UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO MONITORAMENTO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* ENVOLVIDAS EM CASOS DE MASTITE BOVINA

Luciano Menezes Ferreira
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO MONITORAMENTO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* ENVOLVIDAS EM CASOS DE MASTITE BOVINA

Luciano Menezes Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Antonio Nader Filho

Co-orientador: Dr. Luiz Francisco Zafalon

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2008

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCIANO MENEZES FERREIRA – nascido aos 13 de junho de 1977, na cidade de Frutal – MG e itapagipense de coração, é médico veterinário formado pela Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade de Marília – UNIMAR, em dezembro de 2001. Foi monitor da disciplina de Tecnologia de Produtos de Origem Animal no segundo semestre de 2000, começando, assim, os primeiros passos na área de Medicina Veterinária Preventiva. Em agosto de 2001 iniciou o estágio curricular no Laboratório de Análises Microbiológicas de Alimentos de Origem Animal e Água, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, Unesp – Câmpus de Jaboticabal – SP. Ingressou no curso de pós-graduação desta universidade, em 2002, e obteve título de Mestre em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, em janeiro de 2004 com a dissertação intitulada "Variabilidade fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina". No mesmo ano, iniciou suas atividades no curso de Doutorado e, em 2006, realizou estágio de docência nas disciplinas de "Enfermidades Infecciosas dos Animais", sob supervisão dos professores Dr. Samir Issa Samara e Dra. Maria da Glória Buzinaro, e de "Controle Físico-Químico e Microbiológico de Produtos de Origem Animal", sob responsabilidade dos professores Dr. Antonio Nader Filho e Dr. Oswaldo Durival Rossi Júnior. No primeiro semestre de 2007 desempenhou o cargo de docente junto às disciplinas de "Epidemiologia Geral e Saneamento Ambiental Aplicado", "Tecnologia de Produtos de Origem Animal" e "Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal", no curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto – SP.

"Sonhe com aquilo que você quiser. Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance de fazer aquilo que se quer. Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz. As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos. A felicidade aparece para aqueles que choram. Para aqueles que se machucam. Para aqueles que buscam e tentam sempre. E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas".

(Clarice Lispector)

Dedico

Aos meus pais,
Maria Lúcia e Ivo,

pela constante presença, apoio e confiança durante toda
minha vida e, em especial,
por nos ensinarem que nunca é tarde demais para correr atrás
de um sonho.

Ofereço

Às minhas irmãs e amigas
Luciana e Adriana,

pelo amor e carinho compartilhados,
assim como à eterna torcida por mais uma vitória;

E aos sobrinhos
Ivo Neto, Heitor, Otávio e Jovana,
por me fazerem o tio mais amado e orgulhoso.

Agradeço

Às amigas Poliana, Sandra e Viviane,

pelos bons momentos
de trabalho e eterna amizade;

E aos grandes amigos Márcio, Juliana, Paula, Maira,
Angela, Denise, Cristina e Guido,

pelos inesquecíveis momentos de convívio e inestimáveis
amizades.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Antonio Nader Filho**, pela confiança em meu trabalho, eterna amizade e magnífica orientação que, em meus futuros passos, a seguirei.

Ao pesquisador **Dr. Luiz Francisco Zafalon** da EMBRAPA Sudeste, São Carlos-SP, pelas inestimáveis colaboração e co-orientação.

Aos **Profs. Drs. José Jurandir Fagliari, Luiz Augusto do Amaral, Manoel Victor Franco Lemos** e **Oswaldo Durival Rossi Júnior**, pela preciosa participação na composição da banca de Exame Geral de Qüalificação.

À **Profa. Dra. Naiá Carla Marchi de Rezende Lago** pelo excelente apoio profissional.

Aos **demais professores** do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pelo agradável convívio e constante ensinamento.

A **todos os funcionários** do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, em especial **Liliana Biondi Naka (Lila)** e **Waldemar Dibelli Jr. (Diba),** pelo precioso ensino e carinho com que me acolheram durante todos esses anos.

À **Profa. Dra. Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha,** professora do Instituto de Biociências, Depto. de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", câmpus de Botucatu, pela grande colaboração com a amplificação dos genes enterotoxigênicos.

Ao **Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos** e **toda sua equipe**, pelo precioso auxílio durante esse projeto, e em especial à amiga **Sandra de Oliveira Conde** pela incansável participação.

À **Profa. Eliana Gertrudes Macedo Lemos**, pelo gentil empréstimo do aparelho de Eletroforese de Campo Pulsado, e a **toda sua equipe**, especialmente à mestranda **Viviane** e ao **Dr. Luciano Kishi**.

Às amigas da graduação, **Malu, Liani, Kamila, Karina (Tchê)** e **Luciana** que estiveram sempre presentes em minha vida.

Aos amigos da pós-graduação, que já concluíram ou não seus cursos, **muito obrigado** pelo ótimo convívio e alegria de trabalhar ao lado de todos vocês.

A **todos meus professores**, desde o primário até a pós-graduação, obrigado pelo grande conhecimento compartilhado.

À **CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro.

À **minha família**, especialmente aos padrinhos **Neidinha e Tonico**, que não medem esforços para estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida, obrigado a todos vocês pelo amor e apoio durante mais uma jornada.

Aos meus cunhados, **Eufrásio Filho** e **Walter Henrique,** pela amizade e companheirismo. Muita sorte nesta nova etapa de suas vidas!

A todos aqueles que me ajudaram a vencer mais uma batalha, **muito obrigado**!

E, em especial, a **Deus**, pelo privilégio de ter todas essas pessoas em minha vida,

... o meu eterno agradecimento!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS..... x
LISTA DE FIGURAS..... xiii
RESUMO..... xiv
ABSTRACT..... xvi
1. INTRODUÇÃO..... 1
2. REVISÃO DA LITERATURA..... 3
3. OBJETIVOS..... 15
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 16
4.1. Características da propriedade rural e do rebanho..... 16
4.2. Seleção dos animais..... 16
4.3. Colheita das amostras..... 16
4.3.1. Amostras do óstio papilar..... 16
4.3.2. Amostras de leite dos quartos mamários para isolamento bacteriológico..... 17
4.3.3. Amostras dos insufladores da ordenhadeira mecânica..... 17
4.3.4. Amostras das lesões..... 17
4.3.5. Amostras de leite do tanque de expansão..... 17
4.4. Exames laboratoriais..... 18
4.4.1. Isolamento e identificação das estirpes de *Staphylococcus aureus*..... 18
4.4.1.1. Teste da coagulase livre em tubos..... 19
4.4.1.2. Teste da catalase..... 19
4.4.1.3. Teste de Voges-Proskauer..... 19
4.4.1.4. Teste da Maltose e da Trealose..... 19
4.4.2. Teste de sensibilidade a antimicrobianos..... 20
4.4.3. Extração de DNA..... 21
4.4.4. Amplificação de fragmentos de DNA cromossômico..... 22
4.4.5. Amplificação dos genes das enterotoxinas dos tipos A a D e da toxina TSST-1..... 23
4.4.6. Eletroforese de Campo Pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE)..... 23

4.5. Avaliação da capacidade discriminatória..... 25
5. RESULTADOS..... 26
6. DISCUSSÃO..... 42
7. CONCLUSÕES..... 56
8. REFERÊNCIAS..... 58

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* com respectivos sítios de isolamento de acordo com as datas de obtenção, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 26

Tabela 2. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* com respectivos sítios de isolamento de acordo com os resultados de teste de sensibilidade aos antimicrobianos, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 27

Tabela 3. Perfis de resistência aos antimicrobianos apresentados pelas estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas nas amostras colhidas na propriedade rural produtora de leite tipo B do Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 28

Tabela 4. Perfis de resistência aos antimicrobianos apresentados pelas estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de acordo com os respectivos sítios de isolamento, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 29

Tabela 5. Resistência das estirpes de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos de acordo com o número de princípios ativos resistentes e os respectivos sítios de isolamento, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 30

Tabela 6. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* com respectivos sítios de isolamento de acordo com a resistência individual aos princípios ativos testados, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 31

Tabela 7. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* com respectivos sítios de isolamento de acordo com a amplificação de pelo menos um dos genes estudados (*sea, seb, sec, sed* e *tst*), Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 32

Tabela 8. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* que amplificaram os genes *sea, seb, sec, sed* e *tst* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase segundo as datas de obtenção e os perfis enterotoxigênicos, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 33

Tabela 9. Padrões de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de acordo com os respectivos sítios de isolamento, Centro de Bovino de Leite, Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 34

Tabela 10. Distribuição dos padrões de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *Staphylococcus aureus* de acordo com as datas de obtenção, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 35

Tabela 11. Distribuição dos padrões de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *Staphylococcus aureus* de acordo com as datas de obtenção e os sítios de isolamento, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 37

Tabela 12. Distribuição dos padrões de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite de acordo com o período de obtenção, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 38

Tabela 13. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite de acordo com o período de obtenção com os respectivos padrões de macrorrestrição do crDNA relacionados aos perfis de resistência aos antimicrobianos, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 40

Tabela 14. Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* que amplificaram pelo menos um dos genes *sea, seb, sec, sed* e *tst*, e que foram tipadas pela Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE), Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006..... 41

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Representação gráfica da distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de acordo com os sítios de isolamento..... 27

Figura 2. Representação gráfica da resistência das estirpes de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos de acordo com o número de princípios ativos testados e aos respectivos sítios de isolamento..... 30

Figura 3. Representação gráfica da distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* com respectivos sítios de isolamento de acordo com a resistência individual dos princípios ativos testados..... 31

Figura 4. Exemplos de padrões de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *Staphylococcus aureus* encontrados..... 33

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO MONITORAMENTO DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* ENVOLVIDAS EM CASOS DE MASTITE BOVINA

RESUMO: Entre agosto de 2005 e dezembro de 2006, foram obtidas 245 estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de amostras de leite de vacas com mastite, de óstios papilares da glândula mamária e de insufladores da ordenhadeira, procedentes de um rebanho bovino produtor de leite tipo B. Com a finalidade de monitorar as estirpes de *S. aureus* envolvidas em casos de mastite bovina por meio da verificação da relação epidemiológica existente entre as estirpes isoladas, especialmente com vistas aos sítios de localização e vias de transmissão, as estirpes foram submetidas à Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE), à amplificação das seqüências codificadoras (*sea, seb, sec, sed* e *tst*), por intermédio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), e suas sensibilidades *in vitro* a 12 antimicrobianos foram determinadas. Os resultados obtidos revelaram 51 diferentes perfis, sendo que a resistência à penicilina foi a predominante entre as 179 (73,1%) estirpes de *S. aureus,* quando considerada de forma particular (54,8%) ou em conjunto (29,4%). As 66 (26,9%) estirpes restantes foram sensíveis aos 12 antimicrobianos testados e a vancomicina foi o único princípio ativo que se mostrou eficiente a 100% das estirpes testadas. A PFGE revelou 39 pulsotipos distintos, dos quais 25 (64,1%) encontraram-se distribuídos nas 137 (55,9%) estirpes obtidas do leite. Dentre estas, 92 (67,1%) estirpes apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos e foram agrupadas em 22 (88,0%) pulsotipos distintos. Foi observado, também, por meio da PFGE, que nenhum pulsotipo foi isolado por mais de três colheitas consecutivas e que somente o pulsotipo 29 foi identificado em 5 (31,2%) colheitas. Outra importante informação obtida pelo uso da PFGE foi a identificação, nos períodos A e H correspondentes a 12,5% das datas de obtenção das amostras, de estirpes isoladas, em um mesmo dia de colheita, do leite, dos óstios papilares e dos insufladores, pertencentes aos pulsotipos 2 e 12, respectivamente. A técnica de PCR para a amplificação das seqüências codificadoras dos genes *sea, seb, sec, sed* e *tst* possibilitou a identificação de 56 (23,7%) estirpes de *S. aureus* com pelo menos um gene. Dentre estas, o gene *sea* apresentou maior prevalência, com 35 (61,4%) estirpes isoladas, seguido pelo *tst, seb, sec* e *sed,* com 9 (15,8%), 7 (12,3%) , 6 (10,5%) e 2 (3,5%), respectivamente. Os resultados obtidos evidenciaram a necessidade da implementação de medidas eficazes na higienização

dos insufladores durante a ordenha, uma vez que foi constatada a sua participação no mecanismo de transmissão da mastite. A identificação de genes das enterotoxinas estafilocócicas e da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) evidenciou o risco potencial que o leite oriundo destes animais pode representar para a saúde da população consumidora.

Palavras-Chave: Enterotoxinas estafilocócicas, epidemiologia molecular, mastite bovina, PCR, PFGE, *Staphylococcus aureus.*

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY APPLIED TO MONITOR *STAPHYLOCOCCCUS AUREUS* STRAINS INVOLVED WITH BOVINE MASTITIS CASES

SUMMARY: Two hundred and forty five *Staphylococcus aureus* strains were isolated between August of 2005 and December of 2006 from samples collected from a type-B milk-producing herd. Samples encompassed milk collected directly from mastitic cows, papillas osteuns of mammary glands, and milking machine cups. Samples were subjected to Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) to monitor for the strains of *S. aureus* and to determine epidemiologic relationships between the isolated strains, taking into account the different precedence of strains. PFGE was used to monitor the presence of specific coding sequences (i.e., *sea*, *seb, sec, sed*, and *tst*) in the milk samples using polymerase chain reaction (PCR) amplification. Moreover, sensitivity of strains to 12 different antibiotics was determined *in vitro*. Results revealed the presence of 51 different PFGE profiles of *S. aureus* in the samples, and highlighted 179 (73.1%) penicillin resistant strains. Nonetheless, the 66 (26.9%) other strains were sensitive to all 12 antibiotics tested, and vancomycin was the only antibiotic effective against all tested strains. PFGE also revealed 39 distinct peaks with 25 of them (64.1%) being present in 137 (55.9%) strains obtained from milk. Of these strains, 92 (67.1%) were resistant to one or more antibiotics, and were further grouped in 22 (88.0%) distinct peaks. Additionally, PFGE revealed the presence of no distinct peaks in samples from three consecutive collection times, and that peak 29 was the only one identified in 5 collection times (31.2%). Importantly, PGFE also indicated that in the periods A and H, which corresponded to 12.5% of the total time points, the isolated strains from one collection day (samples from all 3 sources) all had the peaks 2 and 12, respectively. PCR technique used for amplification of the coding sequences of the genes: *sea, seb, sec, sed,* and *tst*, identified 56 (23.7%) strains containing at least one of these genes. The *sea* gene demonstrated the highest prevalence, 35 (61.4%) of the isolated strains. This was followed by *tst*, *sec*, and *sed* with 9 (15.8%), 7 (12.3%), 6 (10.5%), and 2 (3.5%) of the strains, respectively. Results from this study highlighted the necessity for implementation of effective methods for cleansing of milking machines because of possible contamination with multiple *S. aureus* strains and, therefore, increased risk for mastitis infection. Furthermore, the characterization of genes associated with

staphylococci enterotoxins and septicemia-induced toxic shock (*tst*) elucidated in this study suggests the emphasizes the potential risk of type-B milk to public health.

Keywords: Staphylococcals enterotoxins, molecular epidemiology, bovine mastitis, PCR, PFGE, *Staphylococcus aureus.*

1. INTRODUÇÃO

A mastite constitui-se na enfermidade mais comum em vacas leiteiras, o que acarreta prejuízos significativos ao produtor. Nas suas principais formas de apresentação, clínica e subclínica, a doença é causada por uma grande diversidade de microrganismos. Entre os diversos patógenos responsáveis por esta enfermidade, os *Staphylococcus aureus* são reconhecidos como os mais isolados em vários países do mundo.

Na maioria dos rebanhos, a forma clínica da mastite é considerada, pelos produtores, como a principal responsável pelas perdas financeiras, a mais evidente e que apresenta maiores preocupações. Entretanto, a forma mais comum e responsável pela grande parte dos prejuízos é a subclínica, principalmente pelo fato de as alterações do leite e do úbere não serem visíveis macroscopicamente, o que dificulta a identificação dos animais infectados.

S. aureus podem ser isolados de vários locais, tanto de vacas e de novilhas, quanto do alimento, da sala de ordenha e até mesmo de portadores humanos, ressaltando a importância do manejo durante a ordenha na prevenção de sua transmissão. Além disso, animais portadores podem constituir fonte de infecção permanente, o que permite a persistência de *S. aureus* durante toda a fase de lactação (BRAMLEY & DODD, 1984; ROBERSON et al. 1994, 1998).

A mastite por *S. aureus* é transmitida entre vacas ou entre os quartos mamários durante a ordenha, e pode ocorrer, também, por meio de algum elemento de ligação entre um quarto infectado e um sadio, como as mãos do ordenhador, o pano ou a esponja para secagem dos tetos e os insufladores da ordenhadeira mecânica. Com isso, ressalta-se a importância do *pré* e do *pós-dipping* e de cuidados com a higiene durante o procedimento de ordenha dos animais.

Sabe-se que pode existir, em um determinado rebanho e período, heterogeneidade genética considerável em populações naturais de *S. aureus*¸ dificultando o controle da mastite bovina, principalmente quanto à variação nos padrões de resistência aos antimicrobianos e de amplificação da região intergênica 16S-23S do RNA ribossomal (FERREIRA et al., 2006). No entanto, essa variabilidade pode ser explorada, também, para investigar a disseminação de estirpes de *S. aureus* de origem animal, assim como de humana (TENOVER et al., 1994; KAPUR et al., 1995).

O uso de antimicrobianos é uma das principais ferramentas para a eliminação de infecções intramamárias e que representa uma estratégia essencial para o controle desta enfermidade. A cura dos casos de mastite clínica de maneira rápida e eficiente, assim como a eliminação da infecção, prevenindo sua recorrência e diminuindo sua disseminação para os quartos não infectados, estão entre os principais objetivos do tratamento. No entanto, os usos inadequado e indiscriminado destes medicamentos podem selecionar estirpes de *S. aureus* multi-resistentes, o que dificulta o controle deste patógeno no rebanho e apresenta risco à Saúde Pública.

