

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS DE
Staphylococcus aureus E ESTAFILOCOCOS
COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS DE LEITE
BOVINO E DE TANQUES DE REFRIGERAÇÃO
COMUNITÁRIOS PROCEDENTES DE PEQUENAS
PROPRIEDADES DA REGIÃO DE BAURU-SP**

FÁBIO ALMEIDA DE LEMOS

Botucatu - SP
Abril/2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS DE
Staphylococcus aureus E ESTAFILOCOCOS
COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS DE LEITE
BOVINO E DE TANQUES DE REFRIGERAÇÃO
COMUNITÁRIOS PROCEDENTES DE PEQUENAS
PROPRIEDADES DA REGIÃO DE BAURU-SP**

FÁBIO ALMEIDA DE LEMOS

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Baldini
Lucheis

Botucatu - SP

Abril/2015

Nome do Autor: Fábio Almeida de Lemos

Título: DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS DE *Staphylococcus aureus* E ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS DE LEITE BOVINO E DE TANQUES DE REFRIGERAÇÃO COMUNITÁRIOS PROCEDENTES DE PEQUENAS PROPRIEDADES DA REGIÃO DE BAURU - SP

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Simone Baldini Lucheis

Presidente e Orientadora

Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

APTA – Centro Oeste – Bauru

Prof. Dr. Hélio Langoni

Membro

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a Dr^a Renata Bonini Pardo

Membro

Departamento de Tecnologia de Alimentos

FATEC – Marília – São Paulo

Data da Defesa: 30 de abril de 2015.

*D*EDICATÓRIA

LEMOS, F. A.

Dedico,

À minha família.

Minha amada esposa Ana Paula por todo incentivo, apoio, amor e sacrifício compartilhado nesta jornada.

Aos meus filhos Laura e Murilo que me despertam um amor incondicional.

Ao meu grande Pai, Helson Lemos que sempre apoiou e estimulou minha escolha profissional que “vem de berço” e acertadamente me fez orgulhoso e realizado na minha profissão. E por ser um grande exemplo para minha vida.

A minha mais que querida Mãe Zulma, pelo inesgotável carinho, atenção e apoio de todas as formas, cheguei até aqui graças a vocês!

*A*GRADECIMENTOS

LEMOS, F. A.

Agradeço

Primeiramente a Deus, pela fé que me faz acreditar nas pessoas e me move com otimismo e alegria.

A minha querida sogra, Dona Didi, que tanto cuida de tudo a minha volta para que não perca a concentração e pelos cafezinhos na hora certa!!

A toda equipe do APTA, que torna o ambiente de trabalho leve e produtivo. Especialmente a Maria Fernanda e a Miriam, pelos ensinamentos e contribuições essenciais na área de biomol. Sem esquecer dos stand ups nas horas vagas!!

A Gabriela, Wesley e Livia sempre prontos para ajudar, conviver com vocês faz bem...

Ao professor **José Carlos Pantoja**, pelas contribuições imprescindíveis na qualificação.

Agradeço ao professor **Hélio Langoni** pelos momentos em sala de aula pelas contribuições na qualificação e por tudo o que ensinou a minha orientadora, pois desta forma indireta também desfrutei de seus ensinamentos.

Agradeço especialmente a minha orientadora, Dra. **Simone Baldini Lucheis**, por ter despertado este sonho adormecido, de voltar ao mundo acadêmico e quem sabe poder ajudar na formação de outros profissionais. Pela confiança, paciência, e por tudo que me ensinou! Muito obrigado!!!

*“O conhecimento abre portas ,desvenda mistérios,
esclarece as dúvidas, eleva o homem e deve ser
compartilhado.”*

*L*ISTA DE *T*ABELAS

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1. Microrganismos isolados de amostras de leite bovino com mastite subclínica, em cultura pura ou em associação procedentes de dez pequenas propriedades leiteiras da região de Bauru-SP, Botucatu-SP 2015.....	50
TABELA 2. Estafilococos coagulase positivos (ECP), isolados de casos mastite subclínica bovina, procedentes de dez pequenas propriedades leiteiras da região de Bauru-SP, Botucatu-SP 2015.....	51
TABELA 3. Estafilococos coagulase negativos (ECN), isolados de casos de mastite subclínica bovina, procedentes de dez pequenas propriedades leiteiras da região de Bauru-SP, Botucatu-SP 2015.....	52
TABELA 4. Distribuição dos isolamentos de <i>Staphylococcus</i> spp, em amostras de leite com mastite subclínica, nos dez rebanhos de pequenas propriedades leiteiras da região de Bauru-SP, Botucatu-SP 2015.	53
TABELA 5. Antibiógrama com resultados em porcentagem, de resistência de estafilococos coagulase positivos (ECP) e estafilococos coagulase negativos (ECN) isolados de casos de mastite subclínica, procedentes de dez pequenas propriedades leiteiras da região de Bauru-SP, Botucatu-SP 2015.....	54
TABELA 6. Detecção de genes de enterotoxinas, <i>sea</i> ; <i>seb</i> ; <i>sec</i> e <i>sed</i> por PCR em amostras de leite com mastite subclínica, de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp e de tanques de refrigeração de pequenas propriedades leiteiras da região de Bauru, SP. Botucatu, 2015.....	56
TABELA 7. Detecção de genes de enterotoxinas, <i>sea</i> ; <i>seb</i> ; <i>sec</i> e <i>sed</i> por PCR em amostras de leite com mastite subclínica por <i>Staphylococcus</i> spp de pequenas propriedades da região de Bauru, SP. Botucatu, 2015	56

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

Página

QUADRO 1. Sequência das bases, localização dentro dos genes e tamanho previsto do produto amplificado pelos oligonucleotídeos toxina-específicos. Bauru, SP, 2015.....	46
--	----

*L*ISTA DE *F*IGURAS

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1. Gel de agarose a 1% corado com Syber Safe®. Resultados da amplificação de genes das toxinas C (*sec*) de oito amostras de leite com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp procedentes de dez pequenas propriedades leiteiras da região de Bauru-SP. Nota-se a detecção do gene codificador de enterotoxina *sec* (257 pb) na amostra de número 5 e 7. Controle positivo para o gene *sec*: DNA de *S. aureus* ATCC 19095; Peso molecular padrão para DNA (100 pb - Invitrogen®). Controle negativo: água mili Q.

..... 57

FIGURA 2. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Syber Safe®. Resultados de amplificação de genes das toxinas A (*sea*) de 23 amostras de leite obtidas diretamente dos tetos das vacas de dez pequenas propriedades da região de Bauru-SP. Nota-se a detecção do gene codificador de enterotoxina *sea* (120 pb) nas amostras de número 1; 2; 3; 4; 6; 7; 11; 14; 15; 16; e 23. Controle positivo para o gene *sea*: DNA de *S. aureus* ATCC 13565; Peso molecular padrão para DNA (100 pb - Invitrogen®). Controle negativo: água mili-Q.

..... 58

*L*ISTA DE
*A*BBREVIATURAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem	M	molar
CMT	Califórnia Mastitis Test	mL	mililitros
IMI	infecção intramamária	mm	milímetros
ECP	Estafilococos coagulase positivo	µL	microlitros
ECN	Estafilococos coagulase negativo	mM	milimolar
CCS	contagem de células somáticas	mg	miligramas
DNA	ácido desoxirribonucleico	L	litros
CIM	concentração mínima inibitória	g	gramas
NMC	National Mastitis Council	µg	microgramas
PBS	solução salina tamponada	GFX	Genomic blood DNA Purification Kit
pH	potencial hidrogeniônico	BHI	Brain Heart Infusion
UI	unidades internacionais	TE	Tris EDTA
ATCC	American Type Culture Collection	PCR	Polymerase Chain Reaction
IN	Instrução Normativa	pmol	picomol
°C	graus centígrados	<i>sea</i>	gene codificador toxina A
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute	<i>seb</i>	gene codificador toxina B
WHO	World Health Organization	<i>sec</i>	gene codificador toxina C
ABPL	Associação Brasileira de Produtores de leite	<i>sed</i>	gene codificador toxina D
APTA	Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios	UV	Ultra violeta
OR	Odds ratio	MRS	Estafilococos metilicina resistentes
Nm	nanômetros	MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistentes
rpm	rotações por minuto		

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DA LITERATURA	28
3 OBJETIVOS.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 Propriedades rurais.....	41
4.2 Coleta leite dos animais.....	41
4.3 Coleta do leite dos tanques de resfriamento.....	42
4.4 Cultivo microbiológico.....	42
4.5 Identificação de estafilococos coagulase positivos (ECP) e coagulase negativos (ECN)	43
4.6 Protocolo de congelamento de bactérias.....	44
4.7 Perfil de sensibilidade a antimicrobianos	44
4.8 Detecção dos genes codificadores de enterotoxinas <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> e <i>sed</i> a partir de amostras de leite de mastites subclínicas; das cepas de estafilococos e dos tanques de resfriamento.....	44
4.8.1 Extração do DNA dos casos de mastite subclínica e dos tanques de resfriamento	45
4.8.2 Extração do DNA das cepas de <i>Staphylococcus</i> spp isolados do leite dos tetos e dos tanques de resfriamento	45
4.8.3 Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificadores enterotoxinas ..	45
4.8.4 Visualização dos produtos amplificados.....	46
5 DETECÇÃO GENE <i>mecA</i> DOS CASOS DE MASTITE SUBCLÍNICA; DAS CEPAS DE ESTAFILOCOCOS ISOLADAS E DOS TANQUES DE RESFRIAMENTO	47
5.1 Extração do ácido nucleico	47
5.2 Amplificação do ácido nucleico (PCR)	47

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
7 RESULTADOS	49
8 DISCUSSÃO	59
9 CONCLUSÃO	70
10 BIBLIOGRAFIA	72
11 TRABALHO CIENTÍFICO.....	84
12 ANEXOS	104
13 APÊNDICE.....	108

*R*ESUMO

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo o isolamento de *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos (ECN), associados com casos de mastite subclínica, a partir de amostras de leite de 134 vacas, em dez pequenas propriedades leiteiras familiares, da região de Bauru – SP, determinar a susceptibilidade a antimicrobianos e investigar a presença de genes de enterotoxinas e do gene *mecA* de resistência à oxacilina, dos casos de mastite subclínica, a partir das cepas bacterianas isoladas do leite dos animais, e dos tanques de resfriamento. Isolaram-se 105 amostras de *Staphylococcus* spp, sendo 55 (52,4%) estafilococos coagulase positivos (ECP) e 50 (47,6%) ECN. Entre os ECP, *S.aureus* foi isolado em 48 (87,3%) dos casos. Das 12 espécies de ECN isoladas, as mais frequentes foram *S. warneri*, *S. hyicus*, e *S. xylosus*. Os maiores níveis de resistência, foram observados frente ao grupo dos beta-lactâmicos tanto para os ECP - 92,7% para penicilina e 90,9% para ampicilina, como para os ECN - 56% e 52% de resistência, respectivamente. Todas as amostras de ECP foram sensíveis a cefalexina, e 96% dos isolados de ECN a enrofloxacin. Em relação à presença de genes codificadores de enterotoxinas, dos casos de mastite subclínica, 17/142 (12%) foi positiva para algum dos genes estudados. O gene *sea* foi o mais prevalente, sendo detectado em 11 (7,7%). O gene *seb* em 05 (3,5%) e o *sec* em 01 (0,7%) das amostras. Todas foram negativas para o gene *sed*. Dos *Staphylococcus* spp isolados das mastites subclínicas, houve detecção do gene *sec* em 8/105 (7,6%), sendo que cinco (4,7%) eram ECP, e três (2,8%) ECN. Das 10 amostras de leite dos tanques, duas (20%) foram positivas para *sea* e uma (10%) para *seb*. O gene *mecA* foi detectado em três cepas de *S. aureus*, (6,2%). A identificação de genes codificadores de enterotoxinas em casos de mastite subclínica e em tanques comunitários, sinalizam a importância do monitoramento destes agentes visando a segurança alimentar. A presença do gene *mecA* em cepas de *S.aureus* demonstram a necessidade de estudos a fim de proporcionar estratégias para minimizar o impacto em saúde pública e animal.

Palavras-chave: mastite, bovino, enterotoxinas, estafilococcia, diagnóstico microbiológico.

*A*bstract

ABSTRACT

This study aimed at the isolation of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci, from bovine milk samples, associated with cases of subclinical mastitis detected in ten small properties from Bauru – SP. Also, determine the antimicrobial susceptibility of the agents isolated and to investigate the presence of enterotoxin gene and the *mecA* gene of oxacillin resistance from the bacterial strains, and milk samples from bulk tanks. Of 105 samples obtained, 55 (52.4 %) were coagulase positive *staphylococcus* (CPS) and 50 (47.6%) coagulase negative *staphylococcus* (CNS). Among the CPS, *S. aureus* was isolated in most cases, 48 (87.3 %). Of the 12 CNS species isolated, the most frequent were *S. warneri*, *S. hyicus*, both with 8 (16%) and *S. xylosus* 7 (14%). The highest levels of antibiotics resistance were observed for the group of β - lactam antibiotics – penicillin 92.7% and ampicillin 90.9% CPS and ECN - 56 % and 52 % respectively. The greatest sensitivity of the CPS strains was to cephalexin, and for CNS isolates to enrofloxacin. From the cases of subclinical mastitis, genes encoding enterotoxins were found in, 17/142 (12%). The *sea* gene was the most prevalent being detected in 11 (7.7 %). The *seb* gene was detected in five (3.5%) samples, and in one *sec* (0.7%). All were negative for *sed* gene. When we consider the results directly from cultures of *Staphylococcus* spp. isolated from subclinical mastitis, there was only the gene *sec* in 8/105 (7.6%). From these isolates of *Staphylococcus* spp., positive for *sec* 05/105 (4.8%) were CPS, (03 *S. aureus* and 02 *S. intermedius*) and 03/105 (2.8%) CNS, (01 *S. xylosus*, 01 *S. hyicus* and 01 *S. lugdunensis*). To *sea*, *seb* and *sed* samples were negative. Of the ten samples from the bulk tanks, 02/10 (20%) were positive for *sea* and 01/10 (10%) to *seb*. The *mecA* gene was detected in three strains of *S. aureus*, representing 6.2% of the total of 48 *S. aureus* strains isolated. The identification of genes encoding enterotoxins in cases of staphylococcal subclinical mastitis and community bulk tanks, highlight the importance of monitoring these agents for food security of consumers. The presence of the *mecA* gene resistance in *S. aureus* strains demonstrate the need for studies to provide the development of strategies to minimize their impact on public and animal health.

Keywords: mastitis, bovine, enterotoxin, staphylococci, microbiological diagnosis.

*I*NTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento amplamente utilizado na dieta humana, principalmente de crianças e idosos, devido a sua importância nutritiva, o que exige uma atenção maior quanto a inocuidade do produto. O leite fornecido pelas propriedades rurais determina em grande parte a qualidade dos produtos lácteos que chegam aos consumidores (PHILPOT, 1998).

A mastite é uma das enfermidades mais comuns em rebanhos bovinos leiteiros, sendo responsável por grande utilização de antimicrobianos em uma propriedade rural. Diversos patógenos já foram associados com a mastite bovina, estando os do gênero *Staphylococcus* entre os mais importantes. Embora as enterotoxinas sejam produzidas principalmente por estafilococos coagulase positivos (ECP), alguns estafilococos coagulase negativos (ECN), envolvidos em uma variedade de infecções animais e humanas, têm tomado importância (CUNHA et al., 2006).

Na atualidade, a questão da “qualidade e segurança” dos alimentos, tem recebido maior atenção por parte das autoridades, indústrias, profissionais envolvidos, produtores e consumidores de modo geral. Embora o processo de pasteurização assegure a destruição de grande parte dos microrganismos patogênicos, se presentes no leite cru, as enterotoxinas estafilocócicas podem permanecer no leite pasteurizado e seus derivados, devido à sua alta estabilidade térmica. Tanques comunitários, pequenos produtores sem a devida capacitação, e a venda informal de leite podem ser importantes nesta epidemiologia.

No contexto da epidemiologia molecular, as técnicas moleculares podem ser aplicadas tanto para o hospedeiro quanto para os agentes causadores de enfermidades. Quando utilizada para fins de epidemiologia de doenças infecciosas, os objetivos das técnicas moleculares incluem a identificação dos microrganismos e de suas fontes, as suas relações biológicas, suas vias de transmissão e o estudo de genes responsáveis por suas características, como virulência. Em casos de mastites, as técnicas moleculares têm sido utilizadas para diferenciar infecções persistentes de casos de novas infecções, estudar genes de virulência e para monitorar fontes de patógenos causadores de

intoxicações alimentares em humanos, bem como a resistência aos antimicrobianos (ZADOKS, 2002).

A relevância do presente projeto fundamenta-se na necessidade de avaliação do risco da mastite estafilocócica na segurança alimentar de consumidores de leite, pela identificação das enterotoxinas , bem como da presença do gene *mecA* de resistência, a fim de proporcionar o desenvolvimento de estratégias para minimizar seu impacto na saúde pública e animal.

REVISÃO DA LITERATURA

LEMOS, F. A.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Além da sua importância nutricional, deve-se ressaltar que o leite é o sexto produto do agronegócio brasileiro, (superando o café e arroz). Este segmento do agronegócio é responsável por gerar mais de 3.600.000 empregos diretos. Guimarães (2006) com base em dados disponibilizados pela International Dairy Federation (IDF-2005) referiu que o Brasil está entre os seis maiores produtores mundiais de leite. Em 2013 foram produzidos cerca 35 bilhões de litros, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 24,7 bilhões oriundos de estabelecimentos com inspeção federal, estadual ou municipal (IBGE, 2014).

Os produtores de leite nacionais são bastante heterogêneos quanto ao sistema de produção, capacidade de produção, e emprego de tecnologia. O levantamento dos top 100 produtores 2015 (Milkpoint, 2015), apontam uma média de produção de 15.161 kg/leite/dia. Por outro lado, 58% da produção nacional de leite é atribuída a pequenos e médios produtores, segundo o Censo Agropecuário (IBGE, 2006).

