tocante à epidemiologia das mastites, os resultados obtidos a partir da utilização de técnicas moleculares vêm mostrar a importância da utilização de medidas higiênico-sanitárias rigorosas durante a ordenha, que vão desde a higiene e sanitização das mãos do ordenhador até a correta anti-sepsia dos tetos antes e após a ordenha. A limpeza e sanitização da ordenhadeira mecânica também são fundamentais no controle da mastite visto que ela faz parte da cadeia epidemiológica da mesma atuando na disseminação de patógenos.

V. CONCLUSÕES

1. A prevalência da mastite caprina foi de 12,0%, 10,7% e 26,6% nos rebanhos pertencentes às propriedades I, II e III, respectivamente;
2. *Staphylococcus* coagulase negativa foram isolados em 88,9%, 83,3% e 82,3% dos casos de mastite subclínica nas propriedades I, II e III, respectivamente.
3. O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos revelou que 100% das cepas de *Staphylococcus* estudadas foram sensíveis a gentamicina, a neomicina e ao cefoperazone;
4. Nos três rebanhos estudados observou-se relação entre as cepas isoladas de amostras de leite e óstio papilar;
5. Os resultados evidenciaram a participação de cepas de origem humana, principalmente as isoladas das fossas nasais, nos casos de mastite caprina;
6. Bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. podem ser transmitidas entre os animais durante a ordenha e os insufladores da ordenhadeira tem participação nessa disseminação;
7. A PCR-ribotipagem apresentou melhor capacidade de discriminação ($D=0,81$) que a técnica de susceptibilidade aos antimicrobianos ($D=0,54$);
8. A PCR-ribotipagem mostrou grande utilidade no estudo da mastite estafilocócica caprina, uma vez que permitiu evidenciar a relação epidemiológica existente entre as cepas isoladas;
9. Os resultados mostram a necessidade da aplicação de medidas higiênico-sanitárias rígidas durante a ordenha para prevenção e controle da mastite na espécie caprina.

VI. REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M.; LARSEN, H.D.; JENSEN, N.E. Characterization of *Staphylococcus simulans* strains isolated from cases of bovine mastitis. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 66, p.165-170, 1999.
- ABU-SAMRA, M. T. et al. Studies on gangrenous mastitis in goats. **Cornell Vet.**, Ithaca, v. 78, p. 281-300, 1988.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 18th ed., Washington, 1992.
- ARCHER, G.L.; CLIMO, M.W. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.38, n. 10, p.2231-2237, 1994.
- BARCELLOS, T.F.S.; SILVA, N.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Mamite caprina em rebanhos próximos à Belo Horizonte – Minas Gerais. I – etiologia e sensibilidade a antibióticos. II – Métodos de diagnóstico. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.39, p.307-315, 1987.
- BARROS, G.C.; LEITÃO, C.H. Influência da mastite sobre as características físico-químicas do leite de cabra. **Pesq. Vet. Bras.**, Seropédica, v. 12, p. 45-48, 1992.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; TRUCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol.**, Hagerstown, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BELKUM, A. et al. Dissemination of a single clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Turkish hospitals. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, n. 4, p. 978-981, 1997.

BEZEK, D.M.; HULL, B.L. Peracute gangrenous mastitis and cheilitis associated with enterotoxin –secreting *Staphylococcus* spp. in a goat. **Can. Vet. J.**, Ottawa, v. 36, p. 106-107, 1995.

BOSCOS, C. et al. Prevalence of subclinical mastitis and influence of breed, parity, stage of lactation and mammary bacteriological status on coulter counts and california mastitis test in the milk of saanen and autochthonous greek goats. **Small Rum. Res.**, Amsterdam, v. 21, p. 139-147, 1996.

CARLES-NURIT, M. J. et al. DNA polymorphisms in methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 30, n. 8, p.2092-2096, 1992.

CASTRO, M.V.; LANGENEGGER, M.C.E.H.; LANGENEGGER, J. Ocorrência e caracterização de estafilococos coagulase negativos em leite de cabras no estado do Rio de Janeiro. **Semina: Cien. Agr.**, Londrina, v. 13, p. 15-17, 1992.