Outro fato importante e que deve ser considerado em relação aos *S. aureus* é quanto à capacidade de produzir enterotoxinas termoestáveis que estes microrganismos apresentam. Podem ser responsáveis pela morte do animal e demonstram, também, importância na microbiologia de alimentos como agente de intoxicações alimentares devido à ingestão de enterotoxinas e servem como indicadores higiênico-sanitários na indústria alimentícia, visto que o manipulador de alimentos é a principal fonte de transmissão. GILETTO & FYFFE (1998) relataram que as intoxicações estafilocócicas afetam 1,2 milhões de pessoas anualmente, o que resulta em perda econômica de 1,5 bilhões de dólares.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A mastite é uma enfermidade muito dinâmica, a qual afeta não somente a saúde do animal, mas também a economia do produtor rural e até mesmo do país. Adicionalmente, o movimento de animais no rebanho, com a entrada e a saída indiscriminadas, pode favorecer a introdução de novos patógenos na propriedade. Com isso, deve-se tomar cuidado principalmente com a reposição dos animais, devido ao risco de se inserir um animal doente na linha de ordenha, introduzindo, assim, um novo patógeno causador de mastite no rebanho (OSTERAS, 2006).

A mastite bovina por *S. aureus* constitui importante problema de Saúde Pública e com grande repercussão econômica. Resulta da penetração do agente patogênico pelo canal do teto para o interior da glândula e, se a condição para multiplicação do microrganismo invasor for favorável, os subprodutos do metabolismo do patógeno irão irritar o tecido e ocasionar inflamação, podendo causar perda da função da glândula (SCHALM et al., 1971).

Mastite ambiental e mastite contagiosa são termos usados para descrever a epidemiologia dos patógenos primários que causam infecção intramamária (SMITH & HOGAN, 1993). Sabendo-se que *S. aureus* é um patógeno contagioso, que seus principais sítios de localização nos animais são os quartos infectados, a pele do úbere e do teto, e que a transmissão desse microrganismo ocorre usualmente entre as vacas durante a ordenha, os pesquisadores ROBERSON & WILLIAMS (1995) montaram um esquema de controle de mastite baseado no conhecimento do patógeno. Em alguns países a incidência de mastite por *S. aureus* foi reduzida, no entanto, em outros países, este microrganismo ainda é a espécie de bactéria mais comumente isolada. Um indicativo da capacidade dos *S. aureus* de se adaptar a novas condições é o aumento na ocorrência de mastite em novilhas causado por esse microrganismo.

Por ser a enfermidade mais freqüente e dispendiosa do gado leiteiro, o prejuízo dela decorrente atinge cifras elevadas em conseqüência da redução na produção de leite e das perdas na composição físico-química que inutilizam o produto para o consumo ou mesmo para o beneficiamento. Também ainda se adicionam aos custos os gastos com medicamentos, a desvalorização do animal e a precária qualidade sanitária do leite (STEHLING et al., 1986).

Estima-se que no rebanho brasileiro ocorra a prevalência de 20 a 38% de mastite, o que representaria perdas da produção entre 12 a 15%. Sendo assim, considerada a causa de perda econômica mais significativa na indústria leiteira. Devem ser, também, computados gastos com medicamentos, serviços veterinários, leite descartado, descarte prematuro dos animais e, até mesmo, a diminuição do valor comercial dos animais (FONSECA & SANTOS, 2000; REIS et al., 2005). Segundo o NMC - Centro Nacional de Controle da Mastite, nos Estados Unidos, em 2002 a mastite foi responsável pela perda monetária de aproximadamente US$ 2 bilhões por ano (USDA, 2002 citado por VASUDEVAN et al, 2003).

A redução na produção total de leite é representada, principalmente, pela mastite subclínica (82,0%), enquanto que a mastite clínica representa 18,0% do prejuízo total devido ao descarte prematuro ou à morte do animal. Nos Estados Unidos, há estimativa de que 40,0% das vacas em lactação apresentem, pelo menos, um quarto com mastite subclínica, enquanto que no Brasil pesquisas realizadas (COSTA et al., 1995a; 1995b) nos estados de Minas Gerais e São Paulo fazem referência a índices de ocorrência de mastite subclínica na ordem de 72,0% e 17,5% de mastite clínica.

De acordo com SOMMERHÄUSER et al. (2003), se o número de quartos mamários infectados por *S. aureus* não diminuir após a implementação do Programa dos 5 pontos de controle da mastite, desenvolvido na Inglaterra na década de 1960 pelos pesquisadores do antigo NIRD (*National Institute of Research in Dairying*), deve ser feito uso intensivo de antibioticoterapia ou, em alguns casos, o descarte das vacas cronicamente infectadas. Este programa baseia-se nas seguintes medidas: adequado funcionamento do equipamento de ordenha, correto manejo de ordenha (utilização de pós-*dipping*), tratamento imediato de todos os casos clínicos, tratamento de vaca seca e segregação ou descarte de animais com mastite crônica.

O diagnóstico da mastite clínica, em muitos casos, é realizado a partir da observação de alteração no leite e presença de sinais da inflamação com dor, edema no úbere e redução na secreção do leite. No entanto, a mastite subclínica pode ser melhor caracterizada pelo aumento da contagem de células somáticas (CCS), devido ao influxo de leucócitos, uma vez que o leite está aparentemente normal. A prova do *California Mastitis Test* (CMT), desenvolvida por SCHALM & NOORLANDER (1957) a partir do fenômeno de Whiteside, surgiu devido à necessidade de um teste rápido e

eficiente, realizado a campo, como técnica auxiliar para o diagnóstico da mastite subclínica.

É de fundamental importância a conscientização dos produtores de leite sobre o prejuízo representado pela mastite subclínica, não só em relação à qualidade do leite, mas sobretudo pela acentuada redução da produção leiteira dos quartos afetados, sendo que os gastos com as medidas preventivas representam, em média, menos de 8,0% do prejuízo total representado principalmente pela redução na produção dos animais com mastite subclínica (COSTA et al., 1999). O exame bacteriológico do leite, obtido em um único quarto ou em amostras compostas, é o procedimento padrão para se estabelecer se o úbere está infectado (ELVINGER & NATZKE, 1992). Em casos de surtos de mastite clínica em rebanho, ou em casos isolados, especialmente em vacas de alto valor zootécnico, o isolamento do agente etiológico é o método diagnóstico de eleição. A cultura do leite de todas as vacas do rebanho, ou de parte delas, é útil no monitoramento da prevalência e dos patógenos presentes (SEARS et al., 1993).

Existe heterogeneidade genética considerável em populações naturais de *S. aureus* (TENOVER et al., 1994; KAPUR et al., 1995), a qual pode ser explorada para investigar a disseminação de estirpes de *S. aureus* de origens humana e animal. A avaliação desses traços heterogêneos inclui as variações das características bioquímicas e de sensibilidade a antimicrobianos, a fagotipagem, o perfil da presença de plasmídeos, o estudo das regiões variáveis dos genes da coagulase, da região X da proteína A e do espaçador intergênico entre as regiões 16S e 23S do RNA ribossomal, a amplificação aleatória de segmentos genômicos (RAPD-PCR), e a macrorrestrição do DNA celular total detectada pela eletroforese de campo pulsado (LANGE et al., 1999). No entanto, embora haja diferentes métodos para a tipagem de isolados de *S. aureus*, nem todos apresentam eficiência equivalente, no que diz respeito a suas capacidades discriminatórias.

Para se conhecer a complexidade etiológica das mastites causadas por *S. aureus,* faz-se necessária a caracterização fenotípica e genotípica das estirpes envolvidas nos casos desta enfermidade, assim como do equipamento de ordenha. O conhecimento do perfil molecular dos clones de *S. aureus* possibilita estudos epidemiológicos de dispersão deste patógeno em propriedades rurais. Com isso, estratégias e protocolos de profilaxia e controle da mastite podem ser melhor elaborados (SANTOS et al., 2003).

A técnica de *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), conhecida como Eletroforese de Campo Pulsado ou, também, de Campo Pulsátil, foi desenvolvida em 1984 por Scharwartz and Canter. É uma variação de eletroforese em gel de agarose, mas que apresenta alto poder de tipagem para inúmeros microrganismos, pois a alternância entre os sentidos do campo elétrico, ou pulsos, permite separar fragmentos que, convencionalmente, não seriam diferenciados em gel de agarose convencional que utilizam corrente elétrica constante (MASLOW & MULLIGAN, 1996).

A PFGE é uma técnica com alta reprodutibilidade e recomendada como método altamente discriminatório por detectar variações genéticas menores entre estirpes epidêmicas, também conhecidas como pulsotipos. No entanto, é um método laborioso e de alto custo devido, principalmente, à dificuldade de interpretação, pois necessita de programas especializados para analisar os resultados. Por outro lado, a técnica de PCR-ribotipagem foi desenvolvida para permitir amplificação de regiões polimórficas do espaçador intergênico da região 16S-23S do RNA ribossomal e tipagem de isolados de *S. aureus* de importância epidemiológica de forma simples, rápida e extremamente versátil (KOSTMAN et al., 1995). Esses espaçadores intergênicos estão localizados entre os genes do RNA ribossomal e podem diferir, em tamanho e em número de cópias, em decorrência da semelhança ou diversidade existente entre as estirpes analisadas (CUNY et al., 1996).

A utilização de técnicas moleculares para a diferenciação de estirpes de *S. aureus* isoladas em leite, água, ordenhadeira, mãos, tonsilas e fossas nasais de ordenhadores, associada aos métodos fenotípicos, como antibiograma e produção da enzima beta-lactamase, são de grande importância na identificação e na caracterização de isolados de *S. aureus*. Os métodos fenotípicos são, também, relevantes para a detecção dos produtos codificados pelas seqüências analisadas por intermédio das técnicas moleculares. Com isso, OLIVEIRA (2001) observou, em estudo realizado em cinco propriedades de exploração leiteira no estado de São Paulo, que o portador animal pareceu constituir fonte de infecção potencial na dinâmica de transmissão da mastite bovina causada por *S. aureus.*

Segundo FERREIRA et al. (2006), em trabalho realizado com 40 vacas da raça holandesa em uma propriedade rural do estado de São Paulo, 77 estirpes de *S. aureus* foram isoladas, durante 11 colheitas distribuídas em um ano, do leite de animais que apresentaram mastite subclínica. Foram encontrados quatro padrões distintos de *S.*

aureus resistentes aos antimicrobianos testados e nove ribotipos diferentes em uma mesma propriedade, com rebanho fechado, o que revela, assim, a existência de heterogeneidade genética entre estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina.

Alexander Fleming, em 1928, anunciou a descoberta de uma substância produzida pelo fungo *Penicillium notatum* que apresentava efeito inibitório sobre algumas bactérias. A indústria farmacêutica recebeu, a partir desse fato, grandes investimentos e promoveu a expansão da pesquisa de novos antibióticos. Até o final da década de 1960, muitos antibióticos foram introduzidos no mercado, geralmente com pequenas modificações nas moléculas das drogas já conhecidas. No entanto, quase tão rápido quanto as descobertas dos antibióticos, verificou-se o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes aos mesmos, principalmente devido ao seu uso indiscriminado e inadequado (MANRIQUE & GALVÃO, 1997).

Um dos fatores a ser levado em consideração no controle das mastites é a resistência dos agentes etiológicos aos antimicrobianos. O sucesso na terapia é prejudicado pelo crescente número de estirpes resistentes a esses medicamentos que são usados indiscriminadamente em Medicina Veterinária. Estudos realizados com estirpes de origem humana demonstram que a resistência à meticilina no *S. aureus* deve-se à presença de uma proteína de ligação à penicilina (PBP, do inglês “penicillin-binding protein”) adicional, denominada PBP 2’ ou PBP 2a, a qual é codificada pelo gene *mec*A. Essa proteína exibe baixa afinidade para a maioria das penicilinas e cefalosporinas, resultando em reação cruzada aos antibióticos beta-lactâmicos Com isso, acredita-se que o predomínio da resistência das estirpes estudadas frente à penicilina possa, a este fato, ser atribuído, pois são capazes de produzir a enzima beta-lactamase (ARCHER et al., 1994; TEIXEIRA et al., 1995).

Algumas características de virulência que contribuem para a persistência do *S. aureus* no tecido mamário (SANTOS et al., 2003) e o uso inadequado de antibióticos que propicia o aparecimento de cepas multi-resistentes são fatores que comprometem a eficiência do tratamento da mastite bovina causada por estes microrganismos. Com isso, os testes de sensibilidade aos antimicrobianos são instrumentos muito úteis para avaliar o desenvolvimento de resistência em patógenos. (BARBERIO et al., 2002).

Resultados obtidos por meio do teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* oferecem valiosas informações sobre a sensibilidade dos *S. aureus* isolados nos casos

de mastite bovina frente aos princípios ativos testados. Todavia, a escolha aleatória de medicamentos não implica necessariamente no sucesso do tratamento. Com isso, a escolha do medicamento a ser utilizado no tratamento da mastite bovina causada por *S. aureus*, torna-se imperiosa a necessidade do conhecimento do perfil de sensibilidade frente aos antibióticos e quimioterápicos das estirpes de *S. aureus* isoladas (NADER FILHO et al., 2007).

A análise da sensibilidade antimicrobiana *in vitro* oferece subsídios aos criadores quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, contribuindo, dessa forma, para o tratamento e o controle das mastites causadas por estafilococos coagulase positivos nos rebanhos estudados. Deve ser também considerada pelos proprietários antes da tomada de decisões para a escolha do tratamento adequado para reduzir perdas na produção de leite e em programas de controle da mastite. Por fim, a presença de estirpes de estafilococos multirresistentes é preocupante para a clínica veterinária e para a Saúde Pública, pois o leite é fonte de renda para criadores de bovinos e, também, um alimento indispensável na dieta de pessoas de várias faixas etárias (FREITAS et al., 2005).

Ao se fazer uso da antibioticoterapia contra a mastite por *S. aureus,* DINIZ et al. (1998) citam que vários fatores podem interferir na taxa de cura bacteriológica do microrganismo. Neste sentido, os referidos autores afirmam que o estágio da infecção, a presença de bactérias em abcessos ou mesmo a incapacidade das células fagocíticas em destruir estes patógenos podem influenciar no sucesso da terapia.

Em estudo realizado por SILVA et al. (2006), em dois rebanhos estudados na região do Vale do Paraíba, 1,4% das estirpes de *S. aureus* isoladas foi resistente à penicilina e nenhuma apresentou resistência ao cefepime, à oxacilina e à clindamicina. Observou-se, também, que além do tratamento dos tetos de todas as vacas no período seco com o antibiótico específico, para a prevenção de mastite é necessário o descarte de animais cronicamente infectados, submersão dos tetos antes e após a ordenha em solução desinfetante, funcionamento correto do equipamento de ordenha e manutenção do ambiente dos animais limpo e seco.

S. aureus resistentes à meticilina (MRSA, do inglês “methicillin resistant *Staphylococcus aureus”*) foram identificados, pela primeira vez, em 1961, e atualmente é uma freqüente causa de infecções nosocomiais que tem apresentado crescente problemática em unidades de saúde e em comunidades do mundo inteiro (BARBER,

1961; AKPAKA et al., 2007). Estirpes de MRSA podem apresentar resistência à penicilina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, cefalotina, cloranfenicol, sulfametoxasol-trimetoprim, ciprofloxacina e clindamicina (TEIXEIRA et al., 1995).

O crescente isolamento de estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina levou ao uso cada vez maior dos glicopeptídeos, como, por exemplo, a vancomicina. Com isso, igualmente como o acontecido com o uso indiscriminado da penicilina, a forte pressão seletiva de estirpes de *Enterococcus* e *Staphylococcus* vancomicina-resistentes têm ocorrido (LOWY, 2003). Este fato, mais o risco de transferência de genes de resistência via plasmídios, tem apontado para a necessidade de uma redução drástica no uso de vancomicina (VANNUFFEL et al., 1995). Além do risco de seleção, os custos do tratamento aumentam significativamente com o uso da vancomicina (NICOLA et al., 2000).

As cefalosporinas são, atualmente, importante classe de agentes antibacterianos utilizada no tratamento de infecções humanas e animais. Em geral, estabiliza a enzima beta-lactamase e apresenta boa habilidade em penetrar na célula bacteriana. São usualmente utilizadas contra estreptococos beta-hemolíticos e estafilococos produtores de beta-lactamase, mas não contra estafilococos resistentes à meticilina (oxacilina). As cefalosporinas de primeira geração foram, originalmente, introduzidas no tratamento de infecções estafilocócicas resistentes à penicilina. Atualmente encontra-se até a quarta geração, da qual faz parte o cefepime que, assim como as outras, também são utilizadas contra microrganismos Gram positivos. No entanto, tem-se observado que o cefepime apresenta moderada ação sobre *Staphylococcus aureus,* ao contrário das cefalosporinas de primeira geração, como, por exemplo, a cefalotina e a cefalexina (PRESCOTT, 2006).

A CA-MRSA (Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) relacionou, em estudo realizado de 1993 a 2004 na Europa, como principal causa de infecções por *S. aureus* resistentes à meticilina, o clone “European CA-MRSA” Este tipo de resistência é preocupante nos casos de resistência múltipla de drogas (MDR - *Multiple Drug Resistence*), pois além da resistência à meticilina, pode apresentar resistência à oxacilina e oferecer grande problema em Saúde Pública (LARSEN, et al. 2008).

A identificação de estirpes de *S. aureus* cada vez mais resistentes tem estimulado a comunidade científica a buscar novas terapias que possam combater este

patógeno. Segundo OLDHAM & DALEY (1991), a lisostafina é uma enzima secretada pelo *Staphylococcus simulans* que apresenta potente atividade bactericida contra os *S. aureus* a concentrações de <1 µg/mL em leite. Com isso, KEER et al. (2001) demonstraram que, em estudo realizado com camundongos geneticamente modificados, a secreção de lisostafina no leite protege significativamente o sistema mamário destes animais contra infecções de *S. aureus.* No entanto, esta terapia apresenta resultados positivos somente contra infecções causadas por microrganismos do gênero *Staphylococcus.*

Segundo WALL et al. (2005), foi possível verificar, após inoculação de estirpes de *S. aureus* na glândula mamária, que as três vacas geneticamente modificadas mantiveram a concentração de 0,9 a 14 µg/mL de lisostafina no leite, o que foi suficiente para não se instalar o processo de infecção, sem apresentar nenhum sinal de inflamação. No entanto, das dez vacas sem modificação genética, nove apresentaram modificações na contagem de células somáticas e na elevação da temperatura corporal. Com isso, admitem que a introdução de genes no rebanho leiteiro que estimulem a produção de lisostafina seria benéfica no combate à mastite, ressaltam que os riscos à Saúde Pública, devido ao consumo do leite contendo esta enzima, devem ser pesquisados em futuros estudos.