Visando estabelecer critérios mínimos de qualidade, segurança e identidade do leite cru, no Brasil em 2002, entrou em vigor a Instrução Normativa 51 (IN 51), implementando, entre outras, a coleta a granel e o resfriamento do leite nas propriedades a 4°C, em tanques individuais ou comunitários (BRASIL,2002). Em 2011, a IN 51 foi revogada e substituída pela IN 62 que estabeleceu padrões mais rigorosos quanto a higiene de produção e condições de saúde das vacas (BRASIL,2011).

Apesar de proibido no Brasil desde 1952 estima-se que cerca de 30% da produção nacional de leite é comercializada informalmente, ou seja, sem inspeção sanitária (CONAB, 2013). Ainda que o mercado ofereça várias opções, sabe-se que uma grande parcela da população ainda consome leite cru evidenciando a importância da opinião do consumidor nessa questão (BADINI et al.,1996) O leite pode representar uma importante via de transmissão de enfermidades transmitidas por alimentos, já que, sem tratamento adequado, possui uma série de microrganismos patogênicos (NERO et al., 2003). Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes patógenos, podendo levar a doenças, manifestadas por ação dos

microrganismos ou por suas toxinas. Todos os alimentos deveriam ser objeto de exames microbiológicos, que reflitam as condições higiênicas relacionadas com a produção, armazenamento, transporte e manuseio, a fim de elucidar a ocorrência de enfermidades transmitidas por meio dos alimentos. O leite, independente de sua origem, deve garantir qualidade e inocuidade ao consumidor (STAMFORD et al., 2006).

Muitas intoxicações alimentares têm etiologia conhecida, podendo ocorrer nos países em desenvolvimento e nos desenvolvidos. Qualquer tipo de alimento pode dar origem a um surto de intoxicação, entretanto os surtos associados a alimentos industrializados têm recebido grande difusão e atenção, enquanto que os casos individuais ocorridos em lares, bares e restaurantes são menos relatados ao público devido a falta de notificação ao poder público pela população em geral (STAMFORD et al., 2006). O leite mastítico, é um potencial causador de intoxicações alimentares (BALABAN et al., 2000).

A mastite é uma resposta inflamatória da glândula mamária, sendo a infecção mais freqüente de bovinos leiteiros. As perdas econômicas são causadas pela diminuição na produção de leite, comprometimento funcional da glândula mamária, descarte prematuro de fêmeas, custos com mão-de-obra e reposição do rebanho, honorários profissionais, medicamentos, descarte de leite de animais sob tratamento antimicrobiano, morte ou descarte precoce de animais, queda na qualidade do produto final e diminuição no rendimento industrial para fabricação dos seus derivados devido às alterações na composição do leite mastítico (LANGONI, 1995; COSTA, 1998; RADOSTITS et al., 2007). Além de possíveis abortos no primeiro trimestre de gestação de animais com mastite clínica e gastos com medidas de controle. Estimativas em vários países calculam perdas da ordem de 10 a 15% da produção e cerca de 2/3 destas são devido a queda de produção de leite de animais acometidos (RADOSTITS et al., 2007; SANTOS e FONSECA, 2007).

Geralmente a mastite é detectada pelos seus sinais clínicos, na maioria das vezes anormalidades no leite. Existem também alterações patológicas no tecido glandular mamário. A enfermidade é geralmente local, porém pode se tornar sistêmica principalmente logo após o parto, onde ocorrem casos graves

de mastites septicêmicas que muitas vezes podem ser fatais (HILLERTON e BERRY, 2005).

Nas infecções crônicas, os sinais clínicos não são visíveis. Esta forma é denominada mastite subclínica, e o seu diagnóstico é obtido por testes indiretos que se baseiam na contagem de células somáticas (CCS) presentes no leite. A mastite subclínica, em geral, aumenta a contagem de células somáticas, reduzindo a produção de leite, e aumentando a contagem de bactérias no leite. Esses fatores contribuem para reduzir o valor do leite, em termos monetários (HILLERTON e BERRY, 2005).

O California Mastitis Test (CMT) é o método mais barato e confiável para detecção de animais com mastites subclínicas. Este teste foi desenvolvido em 1957 e baseia-se em um detergente que reage com o DNA no núcleo das células e com um indicador de pH que muda de coloração quando o pH do leite chega a um valor maior do que o seu normal de 6,6. O leite de animais mastíticos normalmente possui um pH igual ou maior a 6,8 (RADOSTITS et al., 2007).

Vários agentes etiológicos podem causar a mastite, como por exemplo, fungos, leveduras, algas e bactérias, estando estas últimas entre as mais frequentes. O gênero *Staphylococcus* inclui organismos comumente isolados de casos de mastite, sendo o *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) um dos principais (ZECCONI et al., 2006; PYORALA et al, 2009), encontrando-se em membranas mucosas da maioria dos animais de sangue quente, incluindo o homem.

A contaminação dos alimentos por *S. aureus* pode ser de natureza exógena, como exemplo, quando transmitidos aos alimentos por manipuladores de alimentos (na maioria, portadores assintomáticos), seja pelo contato manual ou via trato respiratório, bem como de forma endógena por animais infectados, como vacas leiteiras com mastite (BALABAN et al., 2000).

As mastites causadas pelo *S. aureus* são caracterizadas por apresentarem baixa resposta ao tratamento e alta recidiva, quando comparado a outros microrganismos, e este fenômeno pode estar associado à habilidade de produzir biofilme (SZWEDA, et al., 2014). Este microrganismo sobrevive bem no ambiente de indústrias alimentícias, onde pode se tornar parte da microbiota dos equipamentos de processamento, agindo como fonte de

contaminação ou recontaminação. Geralmente é detectado em alimentos de origem animal, como na carne crua ou no leite cru dos tanques de refrigeração. O leite cru é um veículo importante de transmissão de agentes patogênicos e altas porcentagens de amostras positivas para *S. aureus*, podem ser isoladas do teto ou dos tanques de refrigeração (SORIANO et al., 2002).

O leite de animais infectados constitui uma das principais fontes de *S. aureus* enterotoxigênico de origem animal (GILMOUR e HARVEY. , 1990; da SILVA et al., 2005). *S. aureus* é um dos principais responsáveis por surtos toxinfecções por alimentos em humanos. É capaz de produzir uma grande quantidade de fatores de virulência secretados e associados a superfície das células; entretanto, a intoxicação alimentar estafilocócica é dependente da produção de enterotoxinas (LE LOIR et al., 2003).

As enterotoxinas de *S. aureus* são capazes de causar intoxicação alimentar, mesmo após tratamento térmico (SMITH et al., 1983; SORIANO et al., 2002). Além de produzir diversas enterotoxinas, com eficiência, estas são responsáveis por intoxicações alimentares em humanos e estão envolvidas em outras infecções, como por exemplo a mastite (RALL et al., 2014).

No Irã, Rahimi (2013), isolou *S.aureus* de tradicionais derivados do leite , como queijo, sorvete, requeijão e manteiga, com detecção de cepas enterotoxigênicas e multidrogas-resistentes, evidenciando seus riscos a saúde pública. As enterotoxinas nos alimentos podem causar vômito, diarreia, e ser fatal para crianças e idosos (BAUMGARTNER et al., 2014). O leite e seus derivados são responsáveis por 5% dos casos de surtos de intoxicação alimentar na Europa (BIANCHI et al., 2014). Nos Estados Unidos em casos de surtos alimentares a enterotoxina estafilocócica é comumente isolada, sendo relatado anualmente uma média de 185 mil casos. Em surto numa base militar 94 militares foram acometidos (MUSTAFA et al., 2009). No estado de São Paulo foram notificados 25 surtos de intoxicação por *S.aureus*, envolvendo quase 200 pessoas, nos anos de 2001 e 2002, de acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo (CVE, 2013). Carmo et al (2003), relataram um surto de intoxicação alimentar por *S aureus* em Passos-MG, onde 31 pessoas foram acometidas.

Os estafilococos coagulase negativos (ECN) são cocos gram-positivos que podem ser encontrados tanto dentro quanto fora de glândulas mamárias

infectadas. Geralmente eles são chamados de “microrganismos oportunistas da pele”, tendo em vista que podem ser isolados na parede externa e interna do teto, vagina e narinas. Este grupo de bactérias incluem mais de 50 espécies e subespécies (PYORALA et al., 2009).

Os ECN são comumente isolados do leite bovino. Estes microrganismos tem sido isolados mais frequentemente de amostras de leite em rebanhos que utilizam procedimentos efetivos de controle de mastites (GILLESPIE et al., 2009). A importância de infecções intra-mamárias de cepas de ECN tem se tornado cada vez mais relevantes, mas o papel das diferentes espécies na mastite bovina e na qualidade do leite ainda não está totalmente esclarecido (FRY et al., 2014). Na última década tem sido identificados frequentemente em casos de mastite subclínica, despertando o interesse dos pesquisadores da área (PYORALA et al., 2009). As espécies de estafilococos mais comumente isoladas de casos de mastite bovina são *Staphylococcus chromogenes*, *S. epidermidis* e *S. simulans*. As espécies *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans* e *S. warneri* pertencem à microbiota normal da pele do teto, enquanto outras espécies, tais como *S. xylosus* e *S. sciuri* parecem proceder do ambiente. O *S. chromogenes* pode colonizar a pele do teto e outras partes do corpo do animal como pelos, vagina e canal do teto.

Mais de 20 espécies de ECN, já foram isoladas do leite bovino, porém cinco delas são mais comumente encontradas: *S. chromogenes*; *S. simulans*; *S. xylosus*; *S. haemolyticus* e *S. epidermidis* (VANDERHAEGHEM et al., 2014). Algumas destas espécies mais prevalentes, como o *S. chromogenes* e o *S. simulans* foram encontradas associadas a infecções subclínicas persistentes e alta CCS, demonstrando que certas espécies de ECN são mais bem adaptadas ao hospedeiro, afetando a saúde do úbere e a qualidade do leite (FRY et al., 2014).

Os ECN não estão somente associados a efeitos negativos sobre a saúde da glândula mamária. Alguns autores sugerem que a colonização por certas espécies ECN, pode proteger o ápice dos tetos, principalmente de novilhas contra outros patógenos contagiosos e ambientais. Além de um possível efeito positivo sobre a produção de leite (VANDERHAEGHEM et al., 2014).

Apesar dos efeitos na contagem de células somáticas (CCS) e na produção de leite seja considerado limitado, existem indicações de que estes efeitos variam conforme a espécie, algumas inclusive, ao contrario do que se acreditava são capazes de produzir infecções intramamárias persistentes. As condições para estas manifestações podem estar associadas as cepas e a imunidade do hospedeiro (VANDERHAEGHEM et al., 2014)

Staphylococcus xylosus, *S. saprophyticus*, *S. sciuri* e *S. cohnii* são encontrados livremente no ambiente; portanto, parecem tratar-se de microrganismos oportunistas que infectam o canal do teto e a glândula mamária procedentes do próprio meio ambiente, ou mesmo dos ordenhadores, durante a manipulação dos animais. Segundo BJORK et al, (2014) , *S.epidermidis*, está associado a precária higiene de ordenha, e sugere uma participação do ordenhador na disseminação deste agente.

Embora as enterotoxinas sejam produzidas principalmente por estafilococos coagulase positivos (ECP), alguns estafilococos coagulase negativos (ECN), envolvidos em uma variedade de infecções animais e humanas, têm tomado importância (CUNHA et al., 2006).

GUIMARÃES et al. (2013) verificaram prevalência de gens para produção de enterotoxinas maior em ECN quanto comparado ao *S. aureus*. Parece haver diferenças entre o grau de patogenicidade das diferentes espécies de ECN que são investigadas por técnicas de diagnóstico molecular (ZADOCKS e SCHUKKEN, 2006), bem como na susceptibilidade microbiana e quanto a diversos fatores de virulência (TAPONEN et al., 2009).

Sabe-se muito pouco a respeito do crescimento de ECN em alimentos e estes microrganismos tem sido raramente implicados em casos de intoxicação alimentar pelo fato de não crescerem rapidamente no alimento. Apesar disso, ECN podem contaminar os alimentos devido ao fato de que o homem é um importante carreador destes microrganismos e algumas espécies podem estar relacionadas a infecções humanas específicas (BERGDOLL, 1995). Segundo Podkowik et al., (2013) as toxinas produzidas pelo *S.aureus* , já foram bem caracterizadas, enquanto que muito pouco ainda se sabe sobre o potencial enterotoxigênico das espécies coagulase negativas do gênero *Staphylococcus*.

A mastite é considerada uma das principais causas para o uso de antibióticos em bovinos leiteiros (KALIWAL et al., 2011). Tratamentos

sistêmicos resultam em excreção de resíduos de antimicrobianos pelas fezes, urina e leite dos animais, resultando em risco para a população humana pela exposição a resíduos de antibióticos à partir do leite e seus derivados (HAMMAD et al, 2008).

O isolamento e uma identificação rápida do agente causador da mastite permite tomar medidas corretivas direcionadas para as fontes de infecção e disseminação do patógeno específico, servindo como base para decisão relativa ao tratamento e estabelecimento de um programa de controle. Uma avaliação crítica contribui para uma importante redução no uso de antibióticos, na mastite bovina, onde existem fortes evidências de que o sucesso na terapia depende de vários fatores como idade, ordem de parição, agente etiológico, fase da lactação, recidivas, entre outros (PINZON-SANCHEZ e RUEGG, 2011; TREVISI et al, 2014)

Segundo TREVISI, et al, (2014), estratégias de controle e uma adequada análise de riscos, são fundamentais para conter o uso indiscriminado de antibióticos, o desenvolvimento de bactérias multidrogas-resistente e otimizar a produção, visando um desenvolvimento economicamente sustentável das propriedades e permitindo melhores condições de vida na área rural para produtores e familiares.

O antibiograma é um método *in vitro* que tenta simular o que ocorre *in vivo*, durante o tratamento, já que na glândula mamária existem outros fatores influenciando a ação dos antibióticos. No caso das mastites, possibilita fornecer informações auxiliares sobre quais antibióticos poderiam apresentar os melhores resultados como terapia. Tem como justificativa a ideia de que a principal causa de falha na terapia é a resistência bacteriana ao antibiótico, o que nem sempre ocorre. Alguns estudos indicam que existe baixa correlação entre os resultados do antibiograma e os dados de cura clínica e microbiológica de mastite clínica. Ainda que apresente limitações, o antibiograma, é uma ferramenta auxiliar na escolha dos antibióticos que devem ser utilizados para o tratamento da mastite clínica durante a lactação e seus resultados devem ser utilizados em conjunto com os dados de cura clínica obtidos na fazenda. A realização de pesquisas sobre a resistência bacteriana aos antibióticos, serve como ferramenta para monitorar este comportamento ao longo do tempo e entender seus mecanismos (PINZON-SANCHEZ e RUEGG, 2011)

Resíduos de antimicrobianos no ambiente atuam na seleção de patógenos resistentes. A transferência de material genético entre as bactérias, permite a disseminação destes genes de resistência, principalmente entre os patógenos ambientais encontrados naturalmente no solo. Estes microrganismos multirresistentes podem, em condições adequadas, infectar a glândula mamária (HAMMAD et al, 2008).

A presença de genes de resistência na mesma cepa bacteriana aumenta seu espectro de resistência e sua probabilidade de disseminação, o que justifica a importância do estudo da prevalência destas cepas para a epidemiologia do agente (DROPA, 2006). Estafilococos que expressam o gene *mecA* são denominados meticilina resistentes e o diagnóstico laboratorial da resistência à meticilina é baseado no teste da oxacilina.

De acordo com recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), isolados de estafilococos oxacilina resistentes devem ser relatados como resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos (CLSI, 2008).

A emergência dos *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) tem se tornado um problema mundial de saúde pública. Desde os anos noventa vem sendo implicado em infecções invasivas de pele em humanos, de vários países (TRISTAN et al., 2007).

O primeiro relato de MRSA em animais domésticos, foi de um surto de mastite bovina na Bélgica em 1972 (CUNY et al., 2010). Na atualidade, procedimentos comparativos envolvendo tipificação molecular são objetos de estudo visando determinar a origem, a transmissão, a relação com o hospedeiro, e as correlações genéticas das diferentes linhagens de MRSA (CUNY et al., 2010). Segundo Gindonis et al., (2013), estafilococos isolados de mastite bovina devem ser rotineiramente testados para resistência a meticilina. Estudos recentes vem demonstrando que os ECN são potenciais reservatórios dos genes para produção de enterotoxinas, assim como do gene *mecA* de resistência (UNAI e CINAR. 2012).

No contexto da epidemiologia molecular, as técnicas moleculares podem ser aplicadas tanto para o hospedeiro quanto para os agentes causadores de

enfermidades. Quando utilizada para fins de epidemiologia de doenças infecciosas, os objetivos das técnicas moleculares incluem a identificação dos microrganismos e de suas fontes, as suas relações biológicas, suas vias de transmissão e o estudo de genes responsáveis pela suas características, como virulência. Em casos de mastites, as técnicas moleculares têm sido utilizadas para diferenciar infecções persistentes de casos de novas infecções, estudar genes de virulência e para monitorar fontes de patógenos causadores de intoxicações alimentares em humanos, bem como a resistência aos antimicrobianos tradicionais (ZADOKS, 2002).

A presença de *S. aureus* e ECN enterotoxigênicos no leite cru significa um risco potencial para os consumidores, e sua identificação pelos métodos moleculares deve ser realizada como parte da análise de fatores de risco presentes no leite e derivados (WHO, 2007).

O presente estudo tem como objetivos o isolamento de *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos, a partir de amostras de leite bovino, associadas com os casos de mastite subclínica e de tanques de refrigeração comunitários ou particulares, provenientes de pequenas propriedades leiteiras familiares da região de Bauru – SP. Além disso, determinar a susceptibilidade antimicrobiana dos agentes isolados, bem como investigar a presença de genes produtores de enterotoxinas e do gene *mecA* de resistência à oxacilina, a partir das cepas bacterianas, do leite destes animais e dos tanques de refrigeração.