CASTRO, F.J.C. et al. Avaliação de dois protocolos de tratamento da mastite clínica e subclínica de cabras, utilizando diferentes dosagens de Gentocin Mastite 150 mg. **Hora Vet.**, Porto Alegre, v. 20, n. 120, mar/abr, p.15-18, 2001.

CONTRERAS, A. et al. Persistence of subclinical intramammary pathogens in goats throughout lactation. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.80, n.11, p.2815-9, 1997a.

CONTRERAS, A. et al. Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual goats. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v.80, p.1113-8, 1997b.

CUNY, C.; CLAUS, H.; WITTE, W. Discrimination of *S. aureus* by PCR for r-RNA gene spacer size polymorphism and comparison to *Sma*I macrorestriction patterns. **Zentralbl. Bakteriol.**, Stuttgart, v. 283, p. 466-476, 1996.

DEINHOFER, M.; PERNTHANER, A. *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.43, p. 161-166, 1995.

DOLZANI, L., TONIN, E., LAGATOLLA, C., MONTI-BRAGADIN, C. Typing of *Staphylococcus aureus* by amplification of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.119, p. 167-174, 1994.

DULIN, A.M. et al. Effect of parity, Stage of lactation, and intramammary infection on concentration of somatic cells and cytoplasmic particles in goat milk. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 66, p. 2426-2433, 1983.

EAST, N.E.; BIRNIE, E.F.; FARVER, T.B. Risk factors associated with mastitis in dairy goats. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 48, p. 776-779, 1987.

FORSMAN, P.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA apacer regions. **Microbiology**, New York, v. 143, p. 3491-3500, 1997.

FRENAY, H. et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. on the basis of protein A gene polymorphism. **Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.**, Munich, v. 15, p.60-64, 1996.

GUHA, C. et al. Studies on the incidence and diagnosis of sub-clinical and clinical mastitis in goats and *in vitro* sensitivity of the isolated pathogens. **Ind. Vet. J.**, Madras, v. 66, p. 601-604, 1989.

GUSS, S.B. Dairy goat herd health problems. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 167, p.1076-1079, 1975.

HARMON, R.J.; LANGLOIS, B.E. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. **Agri-Practice**, Santa Barbara, v.10, p. 29, 1989.

HOOKEY, J.V.; RICHARDSON, J.F.; COOKSON, B.D. Molecular typing of *Staphylococcus* spp. based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **J.Clin.Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 4, p. 1083-1089, 1998.

HUNTER, A.C. Microflora and somatic cell content of goat milk. **Vet. Rec.**, London, v. 114, p. 318-320, 1984.

HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 26, p. 2465-2466, 1988.

ICHIYAMA, S. et al. Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field eletrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 29, n. 12, p. 2690-2695, 1991.

INGAWA, K.; ADKINSON, R.; GOUGH, R. Evaluation of a gel teat cleaning and sanitizing compound for premilking hygiene. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 75, p.1224-1232, 1992.

KALOGRIDOU-VASILIADOU, D.; MANOLKIDIS, K.; TSIGOIDA, A. Somatic cell counts in relation to infection status of the goat udder. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 59, p. 21-28, 1992.

KAWANO, J. et al. Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 9, p. 2072-2077, 1996.

KLOOS, W.; LAMBE JR, D. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A. et al. (Ed.): **Manual of Clinical Microbiology**, 5. ed., Washington: American Society for Microbiology, 1991, p.222-237.

KOSTMAN, J. et al. A universal approach to bacterial molecular epidemiology by polymerase chain reaction ribotyping. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 171, p. 204-208, 1995.

LANGE, C. et al. Molecular subtyping os *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 67, p. 127-141, 1999.

LIMA JÚNIOR, A.D.; NADER FILHO, A.; VIANNI, M.C.E. Sensibilidade "in vitro" dos *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase negativos, isolados em casos de mastite caprina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 45, p. 291-296, 1993.

LIMA JÚNIOR, A.D.; NETO, J.D.B.; VIANNI, M.C.E. Mastite caprina gangrenosa de evolução hiperaguda causada por *Staphylococcus* spp. – relato de caso. **Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro**, jan/jun, p. 21-27, 1992.

LIMA JÚNIOR, A. D.; VIANNI, M. C. E. Correlação entre o California Mastitis Test, a contagem global de células somáticas e o exame bacteriológico no leite de cabras. **Rev. Univ. Rural, Sér., Ciênc. Vida**, v. 17, n. 1, p. 7-13, 1995.