A pesquisa do gene *mec*A e o estudo do perfil de resistência aos antimicrobianos em estirpes de *S. aureus* vêm sendo amplamente utilizados como ferramenta em estudos epidemiológicos de casos de infecção hospitalar em humanos (ICHIYAMA et al., 1991; CARLES-NURIT et al., 1992; UDO et al., 1996; BELKUM et al., 1997; MORVAN et al., 1997). A aplicação da epidemiologia molecular, relacionada ao perfil de resistência aos antimicrobianos, ainda é pouco estudada em Medicina Veterinária.

A habilidade de os *S. aureus* aderirem ao epitélio da glândula mamária é considerada como o primeiro ponto crítico na patogenia da mastite (CIFRIAN et al., 1994) e tem sido associada à produção de biofilme, que é um composto de multicamadas de células embebidas em uma matriz de exopolissacarídeos (CUCARELLA et al., 2001). A maioria das estirpes dos *S. aureus* que causam mastite são circundadas por uma camada espessa, também conhecida como *slime,* que ajuda na aderência e na colonização dos microrganismos no epitélio da glândula mamária (BASELGA et al., 1993; AGUILAR et al., 2001). A água é o principal componente do biofilme, tornando-o hidrofílico (HOIBY et al., 2001), e os canais abertos de água

circulam entre as estruturas do biofilme permitindo a aquisição e troca de genes por transferência horizontal (WUERTZ et al., 2004).

Segundo ZADOKS et al. (2002), existem evidências que sugerem diferenças entre estirpes de *S. aureus* que colonizam a glândula mamária, causando a mastite, com estirpes de regiões extramamárias. FOX et al. (2005) acreditam que os *S. aureus* que causam infecções mamárias têm maior capacidade de produzir biofilmes que aqueles isolados de fontes extramamárias, devido ao grande potencial de produção de exopolissacarídeos como fator de virulência para infecção intramamária.

Sabe-se que a diferenciação de estirpes é a base do estudo epidemiológico de doenças infecciosas. Um marcador epidemiológico, por este motivo, deve ser capaz de discriminar isolados não relacionados, bem como classificar isolados epidemiologicamente relacionados em um mesmo grupo (FRENAY et al., 1996).

Do ponto de vista epidemiológico, é de grande importância a determinação da origem dos organismos envolvidos na etiologia da mastite bovina. Nesse contexto, a caracterização exata dos patógenos se faz imprescindível para a detecção das vias de transmissão e fontes de infecção, além de permitir o monitoramento da disseminação de estirpes bacterianas entre populações animais (LANGE et al., 1999).

Métodos clássicos, baseados em características instáveis, resultam em variações na expressão fenotípica (DOLZANI et al., 1994). Na tentativa de se contornar as limitações de outras técnicas, métodos baseados nas características genotípicas têm sido desenvolvidos. Segmentos de genes que, embora polimórficos, apresentam estabilidade suficiente para permitir discriminação de isolados não relacionados epidemiologicamente, são amplificados e o padrão de seus produtos é analisado.

Uma técnica que vem sendo amplamente utilizada em estudos epidemiológicos é a PCR-ribotipagem. Esse método foi desenvolvido para permitir a amplificação de regiões polimórficas do espaçador intergênico da região 16S-23S do RNA ribossomal, o que permite a tipificação de isolados de *S. aureus* de importância epidemiológica de forma simples e rápida (KOSTMAN et al., 1995; FORSMAN et al., 1997). Segundo AARESTRUP et al. (1995), é um dos métodos mais rápidos e simples de tipagem e que apresenta boa capacidade discriminatória, mas a fago e a biotipagem também oferecem boa discriminação entre as estirpes de *S. aureus*. Associações entre dois ou três métodos em combinação são consideradas como uma eficiente combinação de tipagem para investigação de *S. aureus* isolados de mastite.

A produção de coagulase constitui importante determinante fenotípico, uma vez que é associada à virulência em estirpes de *S. aureus*. Segundo KLOSS & JORGENSEN (1985), a capacidade de coagular o plasma é um dos critérios mais amplamente utilizado e aceito para a identificação de estafilococos patogênicos. Desta forma, a amplificação do gene da coagulase, seguida da digestão restritiva pela enzima *Alu*I, permite a análise do polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP, "Restriction Fragment Lenght Polymorphism") e, em conseqüência, o estabelecimento de relação epidemiológica entre os isolados (GOH et al., 1992; HOOKEY et al., 1998).

De acordo com JARRAUD et al. (1999) e AKINEDEN et al. (2001), as estirpes de *S. aureus* patogênicos podem produzir enterotoxinas (SEs) dos tipos A a E e G a J (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ), toxinas esfoliativas dos tipos A e B (ETA, ETB) e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), que são responsáveis por causar, em humanos, intoxicações alimentares, alergias e até mesmo desordens multi-sistêmicas que podem levar à morte. Nos animais, de acordo com FERENS et al. (1998), a patogênese no úbere permanece obscura. No entanto, as toxinas superantigênicas parecem induzir imunossupressão em bovinos leiteiros.

As enterotoxinas produzidas e liberadas pelos estafilococos durante sua multiplicação nos alimentos são termoestáveis (SILVA JÚNIOR, 1997), o que indica que a temperatura de cozimento dos alimentos não interfere na atividade biológica das SEs, possibilitando a instalação de quadros de intoxicação alimentar em humanos. GILETTO & FYFFE (1998) assinalaram que as intoxicações estafilocócicas afetam 1,2 milhões de pessoas anualmente, resultando numa perda econômica de 1,5 bilhões de dólares.

Tendo em vista que as toxinas podem ser excretadas no leite e permanecer estáveis nos produtos oferecidos ao consumo humano, as infecções intramamárias causadas por *S. aureus* apresentam implicações importantes em Saúde Pública. O risco é aumentado principalmente ao se considerar que esse patógeno é o que apresenta maior prevalência nos casos de mastite de rebanhos leiteiros e que apresenta estirpes com elevado potencial toxigênico (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

A intoxicação alimentar estafilocócica é caracterizada clinicamente por náuseas, vômito, mal-estar, debilidade geral, diarréia aquosa não sanguinolenta e dor abdominal. Pode resultar, também, em desidratação decorrente da perda significativa de líquido, sudorese e cefaléia, geralmente não acompanhada de estado febril. Os sintomas

começam a manifestar-se aproximadamente quatro horas após o consumo do alimento contaminado (MURRAY et al., 1992). A pele e a mucosa do homem atuam como reservatórios de estafilococos, resultando em importante fonte de veiculação destes microrganismos para os alimentos (RAPINI et al., 2004). Nos animais domésticos, *S. aureus* é considerado o principal agente das infecções em glândula mamária (LIM et al., 2004).

A quantidade de enterotoxina estafilocócica necessária para causar intoxicação alimentar ainda não foi exatamente estabelecida. No entanto, considera-se que o consumo de um alimento contaminado em concentrações da ordem de 1 ng/g desta toxina seja capaz de desencadear alguns sintomas. Este valor foi estimado a partir de um surto ocorrido nos Estados Unidos atribuído a leite achocolatado ingerido por crianças, no qual foi encontrado nível médio de 144 ng/embalagem (EVENSON et al., 1988).

OMOE et al. (2002) pesquisaram a presença de genes das enterotoxinas estafilocócicas (*sea* a *sei*) em 146 estirpes de S. aureus, 71 destas provenientes de humanos envolvidos em 25 surtos de intoxicações alimentares, 18 de humanos sadios, 21 de vacas com mastite e 36 de leite de vaca. Verificaram, ainda, que 77,4% dos isolados de *S. aureus* foram positivos para um ou mais genes de SEs. Para EVENSON et al. (1988), a detecção do gene *sea* em linhagens de *S. aureus* é importante visto que a SEA é tóxica em baixas concentrações.

O primeiro relato de detecção de TSST-1 produzida por *staphylococci* de origem animal foi feito por JONES & WIENEKE (1986). Estudos realizados com *S. aureus* isolados de casos clínicos e subclínicos de mastite bovina demonstraram que entre 20% e 77% dos isolados produziram TSST-1 e enterotoxinas estafilocócicas (KENNY et al., 1993; MATSUNAGA et al., 1993; ICHIKAWA et al., 1996; TAKEUCHI et al., 1998). Em tanques de expansão, utilizados para resfriamento e armazenamento de leite, 75,4% das amostras de *S. aureus* isoladas demonstraram capacidade de produzir essas toxinas (TAKEUCHI et al., 1998).

KENNY et al. (1993) relataram a presença de uma ou mais toxinas em 28,6% das amostras de *S. aureus* isoladas em casos de mastite bovina. Neste estudo, as toxinas mais isoladas foram SEC, SED e TSST-1. A amplificação, pela técnica de PCR, das seqüências codificadoras das enterotoxinas (*sea, seb, sec, sed, see*), toxinas esfoliativas (*eta, etb*) e toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) constitui técnica

simples, rápida e sensível para detecção da presença dessas toxinas (JOHNSON et al., 1991). Essa técnica também é utilizada para a amplificação das seqüências codificadoras das enterotoxinas *seg, seh, sei* e *sej* (JARRAUD et al., 1999; AKINEDEN et al., 2001).

Em estudo realizado com 94 estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina, na Alemanha, 34 foram positivas para um (18) ou dois (16) genes enterotoxigênicos. Três estirpes de campo foram positivas para *sea,* duas para *seb,* 22 para *sec,* quatro para *sed* e 19 para *tst,* sendo que a combinação entre *sec* e *tst* mostrou-se com alta incidência. Neste estudo, observou-se, também, alta correlação entre os resultados obtidos pela PCR e ELISA (ZSCHÖCK et al., 2000).

O alto índice de amostras enterotoxigênicas, descritas por CARDOSO et al. (2000), deve ser considerado principalmente pela Saúde Pública, pois tratamentos térmicos do leite, como a pasteurização, não são capazes de inativar essas toxinas (BERGDOLL, 1989), sendo um risco em potencial para o consumidor. Vale ressaltar que não foram encontradas referências no que diz respeito à inativação de enterotoxinas pelo processo industrial de tratamento UAT (Ultra Alta Temperatura) do leite. A simples presença de amostras toxigênicas de *S. aureus* no leite não implica na ocorrência de intoxicações, porém o risco existe, principalmente se for considerado que esse microrganismo é o mais envolvido nas infecções intramamárias dos bovinos, que o leite é um excelente meio de crescimento para *S. aureus,* que a temperatura da glândula mamária é a ideal para a produção de TSST-1 e de enterotoxinas, e que apenas pequenas concentrações de toxinas são suficientes para causar doença em seres humanos, principalmente em crianças (CARDOSO et al, 2000).

A presença de *S. aureus* e suas toxinas no leite usado pelas indústrias e pelos laticínios representa sério problema de Saúde Pública (BERGDOLL, 1989; ICHIKAWA et al., 1996). Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 1998), foram registrados 593.212 casos de intoxicação alimentar entre 1984 e 1997, porém sem especificar as toxinas, os microrganismos ou as fontes envolvidas. Dessa maneira, pouco se conhece sobre relatos de isolamentos de amostras de *staphylococci* de origem animal produtoras de TSST-1 no país.

Diante do exposto, idealizou-se o presente trabalho com a finalidade de atingir os objetivos que serão apresentados a seguir.

3. OBJETIVOS

3.1. Investigar, por meio da persistência dos padrões fenotípicos e genotípicos, a dinâmica das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite, dos óstios papilares, das lesões de pele do teto, dos insufladores da ordenhadeira e do leite do tanque de expansão de uma propriedade rural produtora de leite tipo B.

3.2. Verificar a relação epidemiológica existente entre as estirpes de *S. aureus* isoladas dos casos de mastite com vistas aos sítios de localização e vias de transmissão*;*

3.3. Conhecer a sensibilidade *in vitro* das estirpes de *S. aureus* isoladas frente aos antimicrobianos testados;

3.4. Investigar a presença dos genes das enterotoxinas estafilocócicas dos tipos A a D e da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) *com* a amplificação de suas seqüências codificadoras pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);

3.5. Divulgar os resultados para implementar medidas mais eficazes na prevenção e no controle da mastite bovina, de modo a reduzir o risco potencial que estas toxinas podem representar para a Saúde Pública.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Características da propriedade rural e do rebanho: estudou-se estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite de vacas lactantes, assim como outros sítios de isolamento, em uma propriedade rural produtora de leite tipo B pertencente ao Centro de Bovinos de Leite do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, Estado de São Paulo. Na referida propriedade, a ordenha dos animais era efetuada em ordenhadeira mecânica do tipo Tanden de circuito fechado, sem presença de bezerros, duas vezes ao dia, e utilizava-se a imersão dos insufladores da ordenhadeira em baldes com água e solução desinfetante entre a ordenha de um animal e outro. A população bovina era constituída por cerca de 80 vacas P.O., holandesas e pardo-suíças, cuja alimentação baseava-se em uma dieta composta por caroço de algodão, milho moído, calcário, fosfato bicálcico, uréia e farelo de soja e pastagens de *Panicum maximum* cultivar Tanzânia, além de silagem de milho. Os animais recebiam suplementação mineral "à vontade" (fórmula comercial).

4.2. Seleção dos animais: Durante o período de agosto de 2005 a dezembro de 2006 todas as vacas lactantes aparentemente sadias foram mensalmente submetidas à prova do *California Mastitis Test* (CMT). Esse teste foi usado como triagem dos casos de mastite subclínica no rebanho, sendo consideradas positivas as amostras de leite dos quartos mamários que apresentaram escore ≥ 1 ao CMT. Assim, foram colhidas amostras de leite dos animais reagentes ao CMT, exceto daqueles que estivessem nos primeiros dez dias de lactação ou nos 30 dias anteriores a secagem, bem como das fêmeas que apresentavam mastite clínica.

4.3. Colheita das amostras: foram colhidas, em tubos de ensaio esterilizados, amostras de leite dos quartos reagentes ao CMT e, também, daqueles que apresentaram mastite clínica. Paralelamente, foram colhidas amostras dos óstios papilares, das lesões de pele do teto, dos insufladores e do leite do tanque de expansão.

4.3.1. Amostras do óstio papilar: foram colhidas, imediatamente após a anti-sepsia efetuada pelo ordenhador, amostras dos óstios papilares de animais positivos ao

CMT, independentemente do número de quartos reagentes, utilizando-se, para tanto, suabe estéril. Foram friccionados sobre o óstio papilar, em movimentos circulares, e acondicionados em tubos de ensaio previamente esterilizados (INGAWA et al., 1992). Em seguida, estas amostras foram acondicionadas em caixa de material isotérmico contendo cubos de gelo e levadas, para isolamento e identificação bacterianos, ao laboratório do Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica de Bovinos de Leite, setor Palmeiras, IZ de Nova Odessa – SP.

4.3.2. Amostras de leite dos quartos mamários para isolamento bacteriológico: as amostras foram colhidas de acordo com os procedimentos recomendados pelo *National Mastitis Council* (HARMON et al., 1990). Após a limpeza do óstio papilar com álcool etílico 70% (v/v) utilizou-se tubos de ensaio esterilizados para amostras individuais de 2 a 5 mL de leite, em duplicatas, de cada quarto mamário, antes do início da ordenha. Estas amostras foram acondicionadas em caixa de material isotérmico contendo cubos de gelo e levadas ao laboratório para isolamento e identificação bacterianos.

4.3.3. Amostras dos insufladores da ordenhadeira mecânica: imediatamente após as ordenhas, os suabes estéreis foram friccionados em movimentos circulares na porção final de cada um dos insufladores (quatro por cada conjunto de ordenha), em todos os conjuntos de ordenhadeiras conforme recomendação de McDONALD et al. (1993). Os suabes foram acondicionados em tubos de ensaio individuais contendo água peptonada estéril e transportados em caixa de material isotérmico contendo cubos de gelo.

4.3.4. Amostras das lesões: suabes estéreis foram friccionados sobre as lesões de tetos, tendo-se o cuidado de não atingir regiões adjacentes da pele. Assim como descrito anteriormente, foram acondicionados em tubos de ensaio individuais contendo água peptonada estéril e transportados em caixa de material isotérmico contendo cubos de gelo (INGAWA et al., 1992).

4.3.5. Amostras de leite do tanque de expansão: as amostras de leite oriundas do tanque de expansão foram colhidas de acordo com o preconizado por BRITO et al.

(1998). Procedeu-se a colheita de três amostras mensais em três dias consecutivos, retirando-se 20 mL de leite com pipeta esterilizada, da parte superior e central do tanque. Imediatamente após a ordenha, foram acondicionados em frasco de vidro esterilizado, disposto imediatamente em caixa de material isotérmico contendo cubos de gelo e levado ao laboratório.

4.4. Exames laboratoriais

4.4.1. Isolamento e identificação das estirpes de *Staphylococcus aureus:* as amostras de leite provenientes dos quartos mamários foram semeadas diretamente em placas de Petri contendo ágar sangue de ovino a 5% com auxílio de alça de semeadura e incubadas por 24 a 48 horas a 37 ºC. As amostras oriundas do óstio papilar, das lesões dos tetos e dos insufladores dos conjuntos de ordenha foram semeadas em ágar Baird-Parker com os suabes utilizados nas colheitas e incubadas a 37 ºC por 24 a 48 horas. ºC

As colônias que revelassem a presença de cocos G+ em esfregaços corados pelo método de Gram foram submetidas às provas de catalase e coagulase lenta com plasma de coelho (HOLMBERG, 1973). As leituras para a verificação da produção de coagulase foram realizadas uma, duas, três, quatro e 24 h após a incubação das amostras a 37 ^{o}C (GARCIA et al.,1980).

Em seguida, as estirpes catalase e coagulase positivas foram submetidas à prova para verificação da acetoína (caldo MRVP)[1] para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus intermedius*.

As estirpes produtoras de acetoína foram testadas quanto à utilização ou não da maltose e trealose (Mac FADDIN, 1976; MURRAY et al., 1999; APHA, 2001), para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus schleiferi* subespécie coagulans. As estirpes que se mostraram positivas a essas provas foram classificadas como *Staphylococcus aureus* (Mac FADDIN, 1976; APHA, 2001).

---

1. Oxoid, Hampshire, Inglaterra.

4.4.1.1. Teste da coagulase livre em tubo: em tubos de vidro estéreis (13x100), foram adicionados 0,5 mL de plasma de coelho. Adicionou-se, também, 0,5 mL de cultura pura do microrganismo isolado crescido após 24 h de cultivo em caldo BHI. Os tubos foram inclinados suavemente sem agitar e incubados a 37 °C em banho-maria.