Tendo em vista estimativas oficiais que assinalam o comércio de 30% do leite produzido no país sem a devida fiscalização sanitária (CONAB, 2013), o comércio irregular do leite “in natura” (BADINI et al., 1996), a fabricação e comercialização de produtos lácteos, e de leite mastítico, potenciais carreadores de genes para produção de enterotoxinas (CUNHA et al., 2006), faz com que o conjunto destes fatores representem um sério risco à saúde pública, devido à possibilidade de veiculação de agentes patogênicos e/ou de suas toxinas para o homem.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

3.1.1 Avaliar a prevalência de mastite subclínica em rebanhos bovinos de dez pequenas propriedades leiteiras, com sistema de ordenha mecânica localizadas na região de Bauru - SP.

3.1.2 Isolar e identificar bioquimicamente as cepas de estafilococos, tanto as coagulase positivas quanto as coagulase negativas, dos casos de mastite subclínica e dos tanques de resfriamento.

3.1.3 Estabelecer o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de estafilococos isoladas dos casos de mastite subclínica.

3.2 Específicos

3.2.1 Pesquisar a ocorrência do gene *mecA* de resistência à oxacilina nas amostras de *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativos (ECN) isoladas dos casos de mastite subclínica.

3.2.2 Detectar a presença de genes codificadores de enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec* e *sed* nas cepas de *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos (ECN) isoladas.

3.2.3 Detectar a presença de genes codificadores de enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec* e *sed* das amostras de leite coletadas dos tanques de refrigeração de todas as propriedades avaliadas, bem como dos casos de mastite subclínica.

*M*ATERIAL E *M*ÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises microbiológicas e a pesquisa molecular foram realizadas no Laboratório de Sanidade Animal da APTA/SAA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Pólo Centro Oeste – Bauru-SP.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Campus de Botucatu; Protocolo Nº 102/2014 – CEUA (**ANEXO 1**).

4.1 Propriedades rurais

Foram visitadas uma única vez, dez pequenas propriedades familiares, localizadas em municípios pertencentes à região de Bauru e Marília - SP, examinando-se amostras de leite de todas as vacas em lactação, totalizando 134 animais. Os produtores fazem parte de uma associação e destinam sua produção para o mesmo laticínio que coleta este leite de tanques comunitários e particulares. Todas as propriedades estudadas utilizavam o sistema de ordenha mecânica, com produção média de 120 litros diários e rebanho mestiço de grau de sangue variado. Quanto as instalações e higiene na ordenha; apenas uma propriedade não tinha piso de cimento na sala de ordenha. Duas propriedades possuíam sala de ordenha tipo fosso, e realizavam pré e pós – dipping. As oito restantes, com manejo de “bezerro ao pé”, não realizavam nenhuma preparação higiênica pré ou pós – ordenha.

4.2 Coleta do leite dos animais

Para a coleta das amostras de leite, antes do início da rotina de ordenha, os tetos foram limpos e secos com toalha de papel descartável. Previamente a coleta do leite, foi realizado o teste de Califórnia Mastitis Test (CMT) em todos os tetos, utilizando-se de kit disponível comercialmente e, daqueles que apresentaram reação a partir de uma cruz, coletaram-se as amostras de leite em tubos de ensaio estéreis, realizando-se a anti-sepsia do óstio do teto com

álcool iodado 5% e imediatamente encaminhadas ao laboratório, sob refrigeração, em caixa isotérmica contendo gelo reciclável.

4.3 Coleta do leite dos tanques de resfriamento

Foram colhidas amostras de 30 mL de leite de oito diferentes tanques, pois três propriedades entregavam leite no mesmo tanque comunitário. Foram obtidas então, um total de 10 (dez) amostras de tanques de resfriamento. A amostra era colhida após o tanque receber o leite da propriedade integrante do estudo. Cada visita para coleta de leite dos animais da propriedade, gerava uma amostra de leite do tanque para o qual ela destinava sua produção. Seis tanques eram comunitários e dois tanques particulares. O leite era coletado com concha de alumínio previamente esterelizada e encaminhado para exame microbiológico, identificação bioquímica das cepas de estafilococos isoladas, e posterior verificação da presença de genes codificadores das enterotoxinas A1, A2, B1, B2, C1, C2, D1 e D2. As amostras coletadas foram acondicionadas em frascos estéreis, e prontamente encaminhadas ao laboratório em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável e armazenadas em freezer -20°C.

4.4 Cultivo microbiológico

No laboratório, foram realizados os cultivos microbiológicos, com 0,01 mL de leite em placas de Petri contendo 20 mL de meio de Agar Sangue ovino a 5% e MacConkey. As placas foram incubadas em condições de aerobiose à temperatura de 37°C por até 72 horas, com observação do desenvolvimento microbiano às 24, 48 e 72 horas, estabelecendo-se o seguinte padrão de contagem: discreto (até 9 colônias), moderado (de 10 a 29 colônias) e exuberante (30 ou mais colônias).

4.5 Identificação de estafilococos coagulase positivos (ECP) e estafilococos coagulase negativos (ECN)

As colônias bacterianas suspeitas com 2 a 3 mm de diâmetro, de coloração branca a amarelo dourado e hemolíticas (QUINN et al., 2005) foram coradas pelo método de Gram com o objetivo de visualizar morfologia e característica tintorial. Cocos agrupados em forma de “cachos-de-uva”, Gram positivos, foram submetidos às provas de catalase e coagulase, segundo Koneman et al., (2008). A prova de catalase foi realizada utilizando-se o kit coagu-plasma®, segundo normas do fabricante (Laborclin®). O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base nas provas de oxidação e fermentação da glicose, e pela resistência à bacitracina (0,04 U), indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm e pela sensibilidade à furazolidona (100 mg) caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro (BAKER, 1984).

Posteriormente, foram realizadas as provas de fermentação de açúcares maltose, trealose, manitol, resistência à polimixina B (300UI) e β -galactosidase, com a finalidade de diferenciar *S.aureus* de outros *Staphylococcus* coagulase-positiva, como *S. intermedius*, *S. scheiferi* subsp. *coagulans* e *S. hyicus* (KONEMAN et al. 2008). Posteriormente à confirmação da espécie, as amostras foram conservadas em caldo cérebro coração com glicerol a 25% e mantidas em freezer a - 20°C.

Para a diferenciação das espécies de ECN foi utilizado o método simples modificado proposto por Cunha et al. (2004), o qual consiste na fermentação dos açúcares xilose, sacarose, trealose, maltose e manitol, produção de hemolisina e crescimento anaeróbico em caldo tioglicolato. As linhagens foram mantidas a 37°C por 72 horas. Quando necessário e de acordo com os resultados obtidos no método simples modificado, para complementar a classificação das diferentes espécies e subespécies de ECN também foram utilizadas como provas bioquímicas redução de nitrato, produção de urease e/ou ornitina descarboxilase, fermentação de β -D-frutose e resistência a novobiocina (5 μ g).

Foram realizados, antibiogramas com a utilização dos discos de novobiocina (5 μ g) e polimixina B (300 UI), bem como furazolidona (100 μ g) e

bacitracina (0,04 UI), para diferenciação entre os gêneros *Micrococcus* e *Staphylococcus* (Koneman et al., 2008).

Cepas de referência internacional de espécies de ECN foram utilizadas como controle, *S. epidermidis* (ATCC12228), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. warneri* (ATCC 10209), *S. xylosus* (ATCC 29979) e *S. saprophyticus* (ATCC 15305).

4.6 Protocolo de congelamento de bactérias

Após a identificação bioquímica das amostras de estafilococos estas foram repicadas para o meio de Infusão de Cérebro Coração (BHI) e incubada a 37°C durante 24 horas. Tendo-se o crescimento bacteriano, precedeu-se o congelamento das bactérias, acrescentando-se 800 µL de glicerol P.A. em 3200 µL de água Mili-Q estéril em tubos de ensaio previamente esterilizados. Foram adicionados 200 µL dessa solução de glicerol a 20% em tubos criogênicos estéreis, acrescido de 800 µL de caldo BHI contendo a bactéria a ser congelada. Os tubos foram acondicionados em freezer a -80°C (NMC, 1999), até a sua utilização para extração do DNA.

4.7 Perfil de sensibilidade microbiana

Foi realizado perfil de sensibilidade para todas as amostras de estafilococos isoladas, de acordo com Bauer et al. (1966), em placas contendo Agar Mueller Hinton. Foram utilizados os seguintes antimicrobianos: gentamicina (10µg), tetraciclina (30µg), penicilina G (10 U.I.), neomicina (30µg), ampicilina (10µg), sulfazotrim (25µg), oxacilina (10µg), cefalexina (30µg) e enrofloxacin (5µg).

4.8 Detecção dos genes codificadores das enterotoxinas sea, seb, sec e sed a partir de amostras de leite dos casos subclínicos; das cepas de estafilococos e dos tanques de resfriamento.

4.8.1 *Extração do DNA dos casos de mastite subclínica e dos tanques de resfriamento.*

Foi realizada a extração de DNA de amostras de leite das vacas com mastite subclínica e dos tanques de resfriamento das dez propriedades visitadas. Utilizou-se o GFX Genomic Blood DNA Purification kit® (GE Healthcare®) de acordo com as normas do fabricante. Os procedimentos para realização da técnica de extração encontram-se descritas no **anexo 2**.

4.8.2 *Extração do DNA de cepas de Staphylococcus spp. isolados do leite dos tetos das vacas.*

Foi realizada extração de DNA a partir das amostras de *Staphylococcus* spp. Isoladas dos casos de mastite subclínica e dos tanques de expansão. O ácido nucléico foi extraído a partir de linhagens de *Staphylococcus* spp, mantidas em BHI e congeladas em glicerol conforme descrito no item 4.6. Utilizou-se o GFX Genomic Blood DNA Purification kit® (GE Healthcare®) de acordo com as normas do fabricante. Os procedimentos para realização da técnica de extração encontram-se descritas no **anexo 3**.

4.8.3 *Iniciadores utilizados na detecção dos genes codificadores das enterotoxinas*

Foram utilizados iniciadores específicos (Quadro 1) para os genes codificadores de cada enterotoxina, EEA (*sea1* e *sea2*), EEB (*seb1* e *seb2*), EEC (*sec1* e *sec2*) e EED (*sed1* e *sed2*), de acordo com Johnson et al. (1991).

QUADRO 1: Seqüência das bases, localização dentro dos genes e tamanhos previstos dos produtos amplificados pelos *primers* (iniciadores) oligonucleotídeos toxina-específicos.

Gene	Primer	Seqüência dos oligonucleotídeos (5'-3')	Localização dentro do gene	Tamanho do produto amplificado (pb)
sea	SEA-1	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	490-509	120
	SEA-2	GAACCTTCCCATCAAAAACA	591-610	
seb	SEB-1	TCGCATCAAACTGACAAACG	634-653	478
	SEB-2	GCAGGTACTCTATAAGTGCC	1091-1110	
sec	SEC-1	GACATAAAAGCTAGGAATTT	676-695	257
	SEC-2	AAATCGGATTAACATTATCC	913-932	
sed	SED-1	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	354-373	317
	SED-2	TAATGCTATATCTTATAGGG	652-671	

Fonte: JOHNSON *et al.*, 1991

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5mL em volumes totais de 25µL, contendo 10pmol de cada primer, 2,0U de Taq DNA polimerase, 100mM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL da amostra. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, pela substituição do ácido nucléico por água. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler Pro - Eppendorf®, empregando-se inicialmente os parâmetros descritos por Johnson *et al.* (1991) com algumas modificações propostas por Cunha *et al.* (2006) que consistem de: um primeiro ciclo a 94°C por quatro minutos, desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento dos primers a 55°C e extensão a 72 °C por um minuto e 30 segundos. Posteriormente procedeu-se um segundo ciclo de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento dos primers a 53 °C e extensão a 72 °C por um minuto e 30 segundos. No terceiro ciclo a temperatura de anelamento foi reduzida para 51 °C seguido por mais 37 ciclos com estes últimos parâmetros. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72 °C por sete minutos antes de resfriar à 4 °C.

4.8.4 Visualização dos produtos amplificados.

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em gel de agarose a 1% preparado em tampão de TBE 1,0 X e corado com Syber® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen)®, na concentração de 22uL/170 mL de gel . O

tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão 100 pb e posteriormente fotografado em transiluminador UV Major Science®. Cepas toxigênicas de referência internacional de *S. aureus* foram utilizadas como controle positivo: *S. aureus* produtor de *sea*: ATCC* 13565; *S. aureus* produtor de *seb*: ATCC 14458; *S. aureus* produtor de *sec*: ATCC 19095 e *S. aureus* produtor de *sed*: ATCC 23235.

*ATCC= American Type Culture Collection

5 DETECÇÃO DO GENE *mecA* DOS CASOS DE MASTITE SUBCLÍNICA; DAS CEPAS DE ESTAFILOCOCOS ISOLADAS E DOS TANQUES DE RESFRIAMENTO.

5.1 Extração do Ácido Nucléico.

O ácido nucléico total foi extraído a partir dos casos de mastite subclínica; dos isolados de *Staphylococcus* spp. e dos tanques de resfriamento conforme descrito no item 4.8.1. e 4.8.2.

5.2 Amplificação do Ácido Nucléico (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volumes totais de 25µL, contendo 10 pmol de cada primer, 2,0U de Taq DNA polimerase, 100mM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL da amostra. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, utilizando os primers *mecA1* (AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG) e *mecA2* (AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG), empregando os parâmetros descritos por Murakami et al. (1991) que consistem de: 40 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos *primers* a 55,5°C por trinta segundos e extensão a 72°C por um minuto. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por cinco minutos antes de resfriar à 4°C. Em todas as reações realizadas foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar as diferenças entre a frequências de estafilococos coagulase positivos (ECP) e negativos (ECN) nos rebanhos, aplicou-se o teste do Qui-quadrado. Para uma amostra com proporções consideradas iguais com o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para as análises foi utilizado o Software BioEstat 5.0.

Calculou-se o perfil de resistência às diferentes drogas por meio de frequências absolutas e relativas e para avaliar as diferenças de resistência dos estafilococos coagulase positivos (ECP) e negativos (ECN) frente aos antimicrobianos estudados, aplicou-se o teste do Qui-quadrado, considerando o nível de significância de ($p < 0,05$). Para as análises foi utilizado o Software BioEstat 5.0. (AYRES et al., 2007)

Para os demais resultados foram realizadas análises descritivas por meio de frequências absolutas e relativas.

*R*ESULTADOS

7 RESULTADOS

7.1 Pesquisa da microbiota aeróbica

Das 160 amostras de leite positivas ao CMT, submetidas ao exame microbiológico, (34,4 %) mostraram-se negativas, enquanto que (65,6%) foram positivas, seja em cultura pura ou em associação, a outros microrganismos como pode ser visualizado na **Tabela 1**.

TABELA 1. Microrganismos isolados de amostras de leite bovino com mastite subclínica, em cultura pura ou em associação, procedentes de dez pequenas propriedades leiteiras da região de Bauru – SP. Botucatu, 2015.

<i>AGENTE</i>	<i>NÚMERO DE ISOLAMENTOS</i>	<i>%</i>
<i>Corynebacterium</i> spp.	21	37,5
<i>Streptococcus</i> spp	12	21,4
<i>Streptococcus</i> spp (β hemolítico)	05	8,9
<i>Escherichia coli</i>	05	8,9
<i>Streptococcus</i> spp(α hemolítico)	03	5,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	02	3,6
<i>Enterobacter cloacae</i>	01	1,8
<i>Candida</i> spp.	02	3,6
<i>Bacilos Gram negativos</i>	05	8,9
TOTAL	56	100,0

7.2 Isolamento de estafilococos coagulase positivos e negativos

A partir das dez propriedades visitadas, foram coletadas amostras de um total de 134 vacas em lactação, sendo que 74 (55,2%) apresentaram ao menos um teto com mastite subclínica. Pelo teste do CMT foram avaliados 535 quartos mamários. Destes, 160 (29,9%) foram positivos, sendo submetidos a análise microbiológica. Em 55 (34,4%) amostras não houve crescimento e duas (1,2%) foram consideradas contaminadas. *Staphylococcus* spp foi isolado de 105 amostras (65,6%). Destes isolados, 55 (52,4%) eram ECP e 50 (47,6%) ECN. Entre os ECP, foram isoladas 48 amostras de *S.aureus* (87,3%), seguido de cinco isolamentos de *S.intermedius* (9,1%), um isolamento de *S.hyicus* (1,8%) e um isolamento de (1,8%) *S. schleiferi subsp. coagulans* (1,8%) (Tabela 2).

TABELA 2. Estafilococos coagulase positivos (ECP), isolados de casos de mastite subclínica bovina, procedentes de dez pequenas propriedades leiteiras da região de Bauru-SP, Botucatu 2015.

Agente	N	%
<i>Staphylococcus aureus</i> subesp. <i>aureus</i>	48	87,3
<i>Staphylococcus intermedius</i>	05	9,1
<i>Staphylococcus hyicus</i>	01	1,8
<i>Staphylococcus schleiferi</i> subesp.coagulans	01	1,8
Total	55	100,0

Das 12 espécies de ECN isoladas, as mais freqüentes foram *S. warneri* e *S. hyicus*, ambos com oito isolamentos (16%). As demais espécies encontradas foram: sete *S. xylosus* (14%); seis *S.sacharolyticus* e seis *S. lugdunensis*, ambos com 12%; quatro *S.haemolyticus* (8%); três *S. epidermidis* (6%), dois *S. pasteurii*, dois *S. chromogenes* e dois *S.hominis*, ambos com 4% e uma amostra *S. saprophyticus* e outra de *S. auricularis* (2%) (Tabela 3).

TABELA 3. Estafilococos coagulase negativos (ECN), isolados de casos de mastite subclínica, procedentes de dez pequenas propriedades leiteiras da região de Bauru-SP. Botucatu-SP, 2015.