LIPMAN, L.J.A. et al. Genotyping by PCR of *Staphylococcus aureus* strains isolated from mammary glands of cows. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 48, p.51-55, 1996.

MAISI, P.; RIIPINEN, I. Pathogenicity of different species of staphylococci in caprine udder. **Br. Vet. J.**, London, v. 147, p. 126-132, 1991.

MANSEER, P.A. Prevalence, causes and laboratory diagnosis of subclinical mastitis in the goat. **Vet. Rec.**, London, may, p. 552-554, 1986.

McDONALD, J. et al. Studying the effects of backflushing milking units. **Vet. Med.**, p. 382-386, 1993.

MORVAN, A. et al. Contribution of a typing method based on IS256 probing of *Sma*-digested cellular DNA to discrimination of European phage type 77 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, n. 6, p. 1415-1423, 1997.

MOTA, R.A., et al. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Hora Vet.**, Porto Alegre, v. 19, n. 114, p.26-29, 2000.

MYLLYS, V. et al. Effect of abrasion of teat orifice epithelium on development of bovine staphylococcal mastitis. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 77, n. 2, p. 446-452, 1994.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing** . Approved standard M7-A5. Villanova, 2000.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Laboratory and field handbook on bovine mastitis**. Arlington, 1987.

NISHIJIMA, S. et al. *Staphylococcus aureus* in the anterior nares and subungual spaces of the hands in atopic dermatitis. **J. Int. Med. Res.**, W. Sussex, v. 25, p. 155-158, 1995.

OLIVEIRA, A.M.; RAMOS, M.C. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirao Preto, v. 35, p. 175-180, 2002.

- PIERRE, J. et al. Presence of an additional penicillin-binding protein in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans* with a low affinity for methicillin, cephalothin and cafamandole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 34, n. 9, p. 1691-1694, 1990.
- POUTREL, B. *Staphylococcus sciuri* subsp *lentus* associated with goat mastitis. **Am. J. Vet. Res.**, Schaumburg, v. 45, n. 10, p. 2084-2085, 1984.
- POUTREL, B.; LERONDELLE, C. Cell content of goat milk: california mastitis test, coulter counter, and fossomatic for predicting half infection. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 66, p. 2575-2579, 1983.
- POUTREL, B. et al. Control of intramammary infections in goats: impact on somatic cell counts. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v. 75, p. 566-570, 1997.
- RAIMUNDO, O. et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.66, p. 275-284, 1999.
- RIBEIRO, M. G. et al. Mastite caprina. Estudo microbiológico, físico-químico e do diagnóstico através de provas indiretas. **Biológico**, São Paulo, v. 61, n. 1, p. 27-33, 1999.
- RYAN, D. P.; GREENWOD, P. L. Prevalence of udder bacteria in milk samples from four dairy goat herds. **Austr. Vet. J.**, Brunswich, v. 67, n. 10, p. 362-363, 1990.
- SANDHOLM, M.; PYÖRÄLÄ, S. Coliform Mastits. In: SANDHOLM, M. et al.. **The Bovine Udder and Mastitis**, Helsinki, 1995. p.149.
- SMITH, M.C.; ROGUINSKY, M. mastitis and other diseases of the goat's udder. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Scaumburg, v. 171, p. 1241, 1977.
- STEHLING, R.N. et al. Estudo da evolução da mamite caprina induzida por enterotoxina estafilocócica e estreptocócica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 38, p. 701-717, 1986.

SUNG, Y. Y.; WU, T. I.; WANG, P.H. Evaluation of milk quality of Alpine, Nubian, Saanen and Toggenburg breeds in Taiwan. **Small Rum. Res.**, Amsterdam, v. 33, p. 17-23, 1999.

TEIXEIRA, L.A. et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus* spp. clone in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 9, p. 2400-2404, 1995.

TENOVER, F., C. et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p.407-415, 1994.

UDO, E.E. et al. Molecular characterization of epidemic ciprofloxacin and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains colonizing patients in an intensive care unit. **J. Clin. Microbiol.**, Amsterdam, v. 34, n. 12, p. 3242-3244, 1996.

ZADOKS, R. et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, Amsterdam, v. 38, n. 5, p.1931-1939, 2000.