As leituras para a verificação da produção de coagulase foram realizadas uma, duas, três, quatro e 24 h após a incubação das amostras a 37 °C e os resultados classificados como: Grau "1+", coágulos pequenos e desorganizados; Grau "2+", coágulos pequenos organizados; Grau "3+", coágulos grandes organizados; Grau "4+", coagulação completa. A ausência de formação de coágulos foi considerada como resultado negativo (GARCIA et al., 1980).

4.4.1.2. Teste da catalase: após 24 h de cultivo, com uma alça bacteriológica flambada, retirou-se uma colônia pura de *S. aureus*. Logo após foi feito um esfregaço em uma lâmina de vidro limpa, adicionando-se uma gota de água oxigenada (H_2O_2) a 3% sobre o microrganismo na lâmina. As estirpes que apresentaram imediato borbulhamento (liberação de gás) foram consideradas positivas e, após a leitura dos resultados, as lâminas foram colocadas numa solução contendo detergente e cloro (Mac FADDIN, 1976).

4.4.1.3. Teste de Voges-Proskauer: para verificar a produção da acetoína a partir da glicose, as estirpes de estafilococos foram inoculadas em tubos contendo caldo de cultivo MRVP e incubadas à 28 °C por 48 h. Em seguida, foi adicionada uma solução de alfa-naftol a 5% e 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio a 40% (reativo de Barrit) em cada tubo. Após agitação foi feita a leitura, sendo considerados positivos os tubos que estiveram com a coloração vermelha após 15 min (Mac FADDIN, 1976).

4.4.1.4. Teste da Maltose e da Trealose: para verificar a utilização aeróbia dos carboidratos, as estirpes produtoras de acetoína foram testadas quanto à utilização ou não da maltose e da trealose[1], para a diferenciação entre *Staphylococcus aureus* e

1. Vetec, Rio de Janeiro, Brasil.

Staphylococcus schleiferi subespécie coagulans. Estes testes foram realizados em Ágar-Base Vermelho de Fenol e suplementados com 1% do respectivo carboidrato, que foi adicionado no meio após ter sido filtrado em membrana de diâmetro 0,45 mM de poro. Foi inoculado o microrganismo a ser testado no meio suplementado com o carboidrato específico e incubado em estufa bacteriológica a 35-37 ºC por até 24 h. A prova foi considerada positiva quando ocorreu multiplicação do microrganismo com viragem do pH do meio de cultura, de vermelho para amarelo, e negativa com multiplicação sem alteração de cor (Mac FADDIN, 1976; MURRAY et al., 1999; APHA, 2001).

Após a identificação bioquímica dessas estirpes como pertencentes à espécie *S. aureus,* realizada no Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica de Bovinos de Leite, setor Palmeiras, IZ de Nova Odessa – SP, foram semeadas diretamente em placas de Petri contendo ágar sangue de ovino a 5% com auxílio de alça de semeadura e incubadas por 24 a 48 horas a 37 ºC. Após o crescimento bacteriano, foram transportadas em caixa de material isotérmico contendo cubos de gelo e levadas ao laboratório ao Laboratório de Análises Microbiológicas de Alimentos de Origem Animal e Água, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, Unesp – Câmpus de Jaboticabal – SP, para a realização dos estudos moleculares.

4.4.2. Teste de sensibilidade a antimicrobianos: as estirpes isoladas foram submetidas aos testes de sensibilidade *in vitro* a partir da técnica de difusão em disco (BAUER et al., 1966) frente a 12 antimicrobianos representados pelo cefepime (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina (10 UI), rifampicina (5 µg), sulfazotrim (25 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg).

A partir de uma cultura pura de *S. aureus*, foi semeada uma única colônia em caldo BHI e incubada a 37 ºC por, aproximadamente, 18 h. Em seguida, após a turvação do meio, com suabe estéril previamente mergulhado na suspensão bacteriana, foi tido o cuidado de apertar e rolar contra as paredes do tubo para expelir o líquido em excesso. Com isso, semeou-se por estrias apertadas as placas de ágar Müeller-Hinton em duas direções ou mais, por toda a superfície do meio e passando no final o suabe em toda a volta da placa, deixando-se secar o inóculo durante 5 a 10 minutos.

Os discos foram conservados a 4 °C em embalagens fechadas até o momento do uso, sendo colocados a temperatura ambiente 1 a 2 h antes da aplicação sobre a superfície do meio inoculado. Utilizou-se pinça estéril para colocar, cuidadosamente, cada um dos discos de antimicrobianos testados, exercendo ligeira pressão para assegurar um perfeito contato com o ágar. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por, no mínimo, 24 h. Com isso, foi possível a aferição dos halos de inibição formados em torno dos respectivos princípios ativos realizada segundo o preconizado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2005).

4.4.3. Extração de DNA: a extração do DNA bacteriano foi realizada no Laboratório de Análises Microbiológicas de Alimentos de Origem Animal e Água, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, Unesp – Câmpus de Jaboticabal – SP. Foi utilizado o Kit GFX Genomic Blood®, que contém o protocolo de extração de DNA para bactérias Gram positivas, as soluções de lise, de extração e de lavagem e colunas GFX de purificação. Foi realizado, também, um pré-tratamento com lisozima para auxiliar na lise bacteriana.

Foi centrifugado 1,5 mL de cultura em caldo BHI (35 °C/18h) por 30 s a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante e adicionados 40 µL de tampão lisozima (0,1 M NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 5% Triton X-100) sob imediata agitação em agitador tipo vortex até total desprendimento do precipitado. Em seguida, foram adicionados 10 µL de Lisozima[2] (10 mg/mL em 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0) e novamente agitados em vortex.

Os tubos foram deixados em temperatura ambiente por 15 min e agitados ocasionalmente e, posteriormente, adicionados 10 µL de Proteinase K[3] (20 mg/mL em 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0), agitados e incubados a 55 °C por 15 min. Em seguida, cinco microlitros de RNAse A[4] (20 mg/mL) foram adicionados, agitados e deixados, por 15 min, em temperatura ambiente.

---

1. GE Healthcare, Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil.
2. Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha.
3. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.
4. Qiagen, Uniscience do Brasil, São Paulo, Brasil.

Foram adicionados, no próximo passo, 500 uL da solução de extração, agitados e deixados por 10 min, com agitação ocasional, em temperatura ambiente. Transferiu-se toda a mistura para a coluna GFX encaixada em um novo microtubo e centrifugada a 8.000 rpm por 1 min. Em seguida, foi descartado o líquido do tubo e adicionados 500 µL da solução de extração na coluna, com posterior centrifugação a 8.000 rpm por 1 min.

O líquido do tubo foi novamente descartado e 500 µL da solução de lavagem adicionados na coluna GFX. Desta vez, foi centrifugado a velocidade máxima da centrífuga (12 a 16000 rpm), por 3 min, com posterior descarte do líquido do tubo e transferência da coluna GFX para o tubo coletor que acompanha o kit. Foram adicionados, na coluna encaixada neste novo tubo, 200 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e deixados por 1 min em temperatura ambiente.

Após serem centrifugados a 8.000 rpm por 1 min, os tubos coletores com os DNAs extraídos foram estocados a -20 ºC até o momento da utilização nas reações de PCR.

4.4.4. Amplificação de fragmentos de DNA cromossômico: a confirmação molecular dos isolados de *S. aureus,* para a identificação da espécie, foi feita a partir da amplificação de fragmentos de DNA cromossômico específico do *S. aureus* de acordo com o protocolo descrito por MARTINEAU et al. (1998). A partir deste momento, apenas as estirpes identificadas genotipicamente por esta técnica foram submetidas aos testes seguintes.

As reações compreenderam volume final de 20 µL contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada *dNTP*, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador Sa442-1 (5'- AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG- 3') e Sa442-2 (5'- CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA- 3'), e 0,5 U de *Taq* polimerase em amplificação do tipo *host-start*.

As misturas de PCR foram submetidas à desnaturação, por 3 min, a 94 °C e, posteriormente, a 30 ciclos de 1 s, a 95 °C, para desnaturação e 30 s, a 55 °C, para pareamento e extensão dos oligonucleotídeos iniciadores. Dez microlitros do produto amplificado foram visualizados após eletroforese em gel de agarose em concentração de 2% corado com brometo de etídio. Marcador de tamanho molecular 100 pb foi utilizado como padrão de peso molecular.

4.4.5. Amplificação dos genes das enterotoxinas dos tipos A a D e da toxina TSST-1: foram utilizados os DNAs extraídos e armazenados a – 20 ºC das estirpes de *S. aureus* e pesquisados os genes de enterotoxinas dos tipos A a D (*sea, seb, sec e sed*) e da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) por meio da amplificação de suas seqüências codificadoras.

Segundo protocolo estabelecido por CUNHA et al. (2007), as reações compreenderam volume final de 50 µL, contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada *dNTP,* 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (JOHNSON et al., 1991) Sea1 (5´- TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA) e Sea2 (5´- GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA); Seb1 (5´- TCG CAT CAA ACT GAC AAA C) e Seb2 (5´- GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC); Sec1 (5´- GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT) e Sec2 (5´- AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC); Sed1 (5´- CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT) e Sed2 (5´- TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG); Tst1 (5´- ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA) e Tst2 (5´- TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT), 0,5 U de *Taq* polimerase em amplificação do tipo *host-start* e utilizados 5 µL de DNA de cada estirpe identificada genotipicamente como pertencente à espécie *S. aureus* .

As misturas de PCR foram submetidas a um primeiro ciclo de 94 ºC por 4 min, à desnaturação a 94ºC por 2 min, pareamento a 55 ºC por 1 min e 30 s e extensão dos oligonucleotídeos iniciadores a 72ºC por 1 min e 30 s, seguido por um segundo ciclo de desnaturação a 94 ºC por 2 min, pareamento a 53 ºC por 1 min e 30 s e extensão a 72 ºC a 1 min e 30 s. No terceiro ciclo, a temperatura de pareamento foi reduzida a 51 ºC, seguido por mais 37 ciclos a 94 ºC por 2 min, 51 ºC por 1 min e 30 s e 72 ºC por 1 min e 30 s. No final dos 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72 ºC por 7 min e a 4 ºC até o momento de retirada do termociclador.

Dez microlitros do produto amplificado foram visualizados após eletroforese (150 V por 1 h e 30 min) em gel de agarose, em concentração de 2%, corado com brometo de etídio. Após leitura em fotodocumentador, os produtos amplificados foram comparados com marcador de tamanho molecular 100 pb.

4.4.6. Eletroforese de Campo Pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE): de acordo com o protocolo estabelecido por McDOUGAL et al. (2003), foi utilizada uma única colônia de *S. aureus* e semeada em 5 mL de caldo infusão cérebro-coração incubados em agitação vigorosa a 35-37 ºC por 24 h. O ajuste da concentração

bacteriana foi feito em espectrofotômetro com a adição de salina e absorbância de 0,9 a 1,1 com comprimento de onda de 610 nm.

Duzentos microlitros da suspensão bacteriana foram centrifugados a 12.000 rpm por 2 a 4 min, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspendido em 300 µL de tampão TE (10mM Tris HCl, 1 mM EDTA [pH 8,0]) e equilibrado em banho-maria a 37 ºC por 10 min. Foram utilizados, para a lise celular, 40 µL de solução de lisostafina (1 mg/mL em 20 mM de acetato de sódio) e, acrescidos à suspensão bacteriana, 300 µL de solução 20% de agarose low-melting (em tampão TE), gentilmente homogeneizados e dispostos nos moldes para a confecção dos blocos.

A solidificação da mistura foi realizada em temperatura ambiente por 10 min ou em refrigerador a 4 ºC por 5 min. Em seguida, os blocos foram removidos dos moldes e adicionados em tubos contendo 3 mL de tampão de lise EC (6 mM Tris HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% Brij-58, 0,2% de deoxicolato de sódio, 0,5% de lauroylsarcosine, pH 8,0) e incubados a 37 ºC por, no mínimo, 4 h.

Posteriormente, o tampão de lise EC foi descartado e adicionados 4 mL de tampão TE, incubando a 37 ºC por 30 min, e esta troca repetida, no mínimo, mais três vezes. Até posterior utilização para a digestão restritiva com enzima *Sma*I, que cliva o DNA cromossômico no sítio de restrição CCC?GGG, o*s* blocos foram armazenados a 4 ºC.

Para a digestão restritiva com *Sma*I, foi transferido um bloco para novo tubo de ensaio com 200 µL de tampão de restrição 1x, para equilíbrio do bloco, e incubados a 30 ºC por, pelo menos, 30 min. Após a remoção deste tampão, foram acrescidos 200 µL de reação, desta vez com 5 µL da enzima *Sma*I, em cada tubo, com incubação a 30 ºC por 4 h.

Após a solidificação do gel de agarose de grau cromossomal (*cromosomal grade agarose,* BioRad) a 1% preparado em tampão 0,5x TBE, os blocos foram introduzidos diretamente nos poços formados com a retirada do pente que acompanha o aparelho. Para a vedagem, foi utilizada a mesma agarose equilibrada a, aproximadamente, 56 ºC, com a finalidade de impedir que os blocos saiam dos poços.

A eletroforese foi executada com célula de eletroforese CHEF-DR III (BioRad, Melville, N. Y.) e, como padrão, foi utilizado DNA do bacteriófago λ, que serviu como controle dos parâmetros de corrida das unidades CHEF-DR. Os padrões de corrida

foram os seguintes: pulso inicial, 5 s; pulso final, 40 s; voltagem, 200 V ou 6 V/cm; tempo, 21 h; e temperatura, 14 °C.

Para que os fragmentos de DNA fossem corados, os géis foram colocados, sob imersão, em 100 µL de tampão TE com 1,5 µL de brometo de etídio por 45 min. Em seguida foram descorados em água destilada, por 25 min, e fotografados posteriormente para a visualização dos diferentes pulsotipos no sistema de fotodocumentação GelDoc® (BioRad).

4.5. Avaliação da capacidade discriminatória: a capacidade discriminatória, que envolve a habilidade de o teste diferenciar estirpes sem relação epidemiológica, foi determinada de acordo com o índice numérico descrito por HUNTER & GASTON (1988). O valor (*D*) indica a probabilidade de duas estirpes isoladas, de forma aleatória em uma população-teste, serem relacionadas em grupos distintos no método de tipagem avaliado. A fórmula

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

foi utilizada para o cálculo dos valores *D*, sendo (s) número total de tipos (padrões) diferentes, (n_j) número de isolados representativos de cada padrão e (*N*) número de isolados na população-teste.

5. RESULTADOS

Foram caracterizadas bioquímica e genotipicamente, no presente estudo, 245 estirpes de *S. aureus* isoladas do leite de casos de mastite, dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira mecânica. Na Tabela 1 observa-se que o leite foi o sítio de isolamento que apresentou o maior número de isolados, com 150 (61,2%) estirpes. Consecutivamente, 65 (26,4%) e 30 (12,2%) estirpes de *S. aureus* foram isoladas do óstio papilar e dos insufladores, respectivamente. Em contrapartida, nenhuma estirpe foi isolada de lesões de pele do teto e de leite do tanque de expansão.

Observa-se, ainda na Tabela 1, que no período de fevereiro (F) a setembro (M) de 2006, concentraram-se a maioria (158) dos isolamentos de *S. aureus*, os quais corresponderam a 64,5% das estirpes estudadas. Dentre estas, 103 (65,2%) tiveram o leite como sítio de isolamento. Em contrapartida, nos meses de agosto (A) e setembro (B) de 2005 ocorreram as menores freqüências de isolamento, quais sejam, 4 (1,6%) e 3 (1,2%) estirpes, respectivamente.

Tabela 1 – Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* com respectivos sítios de isolamento de acordo com as datas de obtenção, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

Datas de Obtenção*	Origem das estirpes isoladas						Total
	Leite		Óstio		Insufladores		
	n	%	n	%	n	%	n
A	2	0,8	1	0,4	1	0,4	4
B	1	0,4	2	0,8	-	-	3
C	5	2,0	-	-	4	1,6	9
D	4	1,6	1	0,4	1	0,4	6
E	7	2,8	2	0,8	2	0,8	11
F	18	7,3	3	1,4	-	-	21
G	18	7,3	-	-	-	-	18
H	22	9,0	6	2,4	9	3,8	37
I	6	2,4	8	3,3	4	1,6	18
J	1	0,4	6	2,4	2	0,8	9
K	12	4,9	5	2,0	-	-	17
L	13	5,7	5	2,0	-	-	18
M	13	5,7	6	2,4	1	0,4	20
N	11	4,5	-	-	-	-	11
O	9	3,8	2	0,8	-	-	11
P	8	3,3	18	7,3	6	2,4	32
Total	150	61,2	65	26,5	30	12,2	245

*A=15/08/05; B=12/09/05; C=05/10/05; D=07/11/05; E=12/12/05; F=13/02/06; G=13/03/06; H=10/04/06; I=08/05/06; J=05/06/06; K=03/07/06; L=07/08/06; M=19/09/06; N=09/10/06; O=06/11/06; P=04/12/06.

Na Figura 1 pode ser observada a ocorrência de maior concentração de *S. aureus* isolados do óstio papilar durante os meses de abril (H) a setembro (M) de 2006

com 36 estirpes, o que representa 14,7% e 55,4% das estirpes isoladas durante todo o período de obtenção e de acordo com seu sítio de isolamento, respectivamente. Evidencia, ainda, que o maior número de estirpes isoladas dos insufladores ocorreu nas colheitas realizadas nos meses de abril (H), maio (I) e junho (J) de 2006, ou seja, 15 (50%) estirpes identificadas.