AGENTE	NÚMERO	
	ISOLAMENTOS	%
<i>S. warneri</i>	08	16,0
<i>S. hyicus</i>	08	16,0
<i>S. xylosus</i>	07	14,0
<i>S. lugdunensis</i>	06	12,0
<i>S. sacharolyticus</i>	06	12,0
<i>S. haemolyticus</i>	04	8,0
<i>S. epidermidis</i>	03	6,0
<i>S. pasteurii</i>	02	4,0
<i>S. chromogenes</i>	02	4,0
<i>S. hominis</i>	02	4,0
<i>S. auricularis</i>	01	2,0
<i>S. saprophyticus</i>	01	2,0
TOTAL	50	100,0

7.3 Distribuição de isolamentos de *Staphylococcus* spp. nos rebanhos

Nos 10 rebanhos estudados isolou-se *Staphylococcus* spp. Não houve diferença significativa entre o número total de isolados de ECP e ECN. Em dois rebanhos a prevalência dos ECP foi significativamente maior quando comparada aos ECN ($p < 0,05$) e em um rebanho os ECN foram mais prevalentes. A espécie de ECP mais difundida entre os rebanhos foi *S. aureus*, encontrado em sete deles, e de ECN, *S. saccharolyticus* e *S. hyicus*, os quais foram isolados na metade dos rebanhos avaliados. (Tabela 4)

TABELA 4. Distribuição de isolamentos de *Staphylococcus* spp, em amostras de leite com mastite subclínica, nos dez rebanhos de pequenas propriedades leiteiras da região de Bauru-SP. Botucatu-SP, 2015.

Rebanho	ECP	ECN	P
REB I	13	01	0,0013
REB II	00	03	---
REB III	00	09	---
REB IV	00	05	---
REB V	16	08	0,1025
REB VI	01	10	0,0067
REB VII	08	09	0,8084
REB VIII	04	05	0,7386
REB IX	12	00	0,0005
REB X	01	00	---
TOTAL	55	50	0,6256

7.4 Antibiograma

A avaliação pelo método de sensibilidade in vitro frente aos antimicrobianos estudados demonstrou níveis de resistência das amostras de ECP de 92,7% para penicilina e 90,9% para ampicilina. Quando consideramos apenas *S. aureus* esta resistência é de 93,8% para ambas. Não houve resistência frente a vancomicina e cefalexina. Para neomicina, 27,1% das amostras apresentaram resistência; para tetraciclina 22,9%; para gentamicina 20,8%; enrofloxacin 10,4% e para oxacilina e sulfazotrim 6,2%.

Em relação aos ECN, os maiores níveis de resistência também são para a penicilina e ampicilina, 56 e 52% respectivamente, e apesar de alta, significativamente menor do que a dos ECP frente aos beta-lactâmicos. Para os demais antimicrobianos testados a resistência foi de 36% para tetraciclina, 20% para gentamicina, 18% para neomicina, 16% para oxacilina, 14% para cefalexina, 12% para o sulfazotrim e 4% para enrofloxacin .

Não houve diferença estatística da resistência dos ECP e ECN, frente aos aminoglicosídeos, e a oxacilina. Os ECN foram significativamente mais resistentes a cefalexina ($p < 0,005$). (**Tabela 5**)

TABELA 5. Antibiograma, com resultados em porcentagem, de resistência dos estafilococos coagulase positivos (ECP) e estafilococos coagulase negativos (ECN), isolados de casos de mastite subclínica de dez pequenas propriedades da região de Bauru-SP. Botucatu-SP, 2015.

<i>Drogas</i>	<i>Resistência ECP</i>	<i>Resistência ECN</i>	<i>P</i>
Penicilina G(10UI)	92,7	56,0	0,0026
Ampicilina (10 µg)	90,9	52,0	0,0011
Neomicina (30 µg)	30,9	18,0	0,0651
Gentamicina(10µg)	23,6	20,0	0,5856
Tetraciclina (30µg)	20,0	36,0	0,0325
Enrofloxacin(5µg)	9,1	4,0	0,1588
Oxacilina (10 µg)	7,3	16,0	0,0715
Sulfazotrim (25 µg)	7,3	12,0	0,2847
Cefalexina (30 µg)	0,0	14,0	0,0002
Vancomicina	0,0	----	---

7.5 Isolamentos a partir dos tanques de resfriamento

Das dez amostras de leite dos tanques de resfriamento submetidos à avaliação microbiológica, em apenas três foram isolados microorganismos do gênero *Staphylococcus*, sendo todos ECN. No tanque C e F, *S. xylosus*; e no tanque C, *S. hominis* e *S. haemolyticus*. Os microorganismos mais freqüentes isolados dos tanques foram os bastonetes gram negativos da família *Enterobacteriaceae*, principalmente *Escherichia coli*, presente em quatro tanques.

7.6 Análises moleculares – identificação de genes para produção de enterotoxinas sea, seb, sec, sed e mecA a partir de amostras de leite do tanque, dos casos de mastite subclínica e dos isolados de estafilococos.

Com relação a presença de genes relacionados a produção de enterotoxinas, a partir de 142 amostras de leite com diagnóstico de mastite subclínica, 17 (12%) foram positivas para algum dos genes estudados. O gene *sea* foi o mais prevalente, sendo detectado em 11 (7,7%). O gene *seb* foi detectado em cinco (3,5%) e o *sec* em uma (0,7%) das amostras. Todas foram negativas para o gene *sed*.

Quando consideramos os resultados das análises moleculares diretamente das cepas de *Staphylococcus* spp isolados das mastites subclínicas, houve detecção somente do gene *sec* em oito (7,6%) de um total de 105 amostras. Dos oito isolados de *Staphylococcus* spp, positivos para *sec* 05 (4,8%) eram ECP, sendo três *S. aureus* e dois *S. intermedius* e três (2,8%) ECN, um *S. xylosus*, um *S. hyicus* e um *S. lugdunensis*. Para *sea*, *seb* e *sed* as amostras foram negativas (**Tabela 7**).

Das 10 amostras de leite dos tanques, duas (20%) foram positivas para *sea* e uma (10%) para *seb*, como pode ser observado na **Tabela 6**.

O gene para *mecA* de resistência foi detectado em três amostras de *Staphylococcus* spp todas de *S. aureus*, que representa 6,2% do total de 48 cepas de *S. aureus* isoladas.

TABELA 6. Detecção de genes de enterotoxinas,(*sea* ; *seb*; *sec* e *sed*) por PCR em amostras de leite de mastite subclínica, de cepas de *Staphylococcus* spp e de tanques de refrigeração de pequenas propriedades da região de Bauru-SP. Botucatu,-SP, 2015.

GENE	MASTITE		
TOX	SUBCLÍNICA	STA	TANQUE
TOX A	11 (7,7%)	-	2 (20%)
TOX B	5 (3,5%)	-	-
TOX C	1 (0,7%)	8(7,6%)	1 (10%)
TOX D	-	-	-
TOTAL	17 (12%)	8(7,6%)	3 (30%)
N	142	105	10

- = não detectado

TABELA 7. Detecção de genes de enterotoxinas, pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras de leite com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp., procedentes de pequenas propriedades da região de Bauru-SP. Botucatu- SP, 2015.

Espécie	sea	seb	sec	sed
<i>S.aureus</i>	-	-	3	-
<i>S.intermedius</i>	-	-	2	-
<i>S.xylosus</i>	-	-	1	-
<i>S.hyicus</i>	-	-	1	-
<i>S.lugdunensis</i>	-	-	1	-
Total	-	-	8	-

- = não detectado

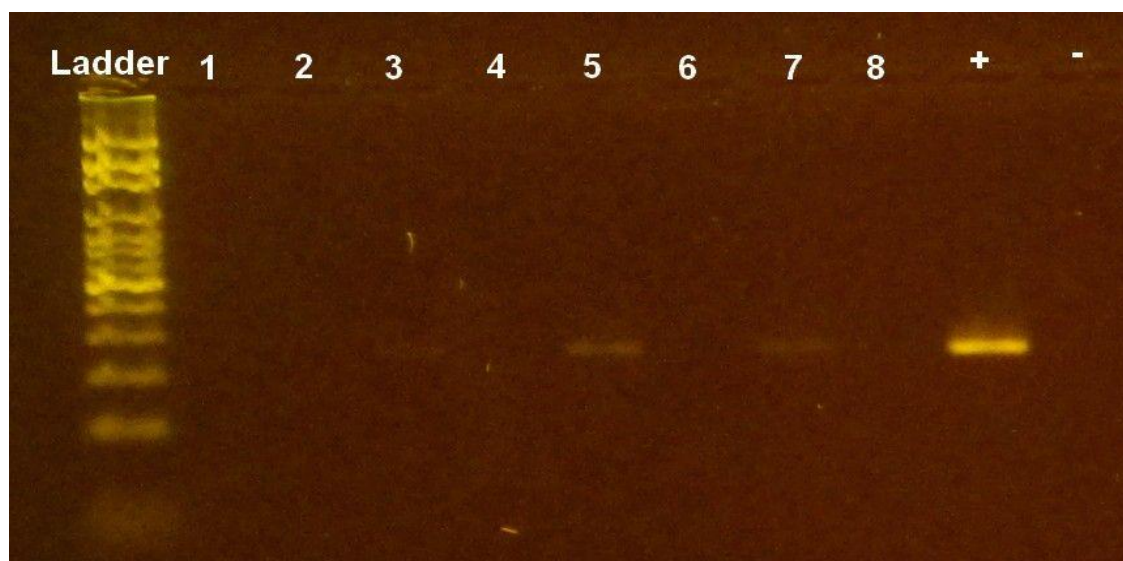


FIGURA 1. Gel de agarose a 1% corado com Syber Safe®. Resultados da amplificação de genes das toxinas C (*sec*) de oito amostras de leite com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp., procedentes de dez pequenas propriedades da região de Bauru-SP. Nota-se a detecção do gene codificador de enterotoxina *sec* (257 pb) na amostra de número 5 e 7. Controle positivo para o gene *sec*: DNA de *S. aureus* ATCC 19095; Peso molecular padrão para DNA (100 pb - Invitrogen®). Controle negativo: água mili Q.

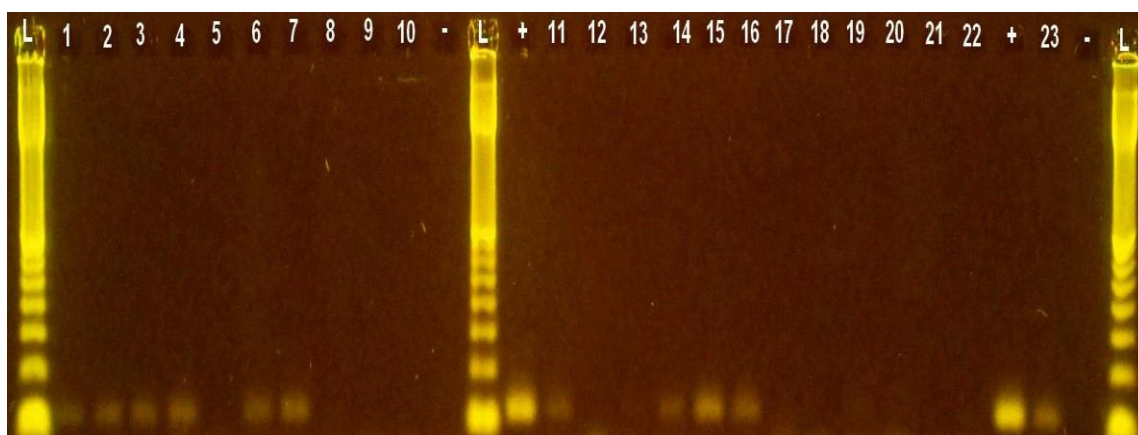


FIGURA 2. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Syber Safe®. Resultados de amplificação de genes das toxinas A (*sea*) de 23 amostras de leite diretamente dos tetos de dez pequenas propriedades da região de Bauru-SP. Nota-se a detecção do gene codificador de enterotoxina *sea* (120 pb) nas amostras de número 1; 2; 3; 4; 6; 7; 11; 14; 15; 16; e 23. Controle positivo para o gene *sea*: DNA de *S. aureus* ATCC 13565; Peso molecular padrão para DNA (100 pb - Invitrogen®). Controle negativo: água mili-Q.

*D*ISSCUSSÃO

8 DISCUSSÃO

No presente estudo 55,2% dos animais apresentaram ao menos um quarto com mastite subclínica. No Brasil Martins et al., (2010), também encontraram prevalência de 65% de mastite subclínica, em rebanhos com sistema de ordenha mecânica. No Paraná, Oliveira et al., (2013) em pequenas propriedades leiteiras, encontraram 33% de animais com mastite subclínica, assim como Meyer et al., (2013) na região de Pelotas RS, 37,4%.

Na Índia, Bangar et al., (2014), realizaram revisão de 25 estudos totalizando 6344 vacas e encontraram resultado semelhante com 46,3% de prevalência de mastite subclínica. No México, Galván et al. (2014), de 535 vacas de pequenos rebanhos de caráter familiar, em 52% dos animais foi detectada mastite subclínica e observaram que neste grupo de produtores muitas vezes os cuidados com a saúde animal e medicina preventiva eram escassos, além dos precários procedimentos de higiene durante a ordenha.

A mastite subclínica apresenta grande importância epidemiológica por alastrar-se silenciosamente, sem que sejam percebidas alterações no úbere ou em sua secreção (BARBALHO e MOTA., 2001) e estes casos subclínicos estão associados a redução da produção de leite (GRÖHN et al., 2004) A alta prevalência de mastite subclínica entre os pequenos produtores de leite no presente estudo, era fato desconhecido, assim como suas consequências, afetando a produção e a rentabilidade da atividade, devido a ausência de rotina de diagnóstico. O manejo e higiene inadequado na ordenha, a falta de um programa de controle de mastite, e de orientação técnica especializada podem contribuir para estes resultados.(LANGONI H., 2013)

Em todas as propriedades foram isolados *Staphylococcus* spp. Dos 160 tetos positivos ao CMT, e submetidos a análise microbiológica, *Staphylococcus* spp foi isolado de 105 amostras (65,6%), sendo que em 48 delas (45,7%) foram identificados *Staphylococcus aureus* que foi isolado em sete das dez propriedades estudadas . Rall et al., (2014) encontraram uma prevalência menor destes agentes, em 292 casos de mastite subclínica 27,4%, foram positivos para *Staphylococcus* spp e 17,5% eram *S.aureus*. Considerando se somente os ECP, foram isoladas 55 cepas, sendo 48 (87,3%) *S.aureus*; cinco (9,1%) *S. intermedius*, um (1,8%) *S.hyicus* e um (1,8%) *S. schleiferi subesp.*

coagulans. Guimarães et al., (2013) relataram também maior prevalência de *S.aureus* (68%), seguido de *S. intermedius*, (15%), *S.hyicus* (13%) *S. schleiferi subesp. coagulans* (4%).

Staphylococcus aureus é um dos principais agentes etiológicos de mastite bovina e um importante patógeno para saúde humana (PU et al, 2014). A alta prevalência de patógenos classificados como contagiosos pode estar relacionada à falta de higiene na ordenha da maioria das propriedades. Segundo Picoli et al.,(2014) a realização de pré-dipping contribui para redução da contagem de *Staphylococcus* spp e houve diferença significativa em relação ao grupo que não realizava esta prática, concluindo que técnicas de manejo mais precárias influenciam negativamente na qualidade microbiológica do leite e aumentam os riscos de agentes infecciosos.

Neste estudo em três propriedades foram isolados apenas ECN. De acordo com Fry et al., (2014), rebanhos leiteiros bem manejados e que implementaram programas de controle de patógenos responsáveis por causar mastites contagiosas, passaram a ter como grupo mais prevalente os ECN. Existem evidências de que, quando o rebanho apresenta a mastite contagiosa sob controle, a mastite clínica causada por patógenos ambientais tende a se tornar mais frequente (RADOSTITS et al., 2007). Algumas práticas de controle de mastite permitiram aos produtores o controle satisfatório sobre *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, que são microrganismos contagiosos. Contudo, patógenos ambientais como *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e algumas espécies de ECN tornaram-se os maiores desafios, exigindo cada vez mais novos métodos de combate à mastite (BRITTEN et al., 1998; JAYARAO et al., 1999; PETERSSON-WOLFE et al., 2008; KRISTULA et al., 2008; VANDERHAEGHEN et al., 2014).

No presente estudo os níveis mais altos de resistência aos antibióticos estudados, foi observado frente ao grupo dos beta-lactâmicos – penicilina e ampicilina, tanto para o *Staphylococcus aureus* - 93,8% para ambas, como para os ECN - 56% e 52% de resistência, respectivamente. Em um estudo onde foram avaliadas 5880 amostras de *Staphylococcus* spp, no período de 1992 à 2001, de rebanhos leiteiros procedentes dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro, Costa et al. (2004) verificaram resistência para penicilina e ampicilina de 93,7%, corroborando com os

resultados encontrados. Na Polônia, Szweda et al. (2014) analisaram 123 isolados de *Staphylococcus aureus* frente a 20 antibióticos, observando-se também maior resistência a ampicilina e penicilina, porém em uma porcentagem menor das amostras, 22,8% e 23,6% respectivamente. Como no presente estudo, também não houve a detecção de resistência de nenhuma amostra à vancomicina e a cefalexina. Corroborando ainda com este estudo, Jagielski et al (2014) analisaram 80 isolados de *S.aureus*, sendo 41% resistentes a penicilina, considerando-se portanto inadequada a indicação deste antibiótico para o tratamento de mastite bovina ocasionada por *S.aureus*.

A predominância da resistência mundial ao *Staphylococcus* spp, frente aos antibióticos beta-lactâmicos é provavelmente conseqüência do fato de haver ocorrido uma utilização maciça desta classe de antibióticos no tratamento da mastite bovina, em um passado recente. Os tratamentos excessivos e mal conduzidos com β -lactâmicos são apontados como responsáveis pelo aumento da incidência de bactérias produtoras de β -lactamases (BRADFORD 2001). No caso de pequenos produtores a falta de uma adequada orientação técnica, e a dificuldade em adquirir animais para reposição do rebanho acabam por conduzi los a tratamentos ineficazes.

O freqüente contato da bactéria com um antibiótico específico pode causar um aumento da resistência, e um decréscimo da eficácia do tratamento. O mecanismo mais comum neste caso é a produção de beta-lactamases (Szweda et al, 2014). Esta ação limitada das penicilinas naturais e das semi-sintéticas de segunda geração, como a ampicilina e amoxicilina, também sensíveis as beta-lactamases, fez com que fossem substituídas nos produtos comerciais por penicilinas resistentes as beta-lactamases; as isolil-penicilinas (oxacilina e cloxacilina) (COSTA et al, 2004).

Os aminoglicosídeos são também muito usados no tratamento de mastites (COSTA et al, 2004). Principalmente gentamicina e neomicina. No presente estudo foi encontrada resistência nas amostras de ECP de 30,9% para neomicina e 23,6% para gentamicina. Para os ECN foi encontrada resistência de 20% e 18% para neomicina e gentamicina respectivamente. Costa et al.(2004), em estudo entre 1992 e 2001, no Brasil, encontraram 11,5% de resistência de *Staphylococcus* spp frente aos aminoglicosídeos, e observaram aumento significativo da porcentagem de resistência ao longo dos

anos. Hammad et al. (2012), detectaram em cepas de estafilococos, genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos, aos beta-lactâmicos e tetraciclina. Ao contrário de trabalhos que demonstram alta atividade da gentamicina frente a isolados de *S.aureus* (Gindonis et al., 2013; Jagielski et al., 2014).

O monitoramento da resistência aos antibióticos vem sendo considerada parte importante na estratégia de controle da mastite e guia a seleção da terapia mais apropriada e eficiente para infecções mamárias por estafilococos (Jagielski et al., 2014). Segundo Liu et al., (2002) embora os valores de MIC (Minimal Inhibitory Concentration) sejam importantes indicadores in vitro da atividade ou potência dos antimicrobianos, estes não necessariamente predizem a eficácia in vivo, dependem de vários parâmetros farmacológicos e de como atingem o tecido desejado.

Para obtenção de bons resultados no tratamento de casos de mastite é preciso considerar um conjunto de fatores como o agente etiológico, a fase de lactação, o número de parições, reicidivas e estado nutricional do animal. Caso contrário, os antibióticos podem não levar a taxas de cura, para algumas formas de mastite, maiores do que casos não tratados (TREVISI et al., 2014). Tanto em relação a saúde pública, como para o bem estar animal, estratégias visando uma substancial redução do uso de antibióticos em propriedades leiteiras, devem se basear na correta análise dos fatores de risco específicos das fazendas ou grupo de produtores (TREVISI et al., 2014).

Os ECN tem sido considerados patógenos menores; porém sua importância tem aumentado nos últimos anos, tendo em vista que os mesmos tornaram-se o grupo de agentes mais frequentemente isolados em vários países (TENHAGEN et al., 2006; LIM et al., 2007), causando danos ao tecido mamário (TIMMS e SHULTZ., 1987) e diminuição na produção de leite.

Os ECN foram isolados em 47,6% das 105 amostras. As espécies mais frequentes dentre as 12 espécies isoladas foram *S.warneri*, (16%), *S. hyicus* (16%) e *S. xylosus* (14%). Guimarães et al (2013), em 10 rebanhos no Brasil, identificaram 263 amostras de *Staphylococcus* spp, sendo 135 (51%) classificados como ECP e 128 (49%) como ECN, distribuídos em 18 diferentes espécies, com maior prevalência para *S.warneri*, *S.epidermidis* e *S. hyicus*. Rall et al., (2014), no Brasil, em 292 amostras de leite com mastite subclínica,

encontraram 22,6% de ECN, mas os resultados não associaram estatisticamente estas espécies aos casos de mastite, sendo inclusive a espécie *S.saprophyticus*, significativamente mais prevalente em vacas sadias. Corroborando com o presente estudo, *S.warneri* foi o mais prevalente, com 27,5% dos isolados de vacas com mastite subclínica, seguidos por *S.saprophyticus* (16,3%) e *S.epidermidis* (13,8%). *S. xylosus* foi isolado em 7,5% dos casos de mastite subclínica, já no presente estudo 14% dos isolados eram de *S. xylosus*.

Uma das espécies de ECN isolada em 12% das amostras no presente estudo foi *S.lugdunensis*, associado a infecções oportunistas, formação repetidas de abscessos, e endocardites, sendo fator de risco principalmente na imunossupressão (SANCHEZ et al., 2001).

Alguns estafilococos são frequentemente encontrados na pele sadia do úbere ou nas mãos dos ordenhadores. *S.warneri*, *S.epidermidis*, *S.simulans* e *S.saprophyticus* são considerados como da microbiota normal, já *S. xylosus* e *S.sciuri*, parecem proceder do ambiente (PYORALA et al., 2009). Vanderhaeghen et al (2015), consideram o *S.xylosus* uma espécie versátil mas que pouco se conhece sobre sua epidemiologia. Luthje e Schwarz, (2006) na Alemanha isolaram 259 cepas de ECN de casos de mastite subclínica com a seguinte distribuição; *S.chromogenes* (33,2%), *S.simulans* (23,2%), *S.epidermidis* (11,7%) e *S.haemolyticus*, *S.xylosus* (9,4%). Park et al., (2011), em 263 amostras de ECN de vacas com infecções intramamárias (IMI) no Estados Unidos identificaram 11 diferentes espécies, incluindo, *S.chromogenes* (72,2%), *S.xylosus* (9,1%), *S.haemolyticus* (6,1%), *S.sciuri* ssp. *carnaticus* e *S. hyicus* (3%), *S.simulans* (2,7%), *S. caprae* (1,1%) *S.epidermidis* e *S.succinus* (0,8%), *S.capitis* e *S.hominis* (0,4%). Segundo Vanderhaeghen et al (2014), as cinco espécies de ECN frequentemente identificadas como causadoras de infecção intramamária são *S.chromogenes*, *S.simulans*, *S.haemolyticus*, *S.xylosus* e *S.epidermidis*.

Segundo um trabalho realizado em Uganda (Bjork et al., 2014) verificaram que, de 166 quartos mamários com mastite subclínica, provenientes de pequenas propriedades leiteiras e submetidos à análise microbiológica, resultaram em 31,7% de ECN, identificados como *S.epidermidis* (85%) e *S.haemolyticus* (15%).

No Canadá, de um total de 877 isolados de ECN, 20 diferentes espécies foram identificadas, sendo *S.chromogenes* a espécie mais comum (48%), seguida de *S.simulans* (19%) e *S.xylosus* (10%). Somente nove espécies foram associadas à infecções persistentes e diferiram quanto a influência no número de células somáticas, sugerindo que algumas espécies (*S.chromogenes* e *S.simulans*) são mais adaptáveis ao hospedeiro (Fry et al., 2014).

Segundo Vanderhaeghen et al, (2014), existem resultados ainda conflitantes em relação a verdadeira importância dos ECN para saúde da glândula mamária, principalmente no aspecto epidemiológico, do potencial de virulência, seu papel nas infecções intramamárias persistentes e efeitos sobre a contagem de células somáticas. Desta forma os ECN não devem ser considerados um grupo homogêneo de bactérias, sendo necessário mais estudos para elucidação destes aspectos, além de uma especial atenção na identificação, classificação e associação as patologias que possam eventualmente causar (VANDERHAEGHEN et al., 2015).

No presente estudo o isolamento de enterobactérias das amostras de leite oriundas dos oito tanques de refrigeração comunitários e dois particulares, sinalizam a necessidade de medidas higiênicas de limpeza e desinfecção já que representam a linha final da ordenha, comprometendo a qualidade do leite que chegará ao laticínio.

Dos tanques de refrigeração estudados foram isolados ECN em três deles. Os microrganismos mais freqüentes entre os isolados dos tanques foram os bastonetes Gram-negativos, da família *Enterobacteriaceae* principalmente *Escherichia coli*, presente em quatro tanques. Uma explicação para tal fato pode ser a não utilização de diluição das amostras do tanque, antes da semeadura no meio de cultura, fato que possivelmente beneficiou o isolamento das enterobactérias em detrimento aos estafilococos. Os coliformes termo-tolerantes como *E.coli*, podem alcançar os tanques de refrigeração tanto via secreção intramamária como via contaminação fecal do úbere ou de equipamentos utilizados na ordenha (TEBALDI et al, 2008). Picoli et al., (2014) encontraram *Escherichia coli* em tanques resfriadores de 27,8% das propriedades estudadas em seis municípios do Rio Grande do Sul. O isolamento de enterobactérias, principalmente *E.coli* demonstra precária higiene e evidencia riscos a saúde pública.

Entre os vários fatores de virulência intrínsecos aos *Staphylococcus* spp, alguns estão relacionados com a mastite, particularmente a capacidade de produzir toxinas (RALL et al., 2014).

Tendo em vista a sua grande importância em saúde pública pela produção de enterotoxinas, termorresistentes, resistindo a pasteurização (LAMAITA et al., 2005), a alta prevalência de mastite subclínica nos rebanhos estudados (55,2%) e a ocorrência de venda informal de leite por parte dos pequenos produtores rurais, o risco se torna evidente.

No presente estudo a pesquisa dos genes codificadores clássicos para a produção de enterotoxinas (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*) foi realizada, a partir de 142 amostras de leite com mastite subclínica, de 105 cepas de *Staphylococcus* spp isoladas de mastites subclínicas e de 10 amostras de leite de tanques de resfriamento. Com relação as amostras coletadas diretamente do leite dos animais com mastite subclínica 17/142 (12%) foi positiva para algum dos genes estudados. O gene *sea* foi o mais prevalente, sendo detectado em 11 (7,7%) das amostras. O gene *seb* foi detectado em cinco (3,5%) das amostras e o *sec* em apenas uma (0,7%). Todas as amostras foram negativas para o gene *sed*.

Em estudo realizado no Brasil em amostras de leite de vacas com mastite subclínica e sadias o gene para produção de enterotoxinas *sea* foi o mais prevalente em ambos os grupos, sendo detectado em 52,5% nos animais com mastite subclínica, já para o gene *seb* os resultados foram semelhantes ao presente estudo sendo detectado em 3,2% das amostras (Rall et al., 2014).

Quando consideramos os resultados das análises moleculares das cepas de *Staphylococcus* spp isoladas das mastites subclínicas, houve detecção do gene *sec* em oito (7,6%) de um total de 105 amostras. Dos oito isolados de *Staphylococcus* spp, positivos para *sec* 05/105 (4,7%) eram ECP, sendo três *S.aureus* e dois *S.intermedius* e três eram ECN (2,8%), um *S.xylosus*, um *S. hyicus* e um *S. lugdunensis*. Para *sea*, *seb* e *sed* as amostras foram negativas. Tais resultados diferem de estudos recentes que encontraram alta prevalência do gene *sea*, principalmente em cepas de *S.aureus*. Shanehbandi et al. , (2014) obtiveram resultado de 34,8% de positividade para *sea* de isolados de *S.aureus*, 13% para *seb* e 4,3% para *sec*. Para *sed*, da mesma forma que neste estudo não houve positividade. Já Oliveira et al.,

(2011), no Brasil, de 574 cepas de *Staphylococcus* spp, 19% eram enterotoxigênicas, sendo 68,8% capazes de produzir a toxina D, enquanto apenas 12,8% a toxina A. Bianchi et al., (2014), em 481 isolados de *S. aureus*, obtiveram positividade para um ou mais genes em 53% das amostras, sendo 25% delas positivas para *sed*. Boynukara et al., (2008) encontraram o gene *sea* em 23,6% das cepas de *S.aureus*, isoladas de mastites subclínicas. Rall et al., (2014) encontraram resultados semelhantes a este estudo quanto a detecção do gene *sec*, com 10% das cepas de *Staphylococcus* spp isoladas de mastites subclínicas, positivas para este gene, enquanto que no presente estudo encontrou-se 7,6% de positividade. Ainda de acordo com Rall et al., (2014), os genes *seb* e *sec* apresentaram baixa frequência em vacas com mastite, ambas em 1,5% das cepas de *Staphylococcus* spp, no presente estudo todas foram negativas.

Guimarães et al., (2013), encontraram prevalência maior do gene *sea* em isolados de ECN (35,1%) quando comparados aos ECP (9,5%). No presente estudo, o *S.xylosus*, *S.hyicus* e *S.lugdunensis* foram associados ao gene produtor de enterotoxina, *sec*, em contrapartida o *S.warneri*, apesar de mais prevalente, não apresentou genes codificadores de toxinas. No trabalho de Guimarães et al., (2013), *S.warneri* e *S.hyicus* mostraram alta porcentagem de genes codificadores de enterotoxinas, 77,5% e 81,3% respectivamente. Para os ECN, os mais frequentes foram, *sea* (35,1%), *seb* (7,1%) e *sec* (6,5%). No trabalho de Unar e Cinar (2012), de 81 isolados de ECN, provenientes de vacas com mastite subclínica em 40,7% foram encontrados genes codificadores de enterotoxinas.

Das 10 amostras de leite dos tanques, duas (20%) foram positivas para *sea* e uma (10%) para *sec*. A contaminação dos tanques de resfriamento ocorre principalmente através de três vias: contaminação da superfície externa do úbere e/ou dos tetos; pelos equipamentos de ordenha; e através do leite mastítico (OLECHNOWICZ e JASKOWSKI, 2012). Ainda que a detecção de enterotoxinas patogênicas em leite cru procedentes dos tanques de expansão tenha sido relativamente baixa, é importante ter em mente que as bactérias patogênicas podem sobreviver e multiplicar-se em temperaturas de refrigeração, podendo ocasionar surtos de intoxicação alimentar, ainda que em

baixas doses. Portanto, o consumo de leite cru e seus derivados representa um risco em potencial à saúde pública.

Em muitos casos a mastite é tratada sem o diagnóstico bacteriológico. Uma incorreta estratégia de tratamento com antibióticos pode selecionar as cepas de MRS existentes, este fato é atribuído as cefalosporinas e outros beta-lactâmicos em humanos, e são antibióticos comumente usados em vacas de leite (TACONELLI et al., 2008).

O acúmulo dos MRSA nos animais e sua transferência para humanos, tem impacto na regulação do uso de antibióticos em ambas espécies. A prevenção da disseminação dos MRSA com potencial zoonótico necessita de uma ação conjunta de especialistas veterinários e médicos. Principalmente por meio da vigilância baseada numa melhor compreensão da evolução, reservatórios, e rotas de transmissão. Para tanto são imprescindíveis diagnósticos moleculares confiáveis e marcadores informando o potencial patológico dos MRSA nas diferentes doenças de humanos e animais (CUNY et al., 2009).

No presente estudo 6,2% das amostras de *S. aureus* foram positivas para o gene *mecA*, e nenhuma de ECN. Já na Finlândia, Gindonis et al, (2013), obtiveram 1,5% das amostras de *S. aureus* de mastite subclínica positivas para este gene, enquanto um número maior de ECN (5,2%) apresentaram o gene, sendo todos *S.epidermidis*. Além deste, também *S.simulans* e *S.chromogenes* tem sido associados a mastite bovina e a presença do gene *mecA* (FESSLER et al., 2010). Segundo Gindonis et al, (2013), a resistência a meticilina originada de mastite bovina é mais comum nos ECN. No trabalho de Unar e Cinar (2012), foram detectadas 6,1% de amostras de ECN isoladas de mastite subclínica bovina, positivas para o gene *mecA*. No presente estudo nenhuma cepa de ECN apresentou o gene *mecA*, talvez pela baixa prevalência das espécies mais associadas a este gene. Em contrapartida 16% das amostras de ECN foram resistentes a oxacilina.

A resistência bacteriana à meticilina, deve se na maioria das vezes, a modificação de uma proteína adicional de ligação a penicilina (PBP^{2a}) codificada pelo gene *mecA*, e representa um sério problema tanto do ponto de vista de sua detecção como por sua importância em saúde pública. Esta

resistência dos *Staphylococcus* spp, a meticilina implica em resistência aos beta-lactâmicos em geral e apresenta um padrão de resistência múltipla a outros antimicrobianos tais como as quinolonas e os aminoglicosídeos. (MARIN, 2002).

A resistência bacteriana é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes relacionados a esta. Pode ser originada em mutações, durante erros no processo de cópia do DNA na divisão celular, ou pela importação de genes, a qual ocorre devido aos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e frequentemente envolve genes situados nos plasmídeos e transposons (TAVARES, 2000).

Tendo em vista os resultados apresentados, verificou se que as propriedades leiteiras estudadas apresentavam um grau de deficiência quanto ao controle higiênico e sanitário, necessitando de medidas de controle para que o produto final seja destinado de maneira higiênica e livre de contaminantes potencialmente danosos a saúde pública.

CONCLUSÕES

9 CONCLUSÕES

1. Alta prevalência de mastite subclínica e isolamento de *Staphylococcus aureus* , alertam sobre a necessidade de medidas de controle, visando reduzir a disseminação e os prejuízos nos rebanhos estudados .
2. A detecção de genes codificadores de enterotoxinas tanto no leite das vacas quanto nos tanques de refrigeração comunitário sinalizam a possibilidade de em condições favoráveis estes se manifestarem com a produção de enterotoxinas acarretando riscos à saúde pública.
3. A presença do gene *mecA* de resistência a oxacilina em cepas de *S.aureus* destaca a importância de estudos regulares de monitoramento e vigilância que contribuam para prevenção e evitem a propagação das bactérias MRSA. A presença do gene *mecA* de resistência em cepas de *S.aureus* demonstram a necessidade de estudos a fim de proporcionar o desenvolvimento de estratégias para minimizar seu impacto na saúde pública e animal.
4. Em relação a sensibilidade antimicrobiana, as cepas de ECP e ECN avaliadas nos rebanhos do estudo apresentaram relevante grau de resistência aos aminoglicosídeos, gentamicina e neomicina, antibióticos ainda amplamente utilizados em tratamentos intramamários sugerindo monitoramento de sua eficácia “in vivo” e avaliação de alternativas.

BBIBLIOGRAFIA

LEMOS, F. A.

10 BIBLIOGRAFIA*

ALCARÃS, L.E.; SATORRES, S.E.; SEPULVEDA, L.; CENTORBI, O. N. P. Detección de *Staphylococcus aureus* spp. en manipuladores de alimentos. **La Alimentación Latino Americana**, n.219, p.44-47, 1997.

BADINI, K.B.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A.; LEAL, P.M. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente. **Rev. Saúde Pública**, v. 30, n.6, p.549-552, 1996.

BANGAR, Y.C.; SINGH, B.; DOHARE, A.K.; VERMA, M.R. A sistematic review and meta-analysis of prevalence of subclinical mastitis in dairy cows in India . **Trop Anim Health Prod**, 47(2):291-7.doi:10.1007/s11250-014-0718-y, 2014.