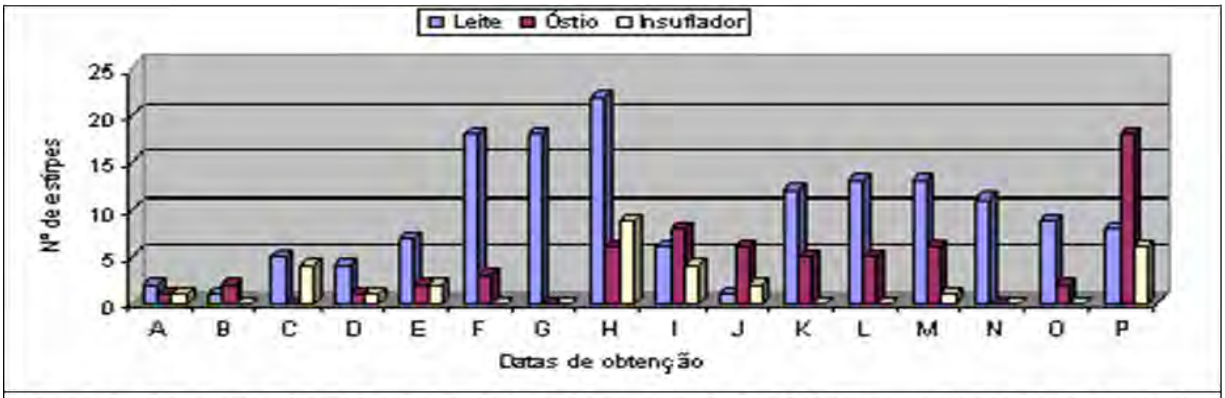

Figura 1 – Representação gráfica da distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de acordo com os sítios de isolamento.

*A=15/08/05; B=12/09/05; C=05/10/05; D=07/11/05; E=12/12/05; F=13/02/06; G=13/03/06; H=10/04/06; I=08/05/06; J=05/06/06; K=03/07/06; L=07/08/06; M=19/09/06; N=09/10/06; O=06/11/06; P=04/12/06.

Das 245 estirpes caracterizadas como pertencentes à espécie *S. aureus* assinaladas na Tabela 2, observa-se que 179 (73,1%) apresentaram resistência a um ou mais dos princípios ativos testados. Dentre estas, verifica-se que embora o leite tenha sido o sítio de isolamento que apresentou o maior número de estirpes resistentes com 100 (66,7%) *S. aureus*, proporcionalmente os isolados dos insufladores e óstios foram os que apresentaram maior resistência, com 25 (83,3%) e 54 (83,1%) estirpes.

Tabela 2 – Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* com respectivos sítios de isolamento de acordo com os resultados de teste de sensibilidade aos antimicrobianos, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

	Número de	Resistentes*		Sensíveis	
Origem	isolados	n	%	n	%
Leite	150	100	66,7	50	33,3
Óstio	65	54	83,1	11	16,9
Insufladores	30	25	83,3	5	16,7
Total	245	179	-	66	-

*Resistentes a pelo menos um princípio ativo testado.

O índice numérico de discriminação (*D*) do teste *in vitro* de sensibilidade aos antimicrobianos foi igual a 0,69. A Tabela 3 mostra que os testes de sensibilidade revelaram a presença de 179 (73,1%) estirpes de *S. aureus* agrupadas em 51 perfis de resistência distintos, sendo o perfil de resistência à penicilina predominante quando considerado de forma individual (54,8%) ou em associação (29,4%) a outros princípios

ativos. Dentre os 12 princípios ativos testados, 100% das estirpes de *S. aureus* estudadas apresentaram sensibilidade à vancomicina.

Tabela 3 – Perfis de resistência aos antimicrobianos apresentados pelas estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas nas amostras colhidas na propriedade rural produtora de leite tipo B do Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

		Estirpes resistentes	
Perfil	Fenótipo de resistência aos antimicrobianos*	n	%
1	Cpm	1	0,5
2	Cip	1	0,5
3	Cli	1	0,5
4	Gen	1	0,5
5	Oxa	1	0,5
6	Pen	98	54,8
7	Sut	1	0,5
8	Cpm/Cip	1	0,5
9	Cpm/Cli	1	0,5
10	Cpm/Oxa	2	1,2
11	Cpm/Pen	2	1,2
12	Cip/Pen	7	4,2
13	Cli/Pen	4	2,5
14	Clo/Pen	1	0,5
15	Eri/Pen	1	0,5
16	Gen/Pen	3	1,8
17	Pen/Rif	2	1,2
18	Pen/Sut	3	1,8
19	Pen/Tet	3	1,8
20	Cpm/Cip/Pen	1	0,5
21	Cpm/Clo/Pen	1	0,5
22	Cpm/Oxa/Pen	6	3,5
23	Cpm/Pen/Rif	1	0,5
24	Cip/Gen/Pen	1	0,5
25	Cli/Eri/Pen	1	0,5
26	Cpm/Cli/Oxa/Pen	1	0,5
27	Cpm/Oxa/Pen/Rif	1	0,5
28	Cpm/Oxa/Pen/Sut	2	1,2
29	Cpm/Oxa/Pen/Tet	1	0,5
30	Cpm/Cli/Gen/Pen/Tet	2	1,2
31	Cpm/Cli/Oxa/Pen/Rif	1	0,5
32	Cpm/Cli/Oxa/Pen/Sut	1	0,5
33	Cpm/Cli/Oxa/Pen/Tet	1	0,5
34	Cli/Gen/Pen/Rif/Tet	1	0,5
35	Cpm/Cip/Cli/Gen/Oxa/Pen	1	0,5
36	Cpm/Cli/Eri/Oxa/Pen/Rif	4	2,5
37	Cpm/Cli/Gen/Oxa/Pen/Rif	1	0,5
38	Cpm/Cli/Gen/Oxa/Pen/Sut	1	0,5
39	Cpm/Cli/Oxa/Pen/Rif/Sut	2	1,2
40	Cpm/Cli/Oxa/Pen/Rif/Tet	2	1,2
41	Cpm/Cli/Clo/Eri/Gen/Oxa/Pen	1	0,5
42	Cpm/Cli/Gen/Oxa/Pen/Rif/Sut	1	0,5
43	Cpm/Cli/Gen/Oxa/Pen/Rif/Tet	2	1,2
44	Cpm/Cli/Gen/Oxa/Pen/Sut/Tet	1	0,5
45	Cpm/Cli/Oxa/Pen/Rif/Sut/Tet	1	0,5
46	Cpm/Clo/Gen/Oxa/Pen/Sut/Tet	1	0,5
47	Cpm/Cli/Clo/Eri/Oxa/Pen/Rif/Tet	1	0,5
48	Cpm/Cli/Clo/Oxa/Pen/Rif/Sut/Tet	1	0,5
49	Cpm/Cli/Eri/Gen/Oxa/Pen/Rif/Tet	1	0,5
50	Cpm/Cli/Gen/Oxa/Pen/Rif/Sut/Tet	1	0,5
51	Cpm/Cli/Eri/Gen/Oxa/Pen/Rif/Sut/Tet	1	0,5
Total	-	179	100,0

* Cefepime (Cpm), Ciprofloxacina (Cip), Clindamicina (Cli), Cloranfenicol (Clo), Eritromicina (Eri), Gentamicina (Gen), Oxacilina (Oxa), Penicilina (Pen), Rifampicina (Rif), Sulfazotrim (Sut), Tetraciclina (Tet).

Na Tabela 4 pode ser observada a distribuição das estirpes de *S. aureus* resistentes de acordo com os sítios de isolamento, na qual o perfil 6, que representa

resistência à penicilina, destacou-se com o maior número de estirpes isoladas. Dentre estas, 72 (73,5%) foram isoladas do leite, 20 (20,4%) dos óstios papilares e 6 (6,1%) dos insufladores. No entanto, proporcionalmente os isolados dos insufladores e óstios foram os que apresentaram maior resistência a um ou mais princípios testados.

Tabela 4 - Perfis de resistência aos antimicrobianos apresentados pelas estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de acordo com os respectivos sítios de isolamento, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

		Estirpes isoladas	
Perfil	Origem	n	%
1	Óstio	1	0,4
2	Leite	1	0,4
3	Leite	1	0,4
4	Leite	1	0,4
5	Óstio	1	0,4
6	Leite (72) Óstio (20) Insufladores (6)	98	40,0
7	Óstio	1	0,4
8	Leite	1	0,4
9	Óstio	1	0,4
10	Óstio (1) Insufladores (1)	2	0,8
11	Leite (2)	2	0,8
12	Leite (5) Óstio (2)	7	2,8
13	Leite (1) Óstio (1) Insufladores (2)	4	1,6
14	Insufladores	1	0,4
15	Leite	1	0,4
16	Leite (3)	3	1,2
17	Leite (1) Insufladores (1)	2	0,8
18	Leite (1) Óstio (2)	3	1,2
19	Leite (1) Óstio (2)	3	1,2
20	Leite	1	0,4
21	Leite	1	0,4
22	Óstio (4) Insufladores (2)	6	2,4
23	Óstio	1	0,4
24	Óstio	1	0,4
25	Insufladores	1	0,4
26	Insufladores	1	0,4
27	Óstio	1	0,4
28	Óstio (1) Insufladores (1)	2	0,8
29	Insufladores	1	0,4
30	Insufladores (2)	2	0,8
31	Óstio	1	0,4
32	Óstio	1	0,4
33	Óstio	1	0,4
34	Óstio	1	0,4
35	Leite	1	0,4
36	Óstio (2) Insufladores (2)	4	1,6
37	Leite	1	0,4
38	Leite	1	0,4
39	Leite (1) Insufladores (1)	2	0,8
40	Óstio (1) Insufladores (1)	2	0,8
41	Óstio	1	0,4
42	Leite	1	0,4
43	Óstio (1) Insufladores (1)	2	0,8
44	Óstio	1	0,4
45	Leite	1	0,4
46	Óstio	1	0,4
47	Óstio	1	0,4
48	Insufladores	1	0,4
49	Óstio	1	0,4
50	Leite	1	0,4
51	Óstio	1	0,4
52*	Leite (50) Óstio (11) Insufladores (5)	66	26,9
Total	Leite (150) Óstio (65) Insufladores (30)	245	100,0

*Sensíveis a todos antimicrobianos testados.

Observa-se, na Tabela 5, que 100 (66,7%) estirpes de *S. aureus* isoladas do leite apresentaram resistência a um ou mais princípios ativos testados em relação às 150 estirpes, de mesma origem. Embora as amostras dos óstios papilares tenham evidenciado, em relação a dos insufladores, maior número (54) de estirpes resistentes, observa-se que as amostras de ambos os sítios apresentaram praticamente a mesma resistência, com 83,1% e 83,3%, respectivamente.

Tabela 5 – Resistência das estirpes de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos de acordo com o número de princípios ativos resistentes e os respectivos sítios de isolamento, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

Número de antimicrobianos	Leite		Óstio		Insufladores		Total	
com resistência	n	%*	n	%*	n	%*	n	%*
1	75	50,0	23	35,4	6	20,0	104	42,4
2	16	10,7	9	13,8	6	20,0	30	12,2
3	2	1,3	6	9,2	3	10,0	11	4,5
4	-	-	2	3,1	3	10,0	5	2,0
5	-	-	4	6,1	2	6,7	6	2,4
6	4	2,7	3	4,6	3	10,0	11	4,5
7	2	1,3	4	6,1	1	3,3	7	2,8
8	1	0,7	2	3,1	1	3,3	4	1,6
9	-	-	1	1,5	-	-	1	0,4
Total	100	66,7	54	83,1	25	83,3	179	73,1

*Em relação ao número total de estirpes analisadas de acordo com a origem.

Na Figura 2 pode ser observado que as estirpes isoladas do leite apresentaram resistência superior, quando considerado apenas um antimicrobiano testado, em comparação com àquelas isoladas do óstio papilar e dos insufladores. Todavia, a partir da resistência frente a dois ou mais princípios ativos testados, as freqüências de isolamento das estirpes de *S. aureus* obtidas dos insufladores foram superiores a dos outros sítios investigados.

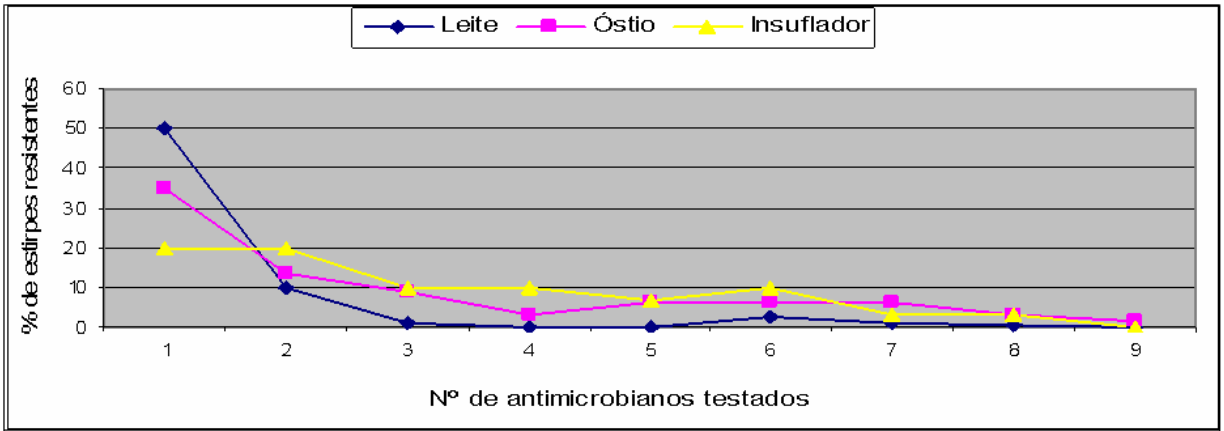

Figura 2 – Representação gráfica da resistência das estirpes de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos de acordo com o número de princípios ativos testados e aos respectivos sítios de isolamento.

Observa-se, na Tabela 6, que perante os antimicrobianos testados, 169 (69,0%) estirpes de *S. aureus* apresentaram resistência à penicilina. Dentre essas, 24 (96,0%), 49 (89,1%) e 96 (96,0%) foram isoladas dos insufladores, dos óstio papilar e do leite, respectivamente. Aparecem na seqüência de importância da ordem casuística as estirpes resistentes ao Cefepime (19,6%), à Oxacilina (16,3%) e à Clindamicina (14,7%). Nota-se, ainda, a ausência de estirpes de *S. aureus* resistentes à vancomicina.

Tabela 6 – Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* com respectivos sítios de isolamento de acordo com a resistência individual aos princípios ativos testados, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

Princípios	Leite		Óstio		Insufladores		Total	
ativos**	n*	%	n*	%	n*	%	n*	%
Cpm	11	11,0	23	41,8	14	56,0	48	19,6
Cip	10	10,0	3	5,5	-	-	13	5,3
Cli	9	9,0	15	27,3	12	48,0	36	14,7
Clo	1	1,0	3	5,5	2	8,0	6	2,4
Eri	1	1,0	6	10,9	3	12,0	10	4,1
Gen	9	9,0	8	14,5	3	12,0	20	8,2
Oxa	7	7,0	21	38,2	12	48,0	40	16,3
Pen	96	96,0	49	89,1	24	96,0	169	69,0
Rif	6	6,0	11	20,0	7	28,0	24	9,8
Sut	6	6,0	8	14,5	3	12,0	17	6,9
Tet	3	3,0	11	20,0	6	24,0	20	8,2
Total	100	-	54	-	25	-	179	-

* Número de estirpes.
** Cefepime (Cpm), Ciprofloxacina (Cip), Clindamicina (Cli), Cloranfenicol (Clo), Eritromicina (Eri), Gentamicina (Gen), Oxacilina (Oxa), Penicilina (Pen), Rifampicina (Rif), Sulfazotrim (Sut), Tetraciclina (Tet).

Na Figura 3 pode ser observada, quanto à resistência aos antimicrobianos testados, alta similaridade de comportamento existente entre as estirpes de *S. aureus* resistentes isoladas do óstio papilar e dos insufladores. Observa-se, também, que exceto à penicilina (96,0%) e à Ciprofloxacina (10,0%), as estirpes isoladas do leite apresentaram menor resistência aos princípios ativos testados do que aquelas isoladas dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira.

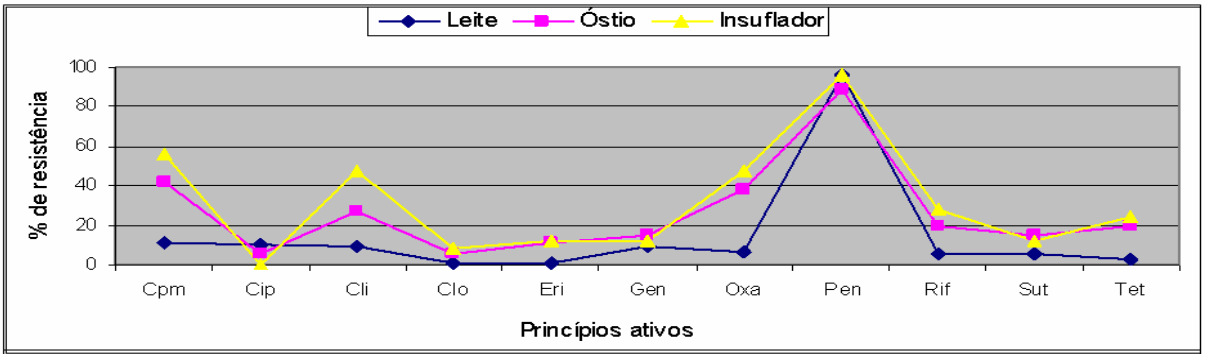

Figura 3 – Representação gráfica da distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* com respectivos sítios de isolamento de acordo com a resistência individual dos princípios ativos testados.

Observa-se, na Tabela 7, a prevalência dos genes *sea* de forma particular em 34 (59,6%) estirpes que apresentaram a amplificação de pelo menos um gene, as quais corresponderam a 13,9% do total das estirpes de *S. aureus* isoladas. Verifica-se, também, que os genes *tst*, *seb* e *sec* aparecem na seqüência da ordem de importância casuística, cujas freqüências de isolamentos foram de 14,1%, 10,7% e 10,7%, respectivamente.

Na Tabela 7 verifica-se, ainda, que dentre as estirpes de *S. aureus* que apresentaram amplificação de pelo menos um gene, seja das enterotoxinas dos tipos A a D, ou da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico, 28 (49,1%) foram isoladas do leite. Observa-se, também, que em 18 (31,6%) e 11 (19,3%) estirpes isoladas do óstio papilar e dos insufladores, respectivamente, foi possível identificar a presença de pelo menos um dos genes supracitados.

Tabela 7 - Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* com respectivos sítios de isolamento de acordo com a amplificação de pelo menos um dos genes estudados (*sea, seb, sec, sed* e *tst*), Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

Perfil	Tipos de genes amplificados	Origem						Total de estirpes	
		Leite		Óstio		Insuflador			
		n	%	n	%	n	%	n	%
1	sea	15	53,6	12	66,7	7	63,6	34	59,6
2	seb	3	10,7	1	5,5	2	18,2	6	10,6
3	sec	3	10,7	2	11,1	1	9,1	6	10,6
4	sed	1	3,6	-	-	-	-	1	1,7
5	tst	4	14,3	3	16,7	1	9,1	8	14,1
6	sea + sed	1	3,6	-	-	-	-	1	1,7
7	seb + tst	1	3,6	-	-	-	-	1	1,7
Total	-	28	100,0	18	100,0	11	100,0	57	100,0

Na Tabela 8 observa-se que o gene *sea* foi o que apresentou maior distribuição durante os meses estudados, exceto no mês de novembro (O) de 2006, onde não foi encontrado em nenhuma estirpe. Por outro lado, em estirpes obtidas do leite em fevereiro (F) de 2006, foi a data de colheita e a origem que apresentaram o maior número de genes identificados, com quatro (80,0%) genes distintos.

Tabela 8 - Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* que amplificaram os genes *sea, seb, sec, sed* e *tst* pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase segundo as datas de obtenção e os perfis enterotoxigênicos, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

Datas de obtenção*	Origem						Total	
	Leite		Óstio		Insuflador			
	Perfil	n	Perfil	n	Perfil	n	n	%
A	1	1	1	1	1	1	3	5,3
B	1	1	1	1	-	-	2	3,5
C	1	1	-	-	1	2	3	5,3
D	1	1	1	1	1	1	3	5,3
E	1	1	1	1	1	1	3	5,3
F	1, 4, 5, 6	4	1	1	-	-	5	8,8
G	1	1	-	-	-	-	1	1,7
H	1	2	1, 2	2	3, 5	2	6	10,5
I	1	1	1	2	1, 2	2	5	8,8
J	1	1	1, 3	2	1	1	4	6,9
K	1	3	1, 5	2	-	-	5	8,8
L	1, 5	2	1	1	-	-	3	5,3
M	1, 3, 5	5 (1,3,1)	1, 3, 5	3	-	-	8	14,0
N	2	1	-	-	-	-	1	1,7
O	2	2	-	-	-	-	2	3,5
P	7	1	5	1	2	1	3	5,3
Total	7	16	4	13	4	9	57	100,0

* A=15/08/05; B=12/09/05; C=05/10/05; D=07/11/05; E=12/12/05; F=13/02/06; G=13/03/06; H=10/04/06; I=08/05/06; J=05/06/06; K=03/07/06; L=07/08/06; M=19/09/06; N=09/10/06; O=06/11/06; P=04/12/06.
**1=*sea;* 2=*seb;* 3=*sec;* 4=*sed;* 5=*tst;* 6=*sea + sed;* 7=*seb + tst.*

Observa-se, na Figura 4, alguns exemplos de pulsotipos encontrados nas estirpes de *S. aureus* estudadas.

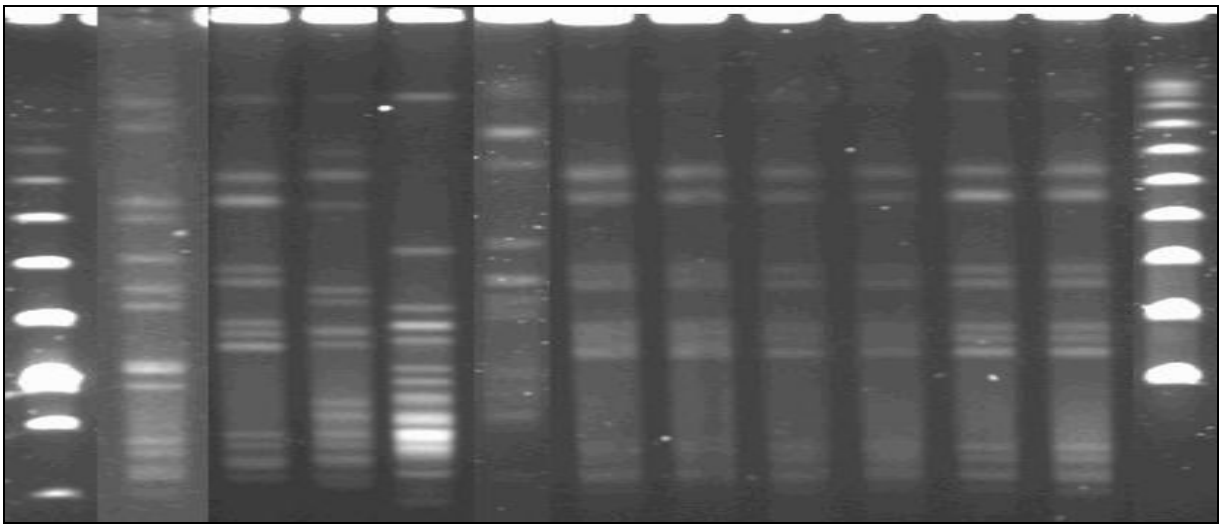

Figura 4 – Exemplos de padrões de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *Staphylococcus aureus* encontrados. Linhas 1 e 13 (marcadores de peso molecular); 2, 4, 5 e 6 (pulsotipos 10, 30, 31 e 34, respectivamente); 3, 7 a 12 (pulsotipo 29).

O índice numérico de discriminação (*D*) da PFGE foi igual a 0,94. Pode-se observar, na Tabela 9, a obtenção de 39 padrões de macrorrestrição do crDNA, também conhecidos como pulsotipos, das estirpes de *S. aureus* obtidos com a técnica de PFGE, a qual foi capaz de tipar 83,7% das estirpes estudadas.

Observa-se, também na Tabela 9, que o padrão 29 apresentou a maior prevalência entre os padrões de macrorrestrição do crDNA, com 15,1% (31) das estirpes tipadas, seguido pelos padrões 17, 24, 9 e 20, com 10,7% (22), 9,3% (19), 6,9% (14) e 5,8% (12), respectivamente.

Tabela 9 - Padrões de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de acordo com os respectivos sítios de isolamento, Centro de Bovino de Leite, Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

	Leite		Óstio		Insufladores		Total	
Pulsotipo	n	%	n	%	n	%	n	%
1	1	0,7	-	-	-	-	1	0,5
2	1	0,7	1	2	1	5,3	3	1,5
3	6	4,4	1	2	-	-	7	3,4
4	7	5,1	1	2	-	-	8	3,9
5	5	3,6	-	-	-	-	5	2,4
6	2	1,5	-	-	-	-	2	1,0
7	2	1,5	-	-	1	5,3	3	1,5
8	8	5,8	-	-	1	5,3	9	4,4
9	10	7,3	3	6,1	1	5,3	14	6,9
10	5	3,6	-	-	1	5,3	6	2,9
11	-	-	2	4,1	-	-	2	1,0
12	8	5,8	2	4,1	1	5,3	11	5,4
13	-	-	3	6,1	-	-	3	1,5
14	1	0,7	1	2	3	15,8	5	2,4
15	1	0,7	-	-	2	10,5	3	1,5
16	-	-	-	-	1	5,3	1	0,5
17	14	7,3	5	10,2	3	15,8	22	10,7
18	1	0,7	1	2	-	-	2	1,0
19	-	-	5	10,2	-	-	5	2,4
20	8	5,8	4	8,1	-	-	12	5,8
21	-	-	1	2	-	-	1	0,5
22	6	4,4	2	4,1	-	-	8	3,9
23	4	2,9	1	2	-	-	5	2,4
24	16	11,7	2	4,1	1	5,3	19	9,3
25	-	-	2	4,1	-	-	2	1,0
26	-	-	-	-	1	5,3	1	0,5
27	1	0,7	-	-	-	-	1	0,5
28	1	0,7	-	-	-	-	1	0,5
29	26	19	5	10,2	-	-	31	15,1
30	1	0,7	1	2	-	-	2	1,0
31	-	-	-	-	1	5,3	1	0,5
32	1	0,7	-	-	-	-	1	0,5
33	1	0,7	1	2	-	-	2	1,0
34	-	-	1	2	-	-	1	0,5
35	-	-	1	2	-	-	1	0,5
36	-	-	1	2	-	-	1	0,5
37	-	-	1	2	-	-	1	0,5
38	-	-	1	2	-	-	1	0,5
39	-	-	-	-	1	5,3	1	0,5
Total	137	100,0	49	100,0	19	100,0	205	100,0

A Tabela 10 revela a distribuição dos pulsotipos dos *S. aureus* de acordo com o período de obtenção das amostras. Pode ser observada a predominância de padrões nas datas de colheita dos meses de fevereiro (F), abril (H) e dezembro (P) de 2006,

com 10 (25,6%), 9 (23,1%) e 9 (23,1%) perfis distintos, respectivamente. No entanto, a data H apresentou mais estirpes tipadas, com 27 (13,2%) isolados, em relação às datas P e F, com 17 (8,3%) e 18 (8,9%), respectivamente.

No período que compreendeu de fevereiro (F) a setembro (M) de 2006 observa-se a concentração do maior número de pulsotipos e de isolados, com 26 (66,6%) e 136 (66,3%), respectivamente.

Tabela 10 – Distribuição dos padrões de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *Staphylococcus aureus* de acordo com as datas de obtenção, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

	Datas de obtenção*																Total	
Pulsotipo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	n	%
1	1																1	0,5
2	3																3	1,5
3		2															2	1,0
4		1	2				10										13	6,3
5			1			1	1	2									5	2,4
6			2														2	1,0
7			1	1			1										3	1,5
8				1	1	7											9	4,4
9				3	8	1		2									14	6,8
10				1			3	2									6	2,9
11					1	1											2	1,0
12								11									11	5,4
13								3									3	1,5
14						1		3		1							5	2,4
15								2	1								3	1,5
16								1									1	0,5
17								1	8	4	9						22	10,7
18							1		1								2	1,0
19									4	1							5	2,4
20											6	6					12	5,8
21											1						1	0,5
22												8					8	3,9
23						3					1	1					5	2,4
24			1			1				7			10				19	9,3
25																2	2	1,0
26									1								1	0,5
27						1											1	0,5
28						1											1	0,5
29						1							3	9	11	7	31	15,1
30													1	1			2	1,0
31													1				1	0,5
32														1			1	0,5
33																2	2	1,0
34																1	1	0,5
35																1	1	0,5
36																1	1	0,5
37																1	1	0,5
38																1	1	0,5
39																1	1	0,5
Total	4	3	7	6	10	18	16	27	15	13	17	15	15	11	11	17	205	100,0

*A=15/08/05; B=12/09/05; C=05/10/05; D=07/11/05; E=12/12/05; F=13/02/06; G=13/03/06; H=10/04/06; I=08/05/06; J=05/06/06; K=03/07/06; L=07/08/06; M=19/09/06; N=09/10/06; O=06/11/06; P=04/12/06.

Na Tabela 11 pode ser observada, segundo os sítios de isolamento, a distribuição das estirpes de *S. aureus* de acordo com os padrões de macrorrestrição do crDNA e as datas de obtenção das amostras. Com isso, observa-se que o padrão 5 foi obtido apenas de estirpes isoladas do leite e que apresentou 25,0% de prevalência dentre os períodos estudados, correspondentes a C, F, G e H. O pulsotipo 24 também apresentou prevalência igual, mas com distintos sítios de isolamento e com maior distribuição durante o período de colheita, de outubro de 2005 (C) a setembro de 2006 (M).

A Tabela 11 revela, também, que nos períodos A e H foram isoladas, em um mesmo dia de colheita, estirpes do leite, dos óstios papilares e dos insufladores pertencentes aos pulsotipos 2 e 12, respectivamente. Foram observadas, também em um mesmo momento de colheita, estirpes isoladas do leite e dos óstios papilares em 8 (50,0%) períodos (B, D, I, J, K, L, O e P) e padrões (3, 9, 17, 24, 20, 22, 29 e 33) distintos.

Pode-se observar, ainda na Tabela 11, que apenas no período E (6,2%) foram isoladas, em mesmo momento e padrão (9), estirpes do leite e dos insufladores. No entanto, observa-se a presença, nessa mesma situação, de estirpes isoladas dos óstios papilares e dos insufladores da ordenha no período J (6,2%) pertencentes ao padrão 17 de macrorrestrição.

Tabela 11 – Distribuição dos padrões de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *Staphylococcus aureus* de acordo com as datas de obtenção e os sítios de isolamento, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

	Período de obtenção*																Total	
Pulsotipo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	n	%
1	1L																1	0,5
2	1L, 1Ó, 1I																3	1,5
3		1L, 1Ó															2	1,0
4		1Ó	2L				10L										13	6,3
5			1L			1L	1L	2L									5	2,4
6			2L														2	1,0
7			1I	1L			1L										3	1,5
8				1L	1I	7L											9	4,4
9				2L, 1Ó	7L, 1I	1L		2Ó									14	6,8
10				1I			3L	2L									6	2,9
11					1Ó	1Ó											2	1,0
12								8L, 2Ó, 1I									11	5,4
13								3Ó									3	1,5
14						1Ó		3I		1L							5	2,4
15								2I	1L								3	1,5
16								1I									1	0,5
17								1I	5L, 3Ó	2Ó, 2I	9L						22	10,7
18							1L		1Ó								2	1,0
19									4Ó	1Ó							5	2,4
20											2L, 4Ó	6L					12	5,8
21											1Ó						1	0,5
22												6L, 2Ó					8	3,9
23						3L					1L	1Ó					5	2,4
24			1I			1L				5L, 2Ó			10L				19	9,3
25																2Ó	2	1,0
26									1I								1	0,5
27						1L											1	0,5
28						1L											1	0,5
29						1L							3Ó	9L	9L, 2Ó	7L	31	15,1
30													1Ó	1L			2	1,0
31													1I				1	0,5
32														1L			1	0,5
33																1L, 1Ó	2	1,0
34																1Ó	1	0,5
35																1Ó	1	0,5
36																1Ó	1	0,5
37																1Ó	1	0,5
38																1Ó	1	0,5
39																1Ó	1	0,5
Total	4	3	7	6	10	18	16	27	15	13	17	15	15	11	11	17	205	100,0

*A=15/08/05; B=12/09/05; C=05/10/05; D=07/11/05; E=12/12/05; F=13/02/06; G=13/03/06; H=10/04/06; I=08/05/06; J=05/06/06; K=03/07/06; L=07/08/06; M=19/09/06; N=09/10/06; O=06/11/06; P=04/12/06.

**I=Insufladores; L=Leite; Ó=Óstio papilar

Na Tabela 12 observa-se a presença de 25 (64,1%) padrões distintos de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *S. aureus* tipadas pela PFGE, dos quais o pulsotipo 29 apresentou o maior número (26) de tipagem das estirpes isoladas do leite, com 19,0%. Em seguida, vieram os padrões 24, 17, 4 e 9, com 11,7%, 10,2%, 8,7% e 7,3%, respectivamente.

Ressalta-se, também na Tabela 12, que os padrões 5 e 29 apresentaram as maiores persistências de *S. aureus* na glândula mamária, com 25,0% das datas estudadas. No entanto, o padrão 29 apresentou apenas 1 (0,7%) estirpe isolada em fevereiro (F) de 2006, sendo isolada novamente apenas em outubro (N), novembro (O) e dezembro (P) do mesmo ano.

Tabela 12 – Distribuição dos padrões de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite de acordo com o período de obtenção, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

	Datas de obtenção*																Total	
Pulsotipo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	n	%
1	1																1	0,7
2	1																1	0,7
3		1															1	0,7
4			2				10										12	8,7
5			1			1	1	2									5	3,8
6			2														2	1,4
7				1			1										2	1,4
8				1		7											8	5,9
9				2	7	1											10	7,3
10							3	2									5	3,8
11																	-	-
12								8									8	5,9
13																	-	-
14										1							1	0,7
15									1								1	0,7
16																	-	-
17									5		9						14	10,2
18							1										1	0,7
19																	-	-
20											2	6					8	5,9
21																	-	-
22												6					6	4,5
23						3					1						4	2,9
24						1				5			10				16	11,7
25																	-	-
26																	-	-
27						1											1	0,7
28						1											1	0,7
29						1								9	9	7	26	19
30														1			1	0,7
31																	-	-
32														1			1	0,7
33																1	1	0,7
34																	-	-
35																	-	-
36																	-	-
37																	-	-
38																	-	-
39																	-	-
Total	2	1	5	4	7	16	16	12	6	6	12	12	10	11	9	8	137	100,0

*A=15/08/05; B=12/09/05; C=05/10/05; D=07/11/05; E=12/12/05; F=13/02/06; G=13/03/06; H=10/04/06; I=08/05/06; J=05/06/06; K=03/07/06; L=07/08/06; M=19/09/06; N=09/10/06; O=06/11/06; P=04/12/06.

Pode ser observada, na Tabela 13, a presença da penicilina em todos os padrões de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *S. aureus* isoladas do leite. Quando considerada de forma particular ou em conjunto, foi identificada em 10 (45,4%) e 12 (54,6%) pulsotipos.

Dentre os 16 períodos de colheitas estudados foram identificados, de estirpes de *S. aureus* isoladas do leite e resistentes aos antimicrobianos testados, 22 (88,0%) pulsotipos distintos e 35 grupos de isolamento, dos quais 14 (63,6%) pulsotipos foram identificados esporadicamente e 8 (36,4%) apareceram duas ou três vezes.

Na Tabela 13, observa-se a persistência do pulsotipo 5, por três colheitas consecutivas, o qual apresentou perfis de resistência 12, 6 e 6 nos períodos F, G e H, respectivamente. O pulsotipo 29 também demonstrou persistência por três colheitas consecutivas, mas com maior variabilidade de resistência, ou seja, com 6 perfis distintos divididos entre 22 estirpes de *S. aureus* que representaram o maior número de estirpes isoladas de um mesmo pulsotipo.

O padrão de macrorrestrição do crDNA 12, como consta na Tabela 13, apresentou a segunda maior variabilidade em relação ao perfil de resistência. No entanto, as 5 estirpes de *S. aureus* deste padrão apresentaram 5 padrões de resistência distintos.

Na Tabela 14 pode ser observada a distribuição das estirpes de *S. aureus* que amplificaram os genes *sea, seb, sec, sed* e *tst* de acordo com os 23 pulsotipos distintos obtidos pela técnica da PFGE. O pulsotipo 17 apresentou maior prevalência entre as estirpes, representando 14,0% dos *S. aureus* com presença de pelo menos um dos genes, seguido pelos padrões 24 e 29, com 12,0% cada.