BAKER, J.S. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. **J. Clin. Microbiol.** v.19, p.875-79, 1984.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins (review). **Int. J. Food Microbiol.** v.61, p.1-10, 2000.

BARBALHO,T.C.F.; MOTA,R.A. Isolamento de agents bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no estado de Pernanbuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.2,n.2,p.31-36,2001.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** v.45, n.4, p.493-496, 1966.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Informação e documentação – Referências – Elaboração*: NBR 6023. Rio de Janeiro, 2002. 22p. BIOSIS. *Serial sources for the BIOSIS preview database*. Philadelphia, 1996. 468p.

BAUMGARTNER, A.; NIEDERHAUSER, I.; JOHIER, S. Virulence and resistance gene profiles of staphylococcus aureus strains isolated from read- to- eat foods. **J Food Prot.** 77(7):1232-6, 2014.

BIANCHI, D.M.; GALLINA, S.; BELLIO, A.; CHIESA, F.; CIVERA, T.; DECASTELLI, L.. Enterotoxin gene profiles of Staphylococcus aureus isolated from milk and dairy products in Italy. **Lett Appl Microbiol.** 58(2):190-6, 2014.

BERGDOLL, M.S. Importance of staphylococci that produce nanogram quantities of enterotoxin. **Zbl. Bakt.**, v.282, p.1-6, 1995.

BJÖRK, S.; BAGE, R.; KANYIMA, B.M.; ANDRÉ, S.; MUSOKE, N.G.M.; OWINY, O.D.; PERSSON, Y. Characterization of coagulase negative staphylococci from cases of subclinical mastitis in dairy cattle in Kampala, Uganda. **Irish Veterinary Journal**, 67:12, 2014.

BOYNUKARA,B.; GULHAN,T.; ALISARLI, M.; GUTURK, K.; SOLMAZ, H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolate from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. **Int. J. Food. Microbiol.** 125: 209-211, 2008.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev**, v.14, p.933-951, table of contents, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 51 de 18/09/2002. Instrução Normativa n.51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 20 de setembro de 2002. Seção 1, p.13-22.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 62 de 29/12/2011. Instrução Normativa n.62, de 29 de dezembro de 2011. **Diário Oficial da União, Brasília, Distrito Federal**, 30 de dezembro de 2011. Seção 1.

BRITTEN, A.; FOWLER, R.; HANSON, N.; MORRIS, N.; OOSTRA, K. Characterization of environmental streptococcal mastitis and its implication on milk quality. In MEMÓRIAS DEL CONGRESO PANAMERICANO DE CONTROL DE MASTITIS Y CALIDAD DE LA LECHE, 1., 1998, Mérida. **Anais...** Mérida, 1998. p.134-137.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A. Outbreak of Staphylococcal food poisoning in the municipality of Passos, MG, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology** [online], v.46, n.4, p.581-586, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals – Third Edition: **Approved Standard M31-A3**. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Agricultura Familiar- Indicadores, 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1534&t=2>> Acesso em 15 de janeiro de 2015.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Rev. Educ. Continuada**, São Paulo. v.1, n.1, p.3-9, 1998.

COSTA, E. O.; GARINI, J. R.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; MELVILLE, P. A. Resistência aos antimicrobianos de microrganismos do gênero *Staphylococcus* isolados de mastite bovina no decênio de 1992 a 2001. **Rev. Napgama**, São Paulo. v.7, n.2, p.13-20, 2004.

CUNHA, M.L.R.S., SINZATO, Y.K., SILVEIRA, L.V.A. Comparison of Methods for the Identification of Coagulase-negative Staphylococci. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, n.8, p.855-60, 2004.

CUNHA, M.L.R.S., PERESI, E., CALSOLARI, R.A.O., ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. **Braz. J. Microbiol.** v.37, n.1, p.70-74, 2006.

CUNY, C.; FRIEDRICH, A.; KOZYTSKA, S.; LAYER, F.; NÜBEL, U.; OHLSEN, K.; STROMMINGER, B.; WALTHER, B.; WIELER, L.; WITTE, W. Emergence of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animals species. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p. 109-117, 2010.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2013. Disponível em:

<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/dta_menu.html. Acesso em 18 de dezembro de 2014.

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

DROPA, M. **Caracterização genotípica de cepas da família Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamase de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo**. 2006. 116p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo.65:1576-1582,

FESSLER, A.T.; BILLERBECK, C.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci from bovine mastitis. **J. Antimicrob. Chemoter.** 65:1576-1582, 2010.

FIELD, A; MILES, J. 2010. Discovering Statistics Using SAS. 1 ed. **Sage Publications Ltd**, London, UK.

FRY, P.R.; MIDDLETON, J.R.; DUFOUR, S.; PERRY, J.; SCHOLL, D.; DOHOO, I. Associatio of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** v.97, p.4876-4885,2014.

GALVÁN, F. L.; CORONA, J.B.; ARANA, A.L.; POSADAS, M.V.; AGUAYO,D.D; PELAEZ, C.C.; ORTEGA, E.M.; CHAVEZ, A.G. Molecular detection and sensitive to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herds of central Mexico. **Biomed Research International**. Article ID 615153. 9 pages, 2014.

GILLESPIE, B.E.; HEADRICK, S.I.; BOONYAYATRA, S.; OLIVER, S.P. Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in three dairy research herds. **VeterinaryMicrobiology**, v.134, p.65-72, 2009.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

GILMOUR, A.; HARVEY, J. Staphylococci in milk and milk products. **Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.** V.19, p.147S-166S, 1990.bovine mastitis milk

GINDONIS, V.; TAPONEN, S.; MYLLYNIEMI, A.; PYORALA, S.; NYKASENOJA, S.; SALMENLINNA, S.; LINDHOLM, L.; RANTALA, M. Occurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 55:61, 2013.

GROHN, Y. T.; WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; HERTL, J. A.; SCHULTE, H.; BENNETT, G.; SCHUKKEN, Y. H. Effect of Pathogen-Specific Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3358-3374, 2004.

GUIMARÃES, F. F. Modificação na geografia da produção mundial de leite. **Rev. NAPGAMA**. v. 9, n.1, p.19-23, 2006.

GUIMARÃES, F.F.; NÓBREGA, D.B.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; MARSON, P.M.; PANTOJA, J.C.F.; LANGONI, H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **J. Dairy Sci.**, v.96, p.2866-2872, 2013

HAMMAD, A. M.; AHMED, A. M.; ISHIDA, Y.; SHIMAMOTO, T. First characterization and emergence of SHV-60 in raw milk of a healthy cow in Japan. **J Vet Med Sci**, v.70, p.1269-1272, 2008.

HILLERTON, J. E.; BERRY, E. A. Treating mastitis in the cow – A tradition or an archaism. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, n.2, p.1250-1255, 2005.

HOGAN, J. S.; WOLF, S. L.; PETTERSSON-WOLFE, C. S. Bacterial Counts in Organic Materials Used as Free-Stall Bedding Following Treatment with a Commercial Conditioner. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1058-1062, 2007.

IBGE. Censo Agropecuário, 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/agri_familiar_2006>. Acesso em 21 de fevereiro de 2015.

IBGE. Estatística da Produção Agropecuária, 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201404_2.shtm>. Acesso em 20 de fevereiro de 2015.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION BULLETIN, 2005

JAYARAO, B.M.; GILLESPIE, B.E.; LEWIS, M.J.; DOWLEN, H.H.; OLIVER, S.P. Epidemiology of *Streptococcus uberis* intramammary infections in a dairy herd. **Journal of Veterinary Medicine**, v.46, p.433-442, 1999.

JAGIELSKI, T.; PUACZ, E.; LISOWSKI, A.; SIEDLECKI, P.; DUDZIAK, W.; MIEDZOBRODZKI, J.; KRUKOWSKI, H. Short communication: Antimicrobial susceptibility profiling and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Poland. **J. Dairy Sci.** v.97, p.6122-6128, 2014.

JOHNSON, W.M., TYLER, S.D., EWAN, E.P., ASHTON, F.E., POLLARD, D.R., ROZEE, K.R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, n.3, p.426-430, 1991.

KALI WAL, B.B.; SADASHIV, S.O.; KURJOGI, M.M.; SANAKAL, R.D. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Coagulase-Negative Staphylococci isolated from Bovine Mastitis. **Veterinary World**, v.4, n.4, p.158-161, 2011.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JUNIOR, W.C, PROCOPP, G., WOODS, G. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 6^oEd. Philadelphia: J.B. Lippincott, 2008. 1565p.

KRISTULA, M. A.; DOU, Z.; TOTH, J. D.; SMITH, B. I.; HARVEY, N.; SABO, M. Evaluation of free-stall mattress bedding treatments to reduce mastitis bacterial growth. **J Dairy Sci**, v.91, p.1885-1892, 2008.

LANGONI, H. **Etiologia da mastite bovina subclínica e clínica: Perfil da sensibilidade microbiana, controle e repercussão na produção leiteira e na saúde pública**. 1995. 200p. Tese (Livro docência em zoonoses)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.**33(5): 620-626, maio 2013.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. Staphylococcus aureus and food poisoning. **Gen. Mol. Res.**, v.2, p.63-76, 2003.

LIU, P; MULLER, M; DERENDORF, H. Rational dosing of antibiotics: the use of plasma concentration versus tissue concentration. **Int. J. Antimicrob. Agents**. 19(4):285-90, 2002.

LUTHJE, P.; and Schwarz, S. Antimicrobial of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to

macrolide-lincosamide resistance phenotype and genotypes. **J. Antimicrob.Chemoter.** 57:966-969, 2006.

MARIN M. Resistencia del Staphylococcus a la meticilina. **Medicina(BAires).** 62(Supl 2):30-5,2002.

MARTINS, R.P; SILVA, J.A.G; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA FILHO, E.S. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Ciênc. Anim. Bras.**, v.11, n.1,p. 181-187, 2010.de produção leiteira

MEYER, N.S.; PICOLI, T.; PETER, C.M.; CZERMAINSKI,L.A.; MARQUES, L.T; ZANI,J.L. Micro-organismos isolados de quartos mamários com mastite subclínica em unidades de produção leiteira de Pelotas/RS. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 22., 2013, Anais Pelotas 2013.

MILKPOINT; Disponível em: www.milkpoint.com.br ; Acesso em: 20 de fevereiro de 2015.

MURAKAMI, K., MINAMIDE, K., WADA, K., NAKAMURA, E., TERAOKA, H., WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** v.29, p.2240-44, 1991.

MUSTAFA, M.M.S.; JAIN, L.C.S.; AGRAWAL, C.V.K. Food poisoning outbreak in a military establishment. **MJAFI [online]**, v.65,n.3,p.240-243, 2009.

NERO, L. A.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M. M. S. Hábitos alimentares do consumidor de leite cru de Campo Mourão – PR. **Ciências Agrárias**, v.24, n.1, p.21-26, 2003.

OLECHNOWICZ , J.; JASKOWSKI, M. Somatic cells count in cow's bulk tank milk. **J. Vet. Med. Sci.** 74(6): 681-686,2012.

OLIVEIRA, A.M.; PADOVANI, C.R; MIYA, N.T; SANTANA, A.S.; PEREIRA, J.L. High incidence of enterotoxin D producing *Staphylococcus* spp. in Brazilian cow's raw milk and its relation with coagulase and thermonuclease enzymes. **Foodborne Pathog Dis.** 8(1):159-63,2011.

OLIVEIRA, J.L.P.; KOZERSKI, N.D.; SILVA, D.R.; SILVA,A.V.; MARTINS, L.A. Fatores de risco para mastite e qualidade do leite no município de Altônia-PR. **Arq.Ciênc.Vet.Zool.**,v.16,n.1,p61-72, 2013.

OWENS, W.E.; RAY, C. H.; WATTS, J.L., YANCEY, R.J. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antimicrobial susceptibility test for bovine mastitis. **J. Dairy Sci.** v.80, p.313-317.

PARK, J.Y.; FOX, L.K.; SEO, K.S.; MCGUIRE M.A.; PARK, Y.H.; RURANGIRWA, F.R.; SISCHO, W.M.; BOHACH, G.A. Comparison of phenotypic and species genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. **Vet. Microbiol.** 147:149-154, 2011b.

PETTERSON-WOLFE, C. S.; ADAMS, S.; WOLF, S. L.; HOGAN, J. S. Genomic Typing of Enterococci Isolated from Bovine Mammary Glands and Environmental Sources. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.615-619, 2008.

PHILPOT, W.N. Today's challenge to meet tomorrow's needs. In MEMÓRIAS DEL CONGRESO PANAMERICANO DE CONTROL DE MASTITIS Y CALIDAD DE LA LECHE, 1., 1998, Mérida. **Anais...** Mérida, 1998. p.12-21.

PICOLI, T.; ZANI, J.L.; BANDEIRA, F.S.; ROLL, V.F.B.; RIBEIRO, M.E.R; VARGAS, G.A.; HUBNER, S.O.; LIMA, M.; MEIRELES, M.C.A; FISCHER, G. Manejo de ordenha como fator de risco na ocorrência de micro-organismos em leite cru. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v.35,n.4, suplemento 1, p. 2471-2480, 2014.

PINZON-SANCHEZ, C.; RUEGG, P.L. Risk factors associated with short-term post-treatment outcomes of clinical mastitis. **Journal of Dairy Science** 94,3397-3410, 2011.

PODKOWIK, M.; PARK, J.Y.; SEO, K.S.; BYSTRON, J.; BANIA, J. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. **Int J Food Microbiol.** 15;163(1):34-40, 2013.

PU, W.; SU, Y.; LI, J.; LI, C.; YANG, Z., et al; High incidence of oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. **Plos one** 9(2):e88134.doi: 10.1371, 2014.

PYORALA, S.; TAPONEN, S. Coagulase negative staphylococci. **Emerging mastitis pathogens**, 2009.

QUINN, P. J; MARKEY, B.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Ed. Artmed. Porto Alegre, 2005. 512p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine**, 10 ed. Saunders Elsevier, 2007. 2156 p.

RALL, V.L.M.; MIRANDA, E.S.; CASTILHO, I.G.; LANGONI, H.; GUIMARÃES, F.F.; ARAÚJO JÚNIOR, P.J.; FERNANDES JÚNIOR, A. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **J. Dairy Sci.** v.97, p.829-837, 2014.

RAHIMI, E. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. **Brazilian Journal of Microbiology**, 44,2, p.393-399, 2013.

SANCHEZ, P.; BUEZAS, V.; MAESTRE, J.R. *Staphylococcus lugdunensis* infection: report of thirteen cases. **Enferm.Infec.Microbiol. Clin.** 19(10):475-8,2001.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L.F.L. Microrganismos patogênicos transmitidos pelo leite. In: **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Manole: São Paulo, p. 268-277, 2007.

SAS, I. 2008. **User's guide**. Version 9.2, SAS Inst. Inc., Cary, NC.

SHANEHBANDI, D.; BARADARAN,B.; ETEGHAD, S.; ZARREDAR, H. Occurrence of methicillin resistance and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in traditional cheeses in the north west of Iran. **IRSN Microbiology**. Article ID 129580, 5 pages, 2014.

SMITH, J.L.; BUCHANAN, R.L.; PALUMBO, S.A. Effect of food environment of staphylococcal enterotoxin synthesis: A review. **J. Food Protect.**, v.46, p.545-555, 1983.

SORIANO, J.M.; FONT, G.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends Food Sci. Tech.**, v.13, p.60-67, 2002.

STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA R.A.I.; NETO A.C. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v.26, n.1, 2006.

SZWEDA, P.; SCHIELMANN, M.; FRANKOWSKA, A.; KOT, B.; ZALEWSKA, M. Antibiotic resistance in staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis in Eastern Poland and analysis of susceptibility of resistant strains to alternative nonantibiotic agents: Lysostaphin, Nisin and Polymyxin B. **J. Vet. Med. Sci.** v.76(3), p.355-362, 2014.

TAPONEN, S.; PYORALA, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis – Not so different from *Staphylococcus aureus*? **Veterinary Microbiology**, v.134, n.1-2, p.29-36, 2009.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 33(3):281-301, 2000.

TEBALDI, V. M. R.; OLIVEIRA, T. L. C.; BOARI, C. A.; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanque de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolíticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas. 28(3), p.753-760, 2008.

TENHAGEN, B.A.; KOSTER, J.; WALLMANN; HEUWIESER, W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. **J. Dairy Sci.** 89:2542-2551, 2006.

TIMMS, L.L; and SCHULTZ, L.H. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. **J. Dairy Sci.** 70:2648-2657. 1987.

TREVISI, E.; ZECCONI, A.; COGROSSI, S.; RAZZUOLI, E.; GROSSI, P. ; AMADORI, M. Strategies for reduce antibiotic usage in dairy cattle farms. Reserch in **Veterinary Scienci**, v.96, p.229-233, 2014.

TRISTAN, A.; BES, M., MEUGNIER, H.; LINA, G.; BOZDOGAN, B.; COURVALIN, P.; REVERDY, M.E.; ENRIGHT, M.C.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Global distribution of Pantone-Valentine leucocidin-positive methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **Emerg Infect. Dis.** 13, 594-600, 2007.

UNAI, N. e CINAR, O.D. Detection of staphylococcal enterotoxin methicillin-resistance and Panton-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolate from cows and ewes with subclinical mastitis. **Trop Anim Health Prod.** 44(2): 369-75, 2012.

VANDERHAEGHEN, W.; PIEPERS, S.; LEROY, F.; VAN COILLIE, E.; HAESBROUCK, F.; DE VLIEGHER, S. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase-negative staphylococci associated with ruminant. **Vet. J.** 203(1):44-51, 2015.

VANDERHAEGHEN, W.; PIEPERS, S.; LEROY, F.; VAN COILLIE, E.; HAESBROUCK, F.; DE VLIEGHER, S. Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative staphylococcus species associated with ruminant udder health. **J. Dairy Sci.** v.97, p.5275-5293, 2014.

ZADOKS, R. N. General Introduction. In: ZADOKS, R. N. **Molecular and Mathematical Epidemiology of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* Mastitis in Dairy Herds**. Utrecht: Addix, 2002. p.1-26.

ZADOKS, R.N., SCHUKKEN, Y.H., 2006 Use of the molecular epidemiology in veterinary practice.

ZECCONI, A.; CALVINHO, L.; FOX, L. Staphylococcus aureus intramammary infections. **Bulletin of the International Dairy Federation**. V. 408; 2006. FIL-IDF. Brussels, Belgium.

WHO, 2007. World Health Organization, **Food safety, Risk assessment**. Available at: <http://www.who.int/foodsafety/micro/riskassessment/en/index.html> (last access on 30 April, 2008).

Trabalho Científico

LEMOS, F. A.

11 TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado à revista “*Ciência Rural*”

Normas para preparação do manuscrito

1. **CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os **artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via [eletrônica](#) e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

3. **O artigo científico** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.**

Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

4. **A nota (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

5. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

6. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

7. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

8. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.
10. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).
11. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.
12. Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).
13. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.
14. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.
15. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.
16. Todos os artigos encaminhados devem pagar a [taxa de tramitação](#). Artigos reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente.

Detecção de genes de enterotoxinas e perfil de sensibilidade antimicrobiana de estafilococos coagulase negativos isolados de mastite subclínica em pequenas propriedades da região de Bauru-SP

RESUMO

Estafilococos coagulase negativos (ECN) são comumente isolados de casos de mastite subclínica em bovinos. A importância de infecções intra-mamárias de cepas de ECN tem se tornado cada vez mais relevantes, mas o papel das diferentes espécies na mastite bovina, na qualidade do leite, seu potencial como produtor de enterotoxinas e de casos de intoxicação alimentar ainda não está totalmente esclarecidos. O presente estudo teve como objetivo o isolamento de estafilococos coagulase negativos, a partir de amostras de leite de bovinos, associados com casos de mastite subclínica, detectados em dez pequenas propriedades leiteiras familiares, com ordenha mecânica e produção média de 120 litros/dia, da região de Bauru – SP. Além disso, determinar a susceptibilidade antimicrobiana dos ECN isolados, bem como investigar a presença de genes de enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec* e *sed* e do gene *mecA* de resistência à oxacilina, a partir das cepas bacterianas do leite destes animais. Foram avaliados pelo teste California Mastitis Test (CMT), 535 tetos, sendo 160 positivos (29,9%) e, destes, em 50 (31,2%) foram isolados ECN. Das 12 espécies de ECN isoladas, as mais frequentes foram *S. warneri* e *S. hyicus*, ambos com oito isolados (16%) e *S. xylosus* com sete isolados (14%). Os maiores níveis de resistência frente aos antibióticos estudados, foi observado frente ao grupo dos beta-lactâmicos – penicilina e ampicilina, 56% e 52% de resistência, respectivamente, enquanto a enrofloxacin apresentou sensibilidade em 96% dos isolados. Com relação a presença de genes codificadores de enterotoxinas, dos 50 isolados, três foram positivos para o gene *sec* (6%) e negativos para o gene *sea*, *seb*, *sed* e *mecA*. Portanto, no presente estudo, reforça-se a importância dos estafilococos coagulase negativos na mastite subclínica, bem como a sua resistência aos antibióticos beta-lactâmicos.

33 **Palavras-chave:** mastite, bovino, enterotoxinas, estafilococos coagulase
34 negativo, gene *mecA*, sensibilidade antimicrobiana.

35

36 **ABSTRACT**

37 Coagulase-negative staphylococci (CNS) are commonly isolated from cases of
38 subclinical mastitis in cattle. The importance of intra-mammary infections of
39 CNS strains has become increasingly important, but the role of different species
40 in bovine mastitis, milk quality, its potential as a producer of enterotoxins and
41 cases of food poisoning is not yet fully clarified. This study aimed at the isolation
42 of coagulase-negative staphylococci, from bovine milk samples, associated with
43 cases of subclinical mastitis detected in ten small family dairy farms with milking
44 and average production of 120 liters / day, in the region of Bauru - SP. Also,
45 determine the antimicrobial susceptibility of nosocomial and investigate the
46 presence of enterotoxin genes *sea*, *seb*, *sec* and *sed* and the *mecA* gene of
47 oxacillin resistance from the bacterial strains of the milk of these animals.
48 California Mastitis Test (CMT) was performed in 535 teats, with 160 positive
49 (29.9%) and of these, 50 (31.2%) were isolated CNS. Of the 12 CNS species
50 isolated, the most frequent were *S. warneri* and *S. hyicus*, both with eight
51 isolates (16%) and *S. xylosus* with seven isolates (14%). The highest levels of
52 resistance to antibiotics front studied, it was observed against the group of beta-
53 lactam antibiotics - penicillin and ampicillin, 52% and 56% strength respectively,
54 while enrofloxacin had a sensitivity of 96% of the isolates. Regarding the
55 presence of genes encoding enterotoxins, the 50 isolates, three were positive
56 for the *sec* gene (6%) and negative for the gene *sea*, *seb*, *sed* and *mecA*.
57 Therefore, the present study reinforces the importance of coagulase negative

58 staphylococci in subclinical mastitis as well as their resistance to beta-lactam
59 antibiotics.

60 **Key words:** mastitis, bovine, enterotoxin, coagulase negative staphylococci,
61 *mecA* gene, antimicrobial susceptibility.

62

63 INTRODUÇÃO

64 Mastites subclínicas ocasionadas por estafilococos coagulase
65 negativos (ECN) têm sido relatados em muitos sistemas de produção leiteira no
66 mundo todo (THORBERG et al., 2009).

67 O gênero é dividido em estafilococos coagulase positivos e estafilococos
68 coagulase negativos (ECN), baseado na sua habilidade em coagular o plasma
69 (PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009). Comumente, a diferenciação entre espécies de
70 ECN é baseada nas propriedades morfológicas e bioquímicas.

71 Mais de dez diferentes espécies têm sido isoladas a partir de amostras
72 de leite bovino mastítico e as espécies mais comumente relatadas são
73 *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus simulans*. *Staphylococcus*
74 *epidermidis* também têm sido frequentemente isolado. As espécies mais
75 comumente encontradas são *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus*
76 *simulans*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus epidermidis* e
77 *Staphylococcus haemolyticus*. Outros ECN frequentemente mencionados são
78 *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* e *S. lugdunensis* (THORBERG et al.,
79 2006).

80 A importância de infecções intra-mamárias de cepas de ECN tem se
81 tornado cada vez mais relevantes, mas o papel das diferentes espécies na
82 mastite bovina e na qualidade do leite ainda não está totalmente esclarecido
83 (FRY et al., 2014).

84 Apesar dos efeitos na contagem de células somáticas (CCS) e na
85 produção de leite seja considerado limitado, existem indicações de que estes
86 efeitos variam conforme a espécie, algumas inclusive, ao contrario do que se
87 acreditava são capazes de produzir infecções intramamárias persistentes. As
88 condições para estas manifestações podem estar associadas as cepas e a
89 imunidade do hospedeiro (VANDERHAEGHEM et al., 2014)

Os ECN não estão somente associados a efeitos negativos sobre a saúde da glândula mamária. Alguns autores sugerem que a colonização por certas espécies ECN, pode proteger o ápice dos tetos, principalmente de novilhas contra outros patógenos contagiosos e ambientais, além de um possível efeito positivo sobre a produção de leite (VANDERHAEGHEM et al., 2014).

Embora as enterotoxinas sejam produzidas principalmente por estafilococos coagulase positivos (ECP), alguns estafilococos coagulase negativos (ECN), envolvidos em uma variedade de infecções animais e humanas, têm tomado importância (CUNHA et al., 2006). Segundo Podkowik et al., (2013) as toxinas produzidas pelo *S.aureus*, já foram bem caracterizadas, enquanto que muito pouco ainda se sabe sobre o potencial enterotoxigênico das espécies coagulase negativas do gênero *Staphylococcus*.

Para as mastites por ECN, assim como para outros agentes, a prevenção é a chave para combater o problema. Entretanto, mais conhecimento e experiência são necessários para que o controle e as estratégias de prevenção sejam efetivas. ECN tendem a ser mais resistentes do que *S. aureus*, e facilmente desenvolvem multirresistência. O mecanismo de resistência mais comum é a produção de beta-lactamases, o que resulta a resistência para penicilina G e aminopenicilinas, e alguns destes podem carregar o gene *mecA* de resistência a oxacilina. Pelo uso indiscriminado de antibióticos, cepas multirresistentes são isoladas de bovinos com mastites por ECN, dificultando portanto o seu controle (MACHADO et al. 2008).

O presente estudo teve como objetivo o isolamento de estafilococos coagulase negativos, a partir de amostras de leite de bovinos, bem como determinar a susceptibilidade antimicrobiana dos ECN isolados e investigar a presença de genes de enterotoxinas (*sea;seb;sec;sed*) e do gene *mecA* de resistência à oxacilina, a partir das cepas bacterianas do leite destes animais.

118

119

120 MATERIAL E MÉTODOS

121

Foram visitadas uma única vez, dez pequenas propriedades familiares, localizadas em municípios pertencentes à região de Bauru e Marília - SP,

124 examinando-se amostras de leite de todas as vacas em lactação. O projeto foi
125 aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de
126 Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP – Campus de Botucatu; Protocolo N°
127 102/2014.

128 Todas as propriedades estudadas utilizavam o sistema de ordenha
129 mecânica, com produção média de 120 litros diários e rebanho mestiço de grau
130 de sangue variado. Quanto as instalações e higiene na ordenha, apenas uma
131 propriedade não tinha piso de cimento na sala de ordenha. Duas propriedades
132 possuíam sala de ordenha tipo fosso, e realizavam pré e pós – dipping. As oito
133 restantes, com manejo de “bezerro ao pé”, não apresentavam qualquer
134 preparação higiênica, seja na pré ou na pós-ordenha.

135 Previamente a coleta do leite, foi realizado o teste de Califórnia Mastitis
136 Test (CMT) em todos os tetos, utilizando-se de kit disponível comercialmente e,
137 daqueles que apresentaram reação a partir de uma cruz, coletaram-se as
138 amostras de leite em tubos de ensaio estéreis, realizando-se a anti-sepsia do
139 óstio do teto com álcool iodado 5% e imediatamente encaminhadas ao
140 laboratório, sob refrigeração, em caixa isotérmica contendo gelo reciclável.

141 Os isolados obtidos a partir das amostras de leite eram plaqueados em
142 Ágar Sangue (10 µL) e incubados por até 72 horas a 37°C. A identificação dos
143 estafilococos foi baseada na coloração de Gram e reação da catalase. Os
144 isolados eram então inoculados em caldo infusão de cérebro coração, por 24
145 horas, como descrito por Kloos; Scheleifer (1975). Após o período de
146 incubação, as espécies de estafilococos eram determinadas pela utilização de
147 provas bioquímicas.

148 Os estafilococos eram diferenciados de *Micrococcus* spp. baseando-se nas
149 provas de oxidação e fermentação da glicose, resistência à bacitracina (0.04U)
150 e susceptibilidade à furazolidona (100µg; Baker, 1984). A identificação de
151 *Staphylococcus* spp. seguiu a metodologia de Kloos; Schleifer (1975),
152 modificado por Cunha et al. (2004). Uma série de provas bioquímicas foram
153 realizadas, tais como fermentação de açúcares (xilose, arabinose, sacarose,
154 trealose, maltose, manitol, lactose, frutose e manose), produção de
155 hemolisinas, redução de nitrato, presença de urease e ornitina descarboxilase
156 e resistência à novobiocina.

157 Foi realizado perfil de sensibilidade para todas as amostras de ECN
158 isoladas, de acordo com Bauer et al. (1966), em placas contendo Agar Mueller
159 Hinton. Foram utilizadas as seguintes drogas para o antibiograma: gentamicina
160 (10µg), tetraciclina (30µg), penicilina G (10 U.I.), neomicina (30µg), ampicilina
161 (10µg), sulfazotrim (25µg), oxacilina (10µg), cefalexina (30µg) e enrofloxacin
162 (5µg).

163 Foi realizada extração de DNA a partir das amostras de ECN, isoladas
164 dos casos de mastite subclínica. O ácido nucléico foi extraído a partir de
165 linhagens de *Staphylococcus* spp. cultivadas em ágar sangue ovino a 5% e
166 inoculadas individualmente em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) e
167 incubadas a 37°C por 24 h. A extração foi realizada com GFX GenomicBlood
168 DNA Purification kit® (GE Healthcare®).

169 Foram utilizados iniciadores específicos para os genes codificadores de
170 cada enterotoxina, EEA (*sea1* e *sea2*), EEB (*seb1* e *seb2*), EEC (*sec1* e *sec2*)
171 e EED (*sed1* e *sed2*), de acordo com Johnson et al. (1991), em amostras de
172 leite das dez propriedades avaliadas.

173 As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de
174 0,5mL em volumes totais de 25µL, contendo 10pmol de cada primer, 2,0U de
175 Taq DNA polimerase, 100mM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM
176 de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL da amostra. Em todas as
177 reações realizadas foi utilizado um controle negativo, pela substituição do
178 ácido nucléico por água. A incubação foi realizada em termociclador
179 Mastercycler Pro - Eppendorf®, empregando-se inicialmente os parâmetros
180 descritos por Johnson et al. (1991) com algumas modificações propostas por
181 Cunha et al. (2006) que consistem de: um primeiro ciclo a 94°C por quatro
182 minutos, desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento dos primers a 55°C e
183 extensão a 72 °C por um minuto e 30 segundos. Posteriormente procede-se
184 um segundo ciclo de desnaturação a 94 °C por 2 minutos, anelamento dos
185 primers a 53 °C e extensão a 72 °C por um minuto e 30 segundos. No terceiro
186 ciclo a temperatura de anelamento é reduzida para 51 °C seguido por mais 37
187 ciclos com estes últimos parâmetros. Após completar os 40 ciclos, os tubos são
188 incubados a 72 °C por sete minutos antes de resfriar à 4 °C.

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em gel de agarose a 1% preparado em tampão de TBE 1,0 X e corado com Syber® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen)®, na concentração de 22uL/170 mL de gel . O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão 100 pb e posteriormente fotografado sob transiluminação UV. Cepas toxigênicas de referência internacional de *S. aureus* foram utilizadas como controle positivo: *S. aureus* produtor de *sea*: ATCC* 13565; *S. aureus* produtor de *seb*: ATCC 14458; *S. aureus* produtor de *sec*: ATCC 19095 e *S. aureus* produtor de *sed*: ATCC 23235.

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL em volumes totais de 25µL, contendo 10 pmol de cada primer, 2,0U de Taq DNA polimerase, 100mM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL da amostra. A incubação foi realizada em termociclador apropriado, utilizando os primers *mecA1* (AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG) e *mecA2* (AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG), empregando os parâmetros descritos por Murakami et al. (1991) que consistem de: 40 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos *primers* a 55,5°C por trinta segundos e extensão a 72°C por um minuto. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por cinco minutos antes de resfriar à 4°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das dez propriedades visitadas, foram coletadas amostras de um total de 134 vacas em lactação, sendo que 74 (55,2%) apresentaram ao menos um quarto com mastite subclínica. Através do CMT foram avaliados 535 quartos mamários. Destes, 160 (29,9%) foram positivos, sendo submetidos a análise microbiológica, resultando em 50 (31,2%) amostras de ECN.

Foram identificadas 12 diferentes espécies de ECN, a mais freqüentes foram *S. warneri* e *S. hyicus*, ambos com 8 (16%). As demais espécies encontradas foram: sete *S. xylosus* (14%); seis *S. sacharolyticus* e seis *S. lugdunensis*, ambos com 12%; quatro *S. haemolyticus* (8%); três *S. epidermidis* (6%), dois *S. pasteurii*, dois *S. chromogenes*, dois *S. hominis*, ambos com 4% e apenas uma amostra de *S. saprophyticus* e uma amostra de *S. auricularis* (2%) (Tabela 1).

223

224 **TABELA 1.** Estafilococos coagulase negativos (ECN) correspondendo a
 225 47,6% dos isolados de 105 amostras de *Staphylococcus* spp., obtidos de
 226 mastite subclínica, procedentes de dez pequenas propriedades leiteiras do
 227 Estado de São Paulo.

AGENTE	NÚMERO	%
	ISOLAMENTOS	
<i>S. warneri</i>	08	16,0
<i>S. hyicus</i>	08	16,0
<i>S. xylosus</i>	07	14,0
<i>S. lugdunensis</i>	06	12,0
<i>S. sacharolyticus</i>	06	12,0
<i>S. haemolyticus</i>	04	8,0
<i>S. epidermidis</i>	03	6,0
<i>S. pasteurii</i>	02	4,0
<i>S. chromogenes</i>	02	4,0
<i>S. hominis</i>	02	4,0
<i>S. auricularis</i>	01	2,0
<i>S. saprophyticus</i>	01	2,0
TOTAL	50	100,0

228

229

230 A avaliação pelo método de sensibilidade in vitro frente aos
 231 antimicrobianos estudados demonstrou níveis de resistência das amostras de
 232 ECN, para a penicilina e ampicilina, de 56 e 52% respectivamente. Para os
 233 demais antibióticos testados a resistência foi de 36% para tetraciclina, 20%
 234 para gentamicina, 18% para neomicina, 16% para oxacilina, 14% para
 235 cefalexina, 12% para o sulfazotrim e 4% para enrofloxacin . A **Tabela 2**

236 apresenta os resultados considerando-se o perfil de resistência dos ECN
237 isolados.

238

239 **TABELA 2.** Antibiógrama, com resultados em porcentagem, de resistência dos
240 estafilococos coagulase negativos (ECN), isoladas de leite bovino.

<i>Drogas</i>	<i>Resistência</i>
	<i>ECN</i>
Penicilina G(10UI)	56,0
Ampicilina (10 µg)	52,0
Tetraciclina (30µg)	36,0
Gentamicina(10µg)	20,0
Neomicina (30µg)	18,0
Oxacilina (10µg)	16,0
Cefalexina (30 µg)	14,0
Sulfazotrim (25 µg)	12,0
Enrofloxacina(5µg)	4,0

241

242

243 Com relação a presença de genes codificadores de enterotoxinas, dos
244 50 isolados, três ECN foram positivos para o gene *sec*, (6%) e *negativas para o*
245 *gene sea, seb, sed e mecA (Tabela 3).*

246

247

248

249 **TABELA 3.** Detecção de genes de enterotoxinas, pela técnica de Reação em
250 Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras de leite com mastite subclínica por
251 estafilococos coagulase negativos (ECN).