Ainda na Tabela 14, observa-se que o padrão 17 apresentou estirpes isoladas do leite (3), dos óstios (2) e dos insufladores (2). Quanto ao padrão 29, 5 (83,3%) estirpes foram isoladas do leite e somente 1 (16,7%) do óstio.

Tabela 13 – Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite de acordo com o período de obtenção com os respectivos padrões de macrorrestrição do crDNA relacionados aos perfis de resistência aos antimicrobianos, Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

	Datas de obtenção*																Total	
Pulsotipo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	n	%
1	1 (6)**																1	1,0
2	1 (16)																1	1,0
3		1 (6)															1	1,0
4			2 (6,6)				10 (6,6,6,6,6,6,6,11,12,13)										12	14,1
5						1 (12)	1 (6)	1 (6)									3	3,2
6			1 (6)														1	1,0
7							1 (6)										1	1,0
8				1 (6)		5 (6,6,6,6,45)											6	6,5
9					6 (4,6,6,6,6,38)	1 (6)											7	7,6
10							3 (6,6,6)	1 (6)									4	4,3
11																	-	-
12								5 (2,3,8,19,35)									5	5,4
13																	-	-
14																	-	-
15									1 (6)								1	1,0
16																	-	-
17									3 (6,6,6)		3 (6,6,6)						6	6,4
18							1 (16)										1	1,0
19																	-	-
20												2 (6,6)					2	2,1
21																	-	-
22												1 (6)					1	1,0
23											2 (6,6)						2	2,1
24						1 (6)				5 (6,6,6,6,6)			7 (6,6,6,6,6,17,39)				13	14,1
25																	-	-
26																	-	-
27						1 (15)											1	1,1
28						1 (16)											1	1,0
29						1 (6)								5 (6,6,6,6,6)	9 (6,6,6,6,12,12,16,18,20)	7 (6,6,6,6,6,11,12)	22	23,9
30																	-	-
31																	-	-
32																	-	-
33																1 (20)	1	1,0
34																	-	-
35																	-	-
36																	-	-
37																	-	-
38																	-	-
39																	-	-
Total	2	1	3	1	6	11	16	7	4	5	5	3	7	5	9	7	92	100

*A=15/08/05; B=12/09/05; C=05/10/05; D=07/11/05; E=12/12/05; F=13/02/06; G=13/03/06; H=10/04/06; I=08/05/06; J=05/06/06; K=03/07/06; L=07/08/06; M=19/09/06; N=09/10/06; O=06/11/06; P=04/12/06.

** ( ) = perfis de resistência aos antimicrobianos (2=Cip; 3=Cli; 4=Gen; 5=Oxa; 6=Pen; 8=Cpm/Cip; 11=Cpm/Pen; 12=Cip/Pen; 13=Cli/Pen; 15=Eri/Pen; 16=Gen/Pen; 17=Pen/Rif; 18=Pen/Sut; 19=Pen/Tet; 20=Cpm/Cip/Pen; 35=Cpm/Cip/Cli/Gen/Oxa/Pen; 38=Cpm/Cli/Gen/Oxa/Pen/Sut; 39=Cpm/Cli/Oxa/Pen/Rif/Sut; 45=Cpm/Cli/Oxa/Pen/Rif/Sut/Tet).

Tabela 14 – Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* que amplificaram pelo menos um dos genes *sea, seb, sec, sed* e *tst*, e que foram tipadas pela Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE), Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

	Datas de obtenção*																Total	
Pulsotipo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	n	%
2	1L, 1Ó, 1I**																3	6,0
3		1L, 1Ó															2	4,0
4			1L														1	2,0
7				1L													1	2,0
8					1I	2L											3	6,0
9				1Ó	1L												2	4,0
10				1I													1	2,0
11					1Ó	1Ó											2	4,0
12								1Ó									1	2,0
13								1Ó		1Ó							2	4,0
14								1I		1L							2	4,0
17								1I	1L, 2Ó	1I	2L						7	14,0
18							1L										1	2,0
19										1Ó							1	2,0
20											1L, 1Ó	1L					3	6,0
21											1Ó						1	2,0
22												1L					1	2,0
23												1Ó					1	2,0
24													5L, 1Ó				6	12,0
26									1I								1	2,0
27						1L											1	2,0
29						1L							1Ó	1L	2L	1L	6	12,0
30													1Ó				1	2,0
Total	3	2	1	3	3	5	1	4	4	4	5	3	8	1	2	1	50	100,0

*A=15/08/05; B=12/09/05; C=05/10/05; D=07/11/05; E=12/12/05; F=13/02/06; G=13/03/06; H=10/04/06; I=08/05/06; J=05/06/06; K=03/07/06; L=07/08/06; M=19/09/06; N=09/10/06; O=06/11/06; P=04/12/06.

** L=leite; Ó=óstio; I=insuflador.

6. DISCUSSÃO

Foram caracterizadas bioquímica e genotipicamente 245 estirpes de *S. aureus*, cuja distribuição de acordo com os sítios de isolamento encontra-se inserida na Tabela 1. Os dados desta tabela revelam que os referidos isolamentos foram maiores entre as amostras de leite (61,2%), seguidas pelo óstio papilar (26,4%) e insufladores (12,2%). Em contrapartida, nenhuma estirpe foi isolada de lesões de pele do teto e do leite do tanque de expansão.

Segundo estudos de OLIVEIRA (2001), realizado em cinco propriedades leiteiras da região noroeste do estado de São Paulo, o leite foi, também, o sítio que apresentou a maior ocorrência (85,0%) de estirpes de *S. aureus* isoladas. No entanto, obteve somente 1,5% de isolamentos nos insufladores, enquanto que nenhuma estirpe foi isolada dos óstios papilares.

A análise dos dados inseridos na Tabela 1 revela, também, que o leite foi o único sítio de isolamento que evidenciou a presença de *S. aureus* em todas as colheitas. Este achado talvez possa ser atribuído à formação de vacúolos que envolvem este microrganismo e que impedem o acesso e a ação de antibióticos. Assim, conforme assinala WAITTIAUX (2007), a multiplicação do *S. aureus* no interior da glândula mamária, acarretaria a permanência deste patógeno na glândula infectada, de modo a causar infecções de longa duração, com tendências a se tornarem crônicas e com baixas taxas de cura.

A alta prevalência de estirpes obtidas do óstio papilar e dos insufladores com, respectivamente, 81,2% e 56,2% dos meses estudados, assim como pode ser conferido ainda na Tabela 1, pode estar associada à interrupção da desinfecção dos tetos antes da ordenha, também conhecida como pré-*dipping,* a partir das datas de colheita de fevereiro (F) de 2006. Este procedimento, segundo SANTOS & FONSECA (2007), reduz a contaminação dos tetos e o risco de novas infecções intramamárias, além de melhorar a eficiência da ordenha. A incidência de infecções é altamente correlacionada com o número de patógenos presentes na extremidade dos tetos.

A desinfecção dos tetos depois da ordenha (pós-*dipping*) com desinfetante à base de iodo e dos insufladores da ordenhadeira sob imersão completa em balde com solução clorada (hipoclorito de sódio) são, segundo SANTOS & FONSECA (2007), medidas importantes para o controle da mastite. No entanto, a imersão dos insufladores

em balde com água e desinfetante, procedimento este adotado na propriedade estudada, apresenta limitações de ordem prática, com aumento do tempo de ordenha por ser mais uma medida adotada, e dificuldades em submergir os insufladores completamente na solução. Para que esta medida tenha efeito, a solução desinfetante deve ser trocada cada vez que se apresentar turva.

Pode ser observada, na Figura 1, a maior concentração de *S. aureus* isolados do óstio papilar durante as colheitas realizadas nos meses de abril (H) a setembro (M) de 2006, com 36 estirpes, o que representa 14,6% e 55,4% das estirpes isoladas durante todo o período de obtenção e de acordo com seu sítio de isolamento, respectivamente. Observa-se, ainda, que nas colheitas dos meses de abril (H), maio (I) e junho (J) de 2006, foi encontrado o maior número de estirpes isoladas dos insufladores, com 15 (50%) estirpes identificadas.

A dificuldade em que a imersão completa dos insufladores em solução desinfetante representa associada à troca de ordenhadores em abril (H) de 2006 e à deficiência na padronização das medidas adotadas pelos novos funcionários, principalmente no que se refere à desinfecção dos tetos antes e depois da ordenha, podem ter contribuído para o aumento do isolamento de *S. aureus* isolados dos óstios e dos insufladores da ordenha nesta época do ano.

Segundo dados obtidos no site do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO, 2007), não choveu em nenhum dia anterior às datas de colheitas e não houve variação significante na média de temperatura e de índice pluviométrico entre os períodos que correspondem de agosto (A) a dezembro (E) de 2005, com média de 22,7 ºC e 70,6 mm, e respectivas datas de colheitas em 2006, L a M, com 23,3 ºC e 84,9 mm por mês. Com isso, acredita-se que a temperatura e o índice pluviométrico não tenham interferido na quantidade de isolados de *S. aureus* durante as colheitas de um ano para o outro.

Dentre as 245 estirpes caracterizadas como pertencentes à espécie *S. aureus,* observa-se, na Tabela 2, 179 (73,1%) estirpes que se apresentaram resistentes a um ou mais dos princípios ativos testados. Dentre estas, o sítio de isolamento que apresentou o maior número de estirpes resistentes foi o leite, com 100 (66,7%) estirpes resistentes. No entanto, proporcionalmente os isolados dos insufladores e óstios foram os que apresentaram maior resistência, com 25 (83,3%) e 54 (83,1%) estirpes. Entretanto, não foi encontrado nenhum relato científico sobre o perfil de resistência de

estirpes de *S. aureus* isoladas dos insufladores da ordenhadeira mecânica e óstios papilares.

Segundo NADER FILHO et al. (2007), em estudo realizado em 10 propriedades rurais do Estado de São Paulo, 100% das estirpes isoladas no leite de vacas com mastite clínica e subclínica apresentaram resistência simultânea a pelo menos dois princípios ativos testados. DINIZ et al. (1998) citam que, ao fazer uso da antibioticoterapia contra a mastite por *S. aureus,* vários fatores podem interferir na taxa de cura bacteriológica do microrganismo. Neste sentido os referidos autores afirmam que o estágio da infecção, a presença de bactérias em abcessos ou mesmo a incapacidade das células fagocíticas em destruir estes patógenos podem influenciar no sucesso da terapia.

A análise dos dados inseridos na Tabela 3 mostra que os testes de sensibilidade aos antimicrobianos revelaram a presença de 179 (73,1%) estirpes de *S. aureus* agrupadas em 51 padrões de resistência distintos. Dentre estes, o padrão de resistência à penicilina foi o que predominou quando considerado de forma particular (54,8%) ou em conjunto (29,4%). FREITAS et al. (2005), em estudo realizado com 59 estirpes de estafilococos coagulase positiva isoladas de casos de mastite no agreste pernambucano, identificaram predominância de resistência à penicilina em 80,0% das amostras, seguido pela amoxacilina com 75,0%.

Como era de se esperar, o teste de sensibilidade aos antimicrobianos revelou menor poder discriminatório (D=0,69) que a PFGE (D=0,94). Pode estar relacionado, principalmente, ao fato de 40,0% (98) das estirpes estudadas concentrarem-se em um único perfil, que foi o de resistência à penicilina. No entanto, a PFGE apresentou melhor distribuição entre seus pulsotipos, o que aumentou, com isso, o poder discriminatório da técnica. Este achado significa que em estudos epidemiológicos, a técnica de PFGE é muito mais adequada que os testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Tais achados foram semelhantes aos obtidos por LANGE et al. (1999), com valores iguais a 0,72 e 0,96.

OLIVEIRA (2001) observou, em estudo realizado em cinco propriedades de exploração leiteira do estado de São Paulo, ao realizar duas colheitas com intervalo de doze meses, a presença de 27 padrões de resistência distintos. Das 105 estirpes de *S. aureus* isoladas, 93 (88,6%) apresentaram resistência à penicilina de forma particular ou em conjunto.

A alta variabilidade dos perfis de resistência aos antimicrobianos revelada pelos isolados de *S. aureus* em algumas propriedades é preocupante, pois muitos dos antibióticos disponíveis no mercado não teriam efeito sobre esta bactéria dificultando ou impossibilitando o tratamento dos animais com mastite e trazendo maiores gastos e prejuízos para os proprietários (FREITAS et al., 2005).

Referente à quantidade de antimicrobianos resistentes ter sido maior em estirpes isoladas dos óstios e insufladores, como pode ser observado na Tabela 4, acredita-se que esteja relacionado à possível formação de biofilmes. Segundo AMORENA et al. (1999), *S. aureus* isolados de mastite estão associados à redução da suscetibilidade a antibióticos, fato este atribuído à baixa difusão de antibióticos na matriz e a baixa atividade metabólica da bactéria dentro do biofilme.

Na Tabela 4 pode ser observada a distribuição dos *S. aureus* resistentes de acordo com os sítios de isolamento, na qual o perfil 6, de resistência à penicilina, destacou-se com o maior número de estirpes isoladas. Dentre estas, 72 (73,5%) foram isoladas do leite, 20 (20,4%) dos óstios papilares e 6 (6,1%) dos insufladores. Sabe-se que há estirpes de *S. aureus* capazes de produzir a enzima beta-lactamase (ARCHER et al., 1994) e, por isso, acredita-se que o predomínio da resistência das estirpes estudadas frente à penicilina possa, a este fato, ser atribuído.

Em estudo realizado de 1992 a 2001, COSTA et al. (2004) verificaram que 93,7% dos microrganismos do gênero *Staphylococcus* isolados de mastite bovina clínica e subclínica de rebanhos leiteiros dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro, apresentaram resistência à penicilina. Segundo estudos realizados por LANGE et al. (1999), na região Sul do Brasil, 48,5% dos isolados de *S. aureus* de casos de mastite bovina foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados e 43,9% dos isolados foram resistentes à penicilina de forma particular ou em associação.

Na Tabela 5 observa-se que 100 (66,7%) estirpes de *S. aureus* isoladas do leite apresentaram resistência a um ou mais princípios ativos testados. No entanto, proporcionalmente, os isolados dos insufladores e óstios foram os que apresentaram maior resistência, com 83,3% (25) e 83,1% (54), respectivamente.

Atenta-se, na Figura 2, que as estirpes isoladas do leite apresentaram resistência superior, frente a um único antimicrobiano testado, quando comparadas àquelas isoladas do óstio papilar e dos insufladores. Todavia, quando considerada a resistência

frente a dois ou mais princípios ativos, as estirpes de *S. aureus* isoladas dos insufladores apresentaram valores superiores aos dos outros sítios de isolamento.

O uso inadequado de antibióticos propicia o aparecimento de estirpes multi-resistentes, o que compromete o tratamento da mastite bovina (BARBERIO et al., 2002), assim como algumas características de virulência contribuem para a persistência do *S. aureus* no tecido mamário (SANTOS et al., 2003; FREITAS et al., 2005). Assim, acredita-se que estes fatores possam não apenas comprometer a eficiência do tratamento da mastite bovina, como, também, justificar o número maior de estirpes de *S. aureus* resistentes aos antimicrobianos, quando comparadas aos óstios e insufladores.

Neste sentido, sabe-se que a água é o principal componente do biofilme, tornando-o hidrofílico (HOIBY et al., 2001), e que canais abertos de água circulam entre as estruturas do biofilme permitindo a aquisição e troca de genes por transferência horizontal (WUERTZ et al., 2004). Com isso, acredita-se que a formação de biofilme nos insufladores, caso ocorra falhas na manutenção e na higiene dos aparelhos, possa contribuir para a troca de genes de resistência entre os microrganismos que ali colonizam. Assim sendo, a maior ocorrência de estirpes resistentes isoladas dos óstios e insufladores, talvez possa ser atribuída a possível formação de biofilmes.

As estirpes de *S. aureus* multirresistentes isoladas dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira podem representar risco quanto à possibilidade de penetrarem e colonizarem a glândula mamária. Com isso, reforça-se, ainda mais, a necessidade de boas práticas de higiene durante a ordenha, principalmente quanto à execução do pré e pós-*dipping* e correta higienização do equipamento.

A análise dos valores inseridos na Tabela 6 revela que, frente aos antimicrobianos testados, 169 (69,0%) estirpes de *S. aureus* apresentaram resistência à penicilina. Dentre essas, 24 (96,0%), 49 (89,1%) e 96 (96,0%) foram isoladas dos insufladores, dos óstio papilar e do leite, respectivamente. Por outro lado, revela, também, que as maiores resistências ocorreram frente ao Cefepime (19,6%), à Oxacilina (16,3%) e à Clindamicina (14,7%). Outra informação importante e que deve ser ressaltada é quanto à ausência de estirpes de *S. aureus* resistentes à vancomicina.

FREITAS et al. (2005) encontraram 80,0% de estirpes isoladas do leite no nordeste pernambucano resistentes à penicilina e 15,0% à oxacilina. Porém, SILVA et

al. (2006) encontraram apenas 1,4% de estirpes de *S. aureus* isoladas de leite resistentes à penicilina em dois rebanhos estudados na região do Vale do Paraíba e, dentre as estirpes estudadas, nenhuma apresentou resistência ao cefepime, à oxacilina e à clindamicina. No entanto, nenhum trabalho científico foi encontrado com relatos sobre resistência a antimicrobianos de estirpes isoladas dos óstios e dos insufladores da ordenhadeira.

AARESTRUP et al. (1995) também não identificaram estirpes de *S. aureus* isoladas de leite resistentes à oxacilina, mas NADER FILHO et al. (2007) encontraram, em estudo realizado com 72 estirpes de *S. aureus*, também isoladas do leite, 15,3% de resistência. No entanto, nestes dois estudos nenhum realizou testes frente ao cefepime e à clindamicina.

As cefalosporinas são usualmente utilizadas contra estreptococos beta-hemolíticos e estafilococos produtores de beta-lactamase, mas não contra estafilococos resistentes à meticilina (oxacilina). As cefalosporinas de primeira geração foram, originalmente, introduzidas no tratamento de infecções estafilocócicas resistentes à penicilina. Atualmente encontra-se até a quarta geração, da qual faz parte o cefepime que, assim como as outras, também são utilizadas contra microrganismos Gram positivos. No entanto, o cefepime apresenta moderada ação sobre *Staphylococcus aureus,* ao contrário das cefalosporinas de primeira geração, como, por exemplo, a cefalotina e a cefalexina (PRESCOTT, 2006).