Espécie	sea	seb	sec	sed	mecA
<i>S.xylosus</i>	-	-	1	-	-
<i>S.hyicus</i>	-	-	1	-	-
<i>S.lugdunensis</i>	-	-	1	-	-
Total	-		3	-	-

252 Legenda: - = não detectado

253

254 Os ECN foram isolados em 31,2% das 160 amostras. As espécies mais
 255 freqüentes dentre as 12 espécies isoladas foram *S.warneri*, (16%), *S. hyicus*
 256 (16%) e *S. xylosus* (14%). Guimarães et al (2013), em 10 rebanhos no Brasil,
 257 identificaram 263 amostras de *Staphylococcus* spp, sendo 135 (51%)
 258 classificados como ECP e 128 (49%) como ECN, distribuídos em 18 diferentes
 259 espécies, com maior prevalência para *S.warneri*, *S.epidermidis* e *S. hyicus* .

260 Rall et al., (2014), no Brasil, em 292 amostras de leite com mastite
 261 subclínica, encontraram 22,6% de ECN, mas os resultados não associaram
 262 estatisticamente estas espécies aos casos de mastite, sendo inclusive a
 263 espécie *S.saprophyticus*, significativamente mais prevalente em vacas sadias.
 264 Corroborando com este estudo, o *S.warneri* foi o mais prevalente, com 27,5%
 265 dos isolados de vacas com mastite subclínica, seguidos por *S.saprophyticus*
 266 (16,3%) e *S.epidermidis* (13,8%). *S. xylosus* foi isolado em 7,5% dos casos de
 267 mastite subclínica, em nosso estudo 14% dos isolados eram de *S. xylosus*.
 268 Alguns estafilococos são frequentemente encontrados na pele sadia do úbere
 269 ou nas mãos dos ordenhadores. *S.warneri*, *S.epidermidis* , *S.simulans* e
 270 *S.saprophyticus* são considerados como da flora bacteriana normal, já *S.*
 271 *xylosus* e *S.sciuri*, parecem proceder do ambiente (PYORALA et al., 2009).

272 Vanderhaeghen et al (2014), consideram o *S.xylosus* uma espécie
 273 versátil mas que pouco se conhece sobre sua epidemiologia. Luthje et al.,
 274 (2006) na Alemanha isolaram 259 cepas de ECN de casos de mastite
 275 subclínica com a seguinte distribuição; *S.chromogenes* (33,2%), *S.simulans*
 276 (23,2%), *S.epidermidis* (11,7%) e *S.haemolyticus*, *S.xylosus* (9,4%). Park et al.,
 277 (2011), em 263 amostras de ECN de vacas com infecções intramamárias (IMI)
 278 no Estados Unidos identificaram como no presente estudo 11 diferentes

279 espécies, incluindo, *S.chromogenes* (72,2%), *S.xylosus* (9,1%), *S.haemolyticus*
280 (6,1%), *S.sciuri ssp. carnaticus* e *S. hyicus* (3%), *S.simulans* (2,7%), *S. caprae*
281 (1,1%) *S.epidermidis* e *S.succinus* (0,8%), *S.capitis* e *S.hominis* (0,4%).

282 Segundo Vanderhaeghen et al (2014), as cinco espécies de ECN
283 frequentemente identificadas como causadoras de infecção intramamária são
284 *S.chromogenes*, *S.simulans*, *S.haemolyticus*, *S.xylosus* e *S.epidermidis*.
285 Trabalho realizado em Uganda (Bjork et al., 2014) verificou-se que, de 166
286 quartos mamários com mastite subclínica, provenientes de pequenas
287 propriedades leiteiras e submetidos à análise microbiológica, resultaram em
288 31,7% de ECN, identificados como *S.epidermidis* (85%) e *S.haemolyticus*
289 (15%).

290 No Canadá, de um total de 877 isolados de ECN, 20 diferentes espécies
291 foram identificadas, com a espécie *S.chromogenes* sendo a mais comum
292 (48%),seguido da *S.simulans* (19%) e *S.xylosus* (10%). Somente nove
293 espécies foram associadas à infecções persistentes e diferiram quanto a
294 influência no número de células somáticas, sugerindo que algumas espécies
295 (*S.chromogenes* e *S.simulans*) são mais adaptáveis ao hospedeiro (Fry et al.,
296 2014). Segundo, Vanderhaeghen et al, (2014), existem resultados ainda
297 conflitantes em relação a verdadeira importância dos ECN para saúde da
298 glândula mamária, principalmente no aspecto epidemiológico, do potencial de
299 virulência, seu papel nas infecções intramamárias persistentes e efeitos sobre
300 a contagem de células somáticas. Desta forma os ECN não devem ser
301 considerados um grupo homogêneo de bactérias, sendo necessário mais
302 estudos para elucidação destes aspectos, além de uma especial atenção na
303 identificação, classificação e associação as patologias que possam
304 eventualmente causar (Vanderhaeghen et al., 2014).

305 Com relação a presença de genes codificadores de enterotoxinas, dos
306 50 isolados, três foram positivos para o gene *sec*, (6%) sendo, um *S. xylosus*,
307 um *S. hyicus* e um *S. lugdunensis*. e negativas para o gene *sea*, *seb*, *sed* e
308 *mecA*.

309 Guimarães et al., (2013), encontraram prevalência maior do gene *sea*
310 em isolados de ECN (35,1%) quando comparados aos ECP (9,5%). No
311 presente estudo, o *S.xylosus*, *S.hyicus* e *S.lugdunensis* foram associados a
312 produção de enterotoxinas, todos para *sec*, em contrapartida o *S.warneri*,

apesar de mais prevalente não apresentou genes codificadores de toxinas. Neste trabalho, ainda, foi demonstrado que *S.warneri* e *S.hyicus* revelaram alta porcentagem de gens codificadores de enterotoxinas, 77,5% e 81,3% respectivamente. Sendo os mais frequentes para os ECN, os para *sea* (35,1%), *seb* (7,1%) e *sec* (6,5%). No trabalho de Unal; Cinar (2012), de 81 isolados de ECN, provenientes de vacas com mastite subclínica em 40,7% foram encontrados genes codificadores de enterotoxinas.

A resistência bacteriana à meticilina, deve se na maioria das vezes, a modificação de uma proteína adicional de ligação a penicilina (PBP^{2a}) codificada pelo gene *mecA*, e representa um sério problema tanto do ponto de vista de sua detecção como por sua importância em saúde pública. Esta resistência dos *Staphylococcus* spp , a meticilina implica em resistência aos beta-lactâmicos em geral e apresenta um padrão de resistência múltipla a outros antimicrobianos tais como as quinolonas e os aminoglicosídeos (MARIN, 2002). No presente trabalho foi encontrada resistência aos aminoglicosídeos de 20% para gentamicina e 18% para neomicina e 14% para cefalexina, drogas bastante utilizadas em infecções intramamárias.

Na Finlândia, Gindonis et al. (2013), obteve 1,5% das amostras de *S. aureus* obtidas de mastite subclínica positivas para este gene, enquanto um número maior de ECN 5,2% apresentaram o gene, sendo todos *S.epidermidis*. Além deste, também o *S.simulans* e *S.chromogenes* tem sido associados a mastite bovina e presença de *mecA* (FESSLER et al., 2010). Segundo Gindonis et al, (2013), a resistência a meticilina originada de mastite bovina é mais comum nos ECN. No trabalho de Unal; Cinar (2012), foram detectadas 6,17% de amostras de ECN isolados de mastite subclínica bovina, positivas para o gene *mecA*. No presente estudo nenhuma cepa de ECN apresentou o gene *mecA* , talvez pela baixa prevalência das espécies mais associadas a este gene. Em contrapartida 16% das amostras de ECN foram resistentes a oxacilina.

CONCLUSÃO

Verificou-se que cepas de estafilococos coagulase negativos causadoras de mastite subclínica estão sendo isoladas nas pequenas propriedades avaliadas e o perfil de resistência antimicrobiana destes agentes aos

antimicrobianos beta-lactâmicos, assim como aos aminoglicosídeos, demonstra a necessidade de se reavaliar a terapia antimicrobiana mais adequada para o tratamento de mastite nestas propriedades.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo 2014/14803-0, pelo auxílio a pesquisa regular concedido.

REFERENCIAS

THORBERG, B.M.; DANIELSON-THAM, M.L.; EMANUELSON, U.; WALLER, P. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Sci.* 92: 4962-4970, 2009.

PYÖRÄLÄ; TAPONEN, 2009. PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci – Emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* 134: 3-8, 2009.

THORBERG, B.M.; KUHN, I.; AARESTRUP, F.M.; BRANDSTROM, B.; JONSSON, P.; NIELSSON-THAM, M.L. Pheno-and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet Microbiol.* 115: 163-172, 2006.

FRY, P.R.; MIDDLETON, J.R.; DUFOUR, S.; PERRY, J.; SCHOLL, D.; DOHOO, I. Association of coagulase-negative staphylococcal species, mammary quarter milk somatic cell count, and persistence of intramammary infection in dairy cattle. **J. Dairy Sci.** v.97, p.4876-4885, 2014.

VANDERHAEGHEN, W.; PIEPERS, S.; LEROY, F.; VAN COILLIE, E.; HAESBROUCK, F.; DE VLIEGHER, S. Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative staphylococcus species associated with ruminant udder health. **J. Dairy Sci.** v.97, p.5275-5293, 2014.

- 380 CUNHA, M.L.R.S., PERESI, E., CALSOLARI, R.A.O., ARAÚJO JÚNIOR, J.P.
381 Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from
382 foods. **Braz. J. Microbiol.** v.37, n.1, p.70-74, 2006.
- 383
- 384 PODKOWIK, M.; PARK, J.Y.; SEO, K.S.; BYSTRON, J.; BANIA, J. Enterotoxigenic
385 potential of coagulase-negative staphylococci. **Int J Food Microbiol.** 15;163(1):34-40,
386 2013.
- 387
- 388 MACHADO, T.R.O.; CORREA, M.G.; MARIN, J.M. Antimicrobial susceptibility of
389 coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. *Arq Bras Med*
390 *Vet Zootec* 60: 1; 278-282, 2008.
- 391
- 392 Kloos, W. E., and K. H. Schleifer. 1975. Simplified scheme for routine identification of
393 human *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.* 1:82–88. Baker, 1984
- 394
- 395 CUNHA, M.L.R.S., SINZATO, Y.K., SILVEIRA, L.V.A. Comparison of Methods for
396 the Identification of Coagulase-negative Staphylococci. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,**
397 v.99, n.8, p.855-60, 2004.
- 398
- 399 BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic
400 susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** v.45,
401 n.4, p.493-496, 1966.
- 402
- 403 JOHNSON, W.M., TYLER, S.D., EWAN, E.P., ASHTON, F.E., POLLARD, D.R.,
404 ROZEE, K.R. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock
405 syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **J. Clin.**
406 **Microbiol.**, v.29, n.3, p.426-430, 1991.
- 407
- 408 MURAKAMI, K., MINAMIDE, K., WADA, K., NAKAMURA, E., TERAOKA, H.,
409 WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by
410 polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** v.29, p.2240-44, 1991.
- 411

- 412 GUIMARÃES, F.F.; NÓBREGA, D.B.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; MARSON, P.M.;
413 PANTOJA, J.C.F.; LANGONI, H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and
414 coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **J. Dairy Sci.**, v.96, p.2866-
415 2872, 2013
- 416
- 417 RALL, V.L.M.; MIRANDA, E.S.; CASTILHO, I.G.; LANGONI, H.; GUIMARÃES,
418 F.F; ARAÚJO JÚNIOR, P.J.; FERNANDES JÚNIOR, A. Diversity of *Staphylococcus*
419 species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and
420 cows with subclinical mastitis. **J. Dairy Sci.** v.97, p.829-837, 2014.
- 421
- 422 PYORALA, S.; TAPONEN, S. Coagulase negative staphylococci. **Emerging mastitis**
423 **pathogens**, 2009.
- 424
- 425 VANDERHAEGHEN, W.; PIEPERS,S.; LEROY,F.; VAN COILLIE,E.;
426 HAESBROUCK, F.;DE VLIEGHER, S. Invited review: Effect, persistence, and
427 virulence of coagulase-negative staphylococcus species associated with ruminant udder
428 health. **J. Dairy Sci.** v.97, p.5275-5293,2014.
- 429
- 430 LUTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative
431 staphylococci from bovine suclinical mastitis with particular reference to macrolide-
432 lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* v.57, p.
433 966-969, 2006.
- 434
- 435 Park, J. Y., L. K. Fox, K. S. Seo, M. A. McGuire, Y. H. Park, F. R. Rurangirwa, W. M.
436 Sicho, and G. A. Bohach. 2011. Detection of classical and newly described
437 staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from
438 bovine intramammary infections. *Vet. Microbiol.* 147:149–154.
- 439
- 440 BJÖRK, S.; BAGE, R.; KANYIMA, B.M.; ANDRÉ, S.; MUSOKE, N.G.M.; OWINY,
441 O.D.; PERSSON, Y. Characterization of coagulase negative staphylococci from cases
442 of subclinical mastitis in dairy cattle in Kampala, Uganda. **Irish Veterinary Journal**,
443 67:12, 2014.
- 444

- 445 Unal, N., and O. D. Cinar. 2012. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-
446 resistant and Panton-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci
447 isolated from ows and ewes with subclinical mastitis. *Trop. Anim. Health Prod.* 44:369–
448 375.
- 449
- 450 MARIN M. Resistencia del Staphylococcus a la meticilina. **Medicina(BAires)**. 62(Supl
451 2):30-5,2002.
- 452
- 453 TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do
454 enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**
455 33(3):281-301,2000.
- 456
- 457 GINDONIS, V.; TAPONEN, S.; MYLLYNIEMI, A.; PYORALA, S.; NYKASENOJA,
458 S.; SALMENLINNA, S.; LINDHOLM, L.; RANTALA, M. Ocurrence and
459 characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk
460 samples in Finland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 55:61, 2013.
- 461
- 462 FESSLER, A.T.; BILLERBECK, C.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Identification and
463 characterization of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci from bovine
464 mastitis. **J. Antimicrob. Chemoter.** 65:1576-1582, 2010.

*A*NEXOS

12 ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu**A T E S T A D O**

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos isolados de leite bovino e de tanques de refrigeração procedentes de pequenas propriedades da região de Bauru-SP**" Protocolo nº 102/2014-CEUA, de Simone Baldini Lucheis, a ser conduzido por **Fábio Almeida de Lemos**, desta Faculdade, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 04 de julho de 2014.

Profª. Ass. Drª. Maria Lúcia Gomes Lourenço

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

ANEXO 2

Foram processados 300 µL do leite coletado diretamente do tanque, bem como das amostras de leite dos tetos das vacas. Adicionou-se 900 µL da solução de lise em tubo de 1,5 mL, homogeneizando-se. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por cinco minutos. Realizou-se a centrifugação a 12000 rpm por 20 minutos. Após a centrifugação removeu-se o sobrenadante por aspiração. Do pellet realizou-se uma digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL) e extração do DNA utilizando-se GFX Genomic Blood DNA Purification kit® (GE Healthcare®). Adicionou-se 500 µL da solução de extração à mistura e centrifugação a 10.000 x g por 4 minutos. Em seguida o sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 5.000 x g por 1 minuto. O líquido coletado descartado e 500 µL de solução de extração foi adicionada novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 µL da solução de lavagem foi adicionada à coluna e esta submetida a centrifugação a 20.000 x g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e 200 µL de água Milli Q aquecida a 70°C e utilizada para a eluição (CUNHA et al., 2006).

ANEXO 3

A extração foi realizada com GFX GenomicBlood DNA Purification kit® (GE Healthcare®). Foi transferido 200µL da suspensão de *Staphylococcus* spp. com 24 h de incubação para um eppendorf de 1,5 mL. Foi centrifugado a 10.000g por 1 minuto e removido todo o sobrenadante. A seguir, foi adicionou se 40 µL do tampão de lisozima e misturou se imediatamente em vórtex. Adicionou se 10 µL de lisozima e agitar-se em vórtex, incubando-se a temperatura ambiente por 15 minutos e agitando-se ocasionalmente. Adicionou 10 µL de proteinase K e agitar em vórtex. Incubar a 56°C por 15 minutos, homogeneizando-se em vórtex. Adicionar 500 µL do tampão de lise (Lysis Buffer), agitando-se vigorosamente. Incubar a mistura por 10 minutos a temperatura ambiente, agitando-se ocasionalmente. Em seguida, centrifuga-se a 5.000g por 1 minuto. À parte, coloca-se a coluna GFX em um tubo de coleta para cada purificação e coloca-se o tampão de eluição (água Mili Q) para aquecer em banho maria a 70°C. Transfere-se todo o volume da mistura de reação à coluna GFX (aproximadamente 500 µL) e centrifuga-se a 5.000g por 1 minuto. Descarta-se o líquido coletado no tubo e novamente coloca-se a coluna GFX para o tubo de coleta. Adiciona-se 500 µL do tampão de lise (Lysis Buffer) à coluna GFX e centrifuga-se novamente a 5000g por 1 minuto. Descarta-se o líquido coletado no tubo e novamente insere-se a coluna GFX para o tubo de coleta. Adiciona-se 500 µL da solução de lavagem (Wash Solution) à coluna e centrifuga-se a 14.000 rpm por 3 minutos. Transfere-se a coluna GFX para um eppendorf de 1,5 mL estéril. Adiciona-se 200 µL do tampão de eluição (água Mili-Q) pré-aquecido diretamente sobre a coluna GFX. Incuba-se a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifuga-se a 5.000g por 1 minuto e recupera-se o DNA que ficou no tubo. Em seguida, armazena-se o DNA extraído em freezer a -20°C, identificando-se as amostras.

APÊNDICE 1

FOTOS ARQUIVO PESSOAL – AMBIENTE DE ORDENHA



AMBIENTE DE ORDENHA

FOTOS ARQUIVO PESSOAL – TANQUES RESFRIAMENTO