A resistência à oxacilina, o que também significa ser resistente à meticilina, foi encontrada em 16,3% das amostras derivadas do leite, óstio e insufladores, com maior freqüência nos insufladores (48,0%) e óstios (38,2%), como consta na Tabela 6. Este tipo de resistência é preocupante nos casos de resistência à múltiplas drogas (MDR – *Multiple Drug Resistance",* pois além da resistência à oxacilina, pode representar grande problema em Saúde Pública, pois existem casos destas amostras poderem apresentar resistência à vancomicina, esgotando-se o esquema terapêutico com antimicrobianos disponíveis (LARSEN, et al. 2008).

Na Figura 3 pode ser observada, quanto à resistência aos antimicrobianos testados, alta similaridade de comportamento existente entre as estirpes de *S. aureus* resistentes isoladas do óstio papilar e dos insufladores. Observa-se, também, que exceto a resistência apresentada frente à Penicilina (96,0%) e à Ciprofloxacina (10,0%), as estirpes isoladas do leite apresentaram menor porcentagem de resistência frente aos

princípios ativos testados, quando comparadas àquelas isoladas dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira. No entanto, não foram encontradas pesquisas quanto à sensibilidade *in vitro* de estirpes de *S. aureus* isoladas do óstio papilar e de insufladores.

Algumas evidências sugerem que estirpes de *S. aureus* que colonizam regiões extramamárias, não são as mesmas que causam infecção intramamária (ZADOKS et al., 2002). Devido ao grande potencial de produção de exopolissacarídeo como fator de virulência para infecção intramamária, hipotetizou-se que os *S. aureus* que causam infecções intramamárias têm maior habilidade de produzir biofilmes que isolados de fontes extramamárias (FOX et al., 2005).

A simples presença de amostras toxigênicas de *S. aureus* no leite não implica na ocorrência de intoxicações, porém o risco existe, principalmente se considerar que esse microrganismo é o mais envolvido nas infecções intramamárias dos bovinos, que o leite é um excelente meio de crescimento para *S. aureus,* que a temperatura da glândula mamária é a ideal para a produção de TSST-1 e de enterotoxinas, e que apenas pequenas concentrações de toxinas são suficientes para causar doença em seres humanos, principalmente em crianças (CARDOSO et al., 2000; FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

Das 245 estirpes de *S. aureus* isoladas, 57 (23,7%) estirpes apresentaram a presença de pelo menos um dos genes estudados, como pode ser visto na Tabela 7, sendo 28 (49,1%) isoladas do leite. Resultado semelhante foi encontrado por ZSCHÖCK et al. (2000), em estudo realizado com 94 estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite durante dois anos, no qual foi encontrada a presença de pelo menos um gene em 36,2% (34) das estirpes estudadas.

Observa-se, na Tabela 7, a prevalência dos genes *sea* de forma particular em 59,6% (34) das estirpes que apresentaram a amplificação de pelo menos um gene e, em conjunto, com 61,4% (35). Em relação ao número total de amostras isoladas (245), corresponderam a 13,9% das estirpes de *S. aureus.* No entanto, não foram encontrados dados científicos que apresentassem proximidade de valores referentes ao gene *sea* de origem bovina. ZSCHÖCK et al. (2000) identificaram a presença de apenas 3 (3,2%) estirpes com o gene *sea.* SCHERRER et al. (2004) verificaram, em leite de cabras obtido de tanques de expansão, a presença deste gene em 28 (14,6%) estirpes de *S. aureus.*

Em contrapartida, no que se refere ao gene *sec,* ZSCHÖCK et al. (2000) encontraram 64,7% (22) de presença, seguidos pelos genes *tst*, *sed* e *seb,* com 55,9% (19), 11,7% (4) e 5,9% (2), respectivamente. No entanto, como mostra a Tabela 7, neste trabalho o gene *tst* foi o segundo com maior prevalência (17,8%), seguido pelos genes *seb, sec* e *sed,* com 14,3%, 10,7% e 7,1%, respectivamente.

Entre as enterotoxinas clássicas SEA e SEE e a TSST-1, tem relevância nos casos de mastite bovina, as linhagens de *S. aureus* que apresentam os genes para as toxinas SEC e TSST-1, pois estas são as estirpes associadas com severos casos de mastite clínica ou casos que não respondem à terapia com antibióticos (ZSCHÖCK et al., 2004). Na Alemanha, a associação dos genes *sec* e *tst* em linhagens de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina também foi observada por SALASIA et al. (2004) havendo, segundo estes autores, uma variação geográfica de linhagens de *S. aureus* enterotoxigênicos. Em contrapartida, neste estudo, nenhuma estirpe apresentou amplificação em conjunto dos genes *sec* e *tst*. O gene da síndrome do choque tóxico foi encontrado em associação com o gene *seb* apenas em uma estirpe*,* representando 1,7% dos isolados.

Foi possível identificar, ainda na Tabela 7, a presença em 18 (31,6%) e 11 (19,3%) estirpes, de pelo menos um gene estudado, isoladas do óstio papilar e dos insufladores, respectivamente. No entanto, não foram encontrados dados na literatura referentes à pesquisa de genes das enterotoxinas estafilocócicas obtidos de estirpes desses sítios de isolamento. Com isso, este trabalho relata o isolamento de 12 (66,7%) estirpes de *S. aureus* com a presença de gene *sea* isolados dos óstios papilares, seguidos pelos genes *tst, sec* e *seb,* com 3 (16,7%), 2 (11,1%) e 1 (5,5%), respectivamente. Em relação aos insufladores, o gene que apresentou maior prevalência foi, também, o *sea,* com 7 (63,6%) estirpes, seguidos pelos genes *seb, sec* e *tst,* com 2 (18,2%), 1 (9,1%) e 1 (9,1%), respectivamente.

A simples presença de genes enterotoxigênicos não indica, necessariamente, a capacidade do microrganismo de produzir toxina biologicamente ativa suficiente para induzir manifestações clínicas (MCLAUCHLIN et al., 2000). No entanto, o simples fato de uma estirpe conter um ou mais genes enterotoxigênicos deve ser significante, pois pode oferecer risco à Saúde Pública caso encontre condições favoráveis à produção de enterotoxinas.

Pode ser observado, na Tabela 8, que o gene *sea* apresentou maior prevalência nas datas de colheitas de agosto (A) a dezembro (E) de 2005, com 41,2% das estirpes de *S. aureus* identificadas com este gene durante todo o período de colheita. No entanto, somente na colheita de novembro (O) de 2006 não foi encontrada nenhuma estirpe com o gene *sea.* A detecção do gene da enterotoxina A em linhagens de *S. aureus* é importante visto que a SEA é tóxica em baixas concentrações (EVENSON et al., 1988).

Por outro lado, ainda na Tabela 8, em estirpes obtidas do leite em fevereiro (F) de 2006, foi a data de colheita e a origem que apresentaram o maior número de genes identificados, com quatro (80,0%) genes distintos. Resultado semelhante foi encontrado por OMOE et al. (2002), cujo trabalho apresentou 77,4% de isolados de *S. aureus* positivos para um ou mais genes de SEs.

A PFGE é o método de tipagem molecular que apresenta a maior capacidade discriminatória para estirpes de *S. aureus* (LANGE et al., 1999) e, sendo assim, segundo pode ser observado na Tabela 9, o padrão 29 apresentou a maior prevalência entre os padrões de macrorrestrição do crDNA, com 15,1% (31) das estirpes tipadas, seguido pelos padrões 17, 24, 9 e 20, com 10,7% (22), 9,3% (19), 6,9% (14) e 5,8% (12), respectivamente. LANGE et al. (1999) observaram, ao pesquisar 66 estirpes de *S. aureus* isoladas de leite de vacas mastíticas no sul do Brasil, 33 pulsotipos distintos e, também, a presença de um mesmo padrão de macrorrestrição do crDNA em 15,1% das amostras.

A elevada variabilidade dos padrões fenotípicos e genotípicos pode decorrer, ainda, da diversidade dos locais nos quais os *S. aureus* foram obtidos, uma vez que estes microrganismos podem ser isolados no leite de vacas infectadas, na superfície da pele dos tetos de vacas e de novilhas, em restos de alimentos, em insufladores de ordenhadeira mecânica e até mesmo nas mãos e fossas nasais de portadores humanos (BRAMLEY & DODD, 1984; ROBERSON et al., 1994, 1998).

A Tabela 10 mostra a maior variabilidade de pulsotipos nas datas de colheita dos meses de fevereiro (F) e abril (H) de 2006, com 10 (25,6%) e 9 (23,1%) perfis distintos, respectivamente. No entanto, a data H apresentou mais estirpes tipadas, com 27 (13,2%) isolados, em relação à data F, com 18 (8,9%). Como se realizou estação de monta na propriedade estudada, os partos concentraram-se de dezembro de 2005 (E) a fevereiro de 2006 (F) e, no segundo semestre, de junho (J) a agosto (L) de 2006.

Segundo LARSEN et al. (2008), em estudo realizado com 625 estirpes de *S. aureus* isoladas de leite em nove propriedades da Dinamarca, algumas estirpes apresentaram habilidades particulares de colonizar ou de persistir na glândula mamária bovina, inclusive durante o período seco, de modo a acarretar o aumento da incidência de casos de mastite no rebanho. Assim sendo, acredita-se que este fato destacado pelos referidos autores, talvez possa também ter contribuído para a introdução de novos pulsotipos nas datas supracitadas, de modo a evidenciar a elevada importância da utilização da antibioticoterapia no período seco como medida de controle da mastite bovina.

Deve-se assinalar, contudo, que na propriedade objeto desta investigação foi realizada a antibioticoterapia para o tratamento de vaca seca, sendo utilizado para tanto o cefoperazone sódico ou o éster de benzilpenicilina. Todavia, estes princípios ativos foram escolhidos ao acaso, sem qualquer informação relacionada aos testes de sensibilidade i*n vitro*. FERREIRA et al. (2006) ressaltam, ainda, o risco de falhas no tratamento da mastite, caso sejam extrapoladas para todos os animais do rebanho, as informações obtidas pelo antibiograma a partir de algumas poucas estirpes de *S. aureus.*

Ainda na Tabela 10, verifica-se que no período compreendido entre fevereiro (F) e setembro (M) de 2006, ocorreu maior concentração de pulsotipos e de isolados, com 26 (66,6%) e 136 (66,3%), respectivamente. Tais achados talvez possam ser associados, também, à introdução de novos animais na linha de ordenha após o parto, pois, para BRAMLEY & DODD(1984), muitos quartos mamários desenvolvem inflamação crônica que frequentemente podem persistir por mais de uma lactação.

De acordo com SOMMERHÄUSER et al. (2003), se após a implementação do Programa dos 5 pontos de controle da mastite, desenvolvido na Inglaterra na década de 1960 pelos pesquisadores do antigo NIRD (*National Institute of Research in Dairying*), o número de quartos infectados não diminuir, deve ser adotado o uso intensivo de antibioticoterapia ou, em alguns casos, o descarte das vacas cronicamente infectadas.

Na Tabela 11 pode ser observada a prevalência (25,0%), dentre datas estudadas que correspondem a outubro (C) de 2005 e de fevereiro (F) a abril (H) de 2006, do pulsotipo 5 obtido apenas de estirpes isoladas do leite. MYLLYS et al. (1997) identificaram, em estudo realizado com 40 estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite na Finlândia e, também, em casos de infecção experimental, alguns perfis

genéticos de *S. aureus* na fase aguda que apresentaram a capacidade de persistir no úbere, não sendo comum a reinfecção por outros padrões. No entanto, não descartam a possibilidade de reinfecção por perfis genotípicos predominantes em alguns rebanhos e, até mesmo, regiões. No presente trabalho, foi possível observar a habilidade das estirpes de *S. aureus* pertencentes ao pulsotipo 5 de colonizarem a glândula mamária e de instalarem-se por, no mínimo, três meses.

O pulsotipo 24 também apresentou a mesma prevalência que o pulsotipo 5, porém com distintos sítios de isolamento e com maior distribuição durante o período de colheita, de outubro de 2005 (C) a setembro de 2006 (M). Deve-se assinalar, contudo, que não foram encontrados dados na literatura relatando a similaridade genética entre estirpes isoladas em amostras de leite com as de óstios papilares e de insufladores da ordenhadeira. No entanto, estes dados contrariam ZADOKS et al. (2002), que dizem existir evidências que sugerem diferenças entre estirpes de *S. aureus* que colonizam a glândula mamária, causando a mastite, com estirpes de regiões extramamárias.

A Tabela 11 revela, também, que nos períodos A e H foram isoladas, em um mesmo dia de colheita, estirpes do leite, dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira mecânica pertencentes aos pulsotipos 2 e 12, respectivamente. Foram observadas, também, em um mesmo momento de colheita, estirpes isoladas do leite e dos óstios papilares em 8 (50,0%) períodos (B, D, I, J, K, L, O e P) e padrões (3, 9, 17, 24, 20, 22, 29 e 33) distintos. Tais achados ratificam a importância dos insufladores das ordenhadeiras mecânicas no mecanismo de transmissão da mastite e, também, alertam para os riscos das estirpes que colonizavam os óstios papilares de penetrarem na glândula mamária sadia ou de serem transmitidas a outras vacas durante a realização da ordenha.

Assim sendo, estes achados ratificam a elevada importância da desinfecção cuidadosa e padronizada dos tetos antes e depois da ordenha com desinfetante à base de iodo e dos insufladores da ordenhadeira sob imersão completa em balde com solução clorada (hipoclorito de sódio), como medidas indicadas para a prevenção e controle da mastite bovina. Neste sentido, especial atenção deve ser dispensada para a troca de funcionários, com a finalidade de proporcionar condições para a padronização de procedimentos de higiene adotados na ordenha.

Pode-se observar, ainda na Tabela 11, que apenas no período E (6,2%) foram isoladas, em um mesmo momento e padrão (9), estirpes do leite e dos insufladores.

Observa-se a presença, nesta mesma situação, de estirpes isoladas dos óstios papilares e dos insufladores da ordenha no período J (6,2%) pertencentes ao padrão 17 de macrorrestrição. Estes dados, mais uma vez, corroboram para a correlação epidemiológica existente entre estes sítios de isolamento e o leite, o que reforça, ainda mais, a importância dos cuidados que devem ser adotados durante a ordenha.

Na Tabela 12 observa-se a presença de 25 (64,1%) padrões distintos de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *S. aureus* isoladas do leite e tipadas pela PFGE, dos quais o pulsotipo 29 apresentou o maior número (26) de tipagem, com 19,0%. Em seguida, vieram os padrões 24, 17, 4 e 9, com 11,7%, 10,2%, 8,7% e 7,3%, respectivamente. Isso foi possível, principalmente, porque existe heterogeneidade genética considerável em populações naturais de *S. aureus* (TENOVER et al., 1994; KAPUR et al., 1995) de modo a contribuir para a disseminação deste microrganismo no rebanho. SOMMERHÄUSER et al. (2003) encontraram, dentre os seis rebanhos estudados na Alemanha, a predominância de alguns padrões genotípicos de *S. aureus* em dois (33,3%) rebanhos.

Ressalta-se, ainda na Tabela 12, que os padrões 5 e 29 apresentaram as maiores persistências de *S. aureus* na glândula mamária, com 25,0% das datas estudadas. LARSEN et al. (2000) verificaram, também, a ocorrência de estirpes de *S. aureus* que apresentaram esta capacidade de colonizar e persistir na glândula mamária. No entanto, não foram encontrados dados na literatura sobre a persistência de estirpes isoladas dos óstios e dos insufladores da ordenhadeira.

O padrão 29 apresentou apenas 1 (0,7%) estirpe isolada em fevereiro (F) de 2006, isolada do leite de uma vaca com mastite subclínica e que não apresentou, posteriormente, nenhum outro isolamento. Este animal provavelmente teve cura espontânea, pois o uso de antimicrobianos durante a lactação foi efetuado somente em animais com mastite clínica. No entanto, o perfil 29 foi novamente isolado nos meses de outubro (N), novembro (O) e dezembro (P) do mesmo ano. Desta vez, parece que a estirpe retornou ao rebanho com maior capacidade de disseminação uma vez que foi isolada em 4 vacas diferentes em outubro (N), duas em novembro (O) e, também neste mês, em outras duas vacas, sendo que uma delas apresentou quadro de mastite clínica.

Dos 25 (64,1%) pulsotipos distintos obtidos das estirpes isoladas do leite, 14 (56,0%) foram identificados apenas uma vez durante as datas de colheitas, que

correspondem aos padrões 1, 2, 3, 6, 12, 14, 15, 18, 22, 27, 28, 30, 32 e 33. Dados similares foram encontrados por SOMMERHÄUSER et al. (2003) quando estudaram a epidemiologia de *S. aureus* causadores de mastite subclínica em vacas durante um programa de controle da mastite, com uma colheita a cada quatro meses durante dois anos. Verificaram que em três rebanhos estudados não foram encontradas estirpes persistentes e que muitas foram identificadas somente em casos esporádicos.

Pode ser observada, na Tabela 13, a presença da penicilina em todos os padrões de macrorrestrição do crDNA das estirpes de *S. aureus* isoladas do leite. Quando considerada de forma particular ou em conjunto, foi identificada em 10 (45,4%) e 12 (54,6%) pulsotipos, respectivamente. FERREIRA et al. (2006), ao utilizarem a PCR-ribotipagem, técnica com poder discriminatório menor que a PFGE, encontraram resistência à eritromicina e à lincomicina em três padrões de ribotipagem, isoladamente ou em associação, em 73,7% das estirpes de *S. aureus* isoladas do leite e que apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano testado.

Dentre os 16 períodos de colheitas estudados foram identificados, de estirpes de *S. aureus* isoladas do leite e resistentes aos antimicrobianos testados, 22 (88,0%) pulsotipos distintos e 35 grupos de isolamento, dos quais 14 (63,6%) pulsotipos foram identificados esporadicamente e 8 (36,4%) apareceram duas ou três vezes. LARSEN et al. (2008) relataram, também, a presença de padrões de estirpes de *S. aureus* com baixa habilidade de colonizar a glândula mamária, sendo responsáveis por casos esporádicos de infecção intramamária. Com isso, evidenciou-se a existência de estirpes isoladas esporadicamente dos óstios e dos insufladores que não demonstraram capacidade de penetrar e se instalar na glândula mamária ou que, talvez naquele momento, as medidas preventivas de controle tenham sido efetuadas de maneira correta, a ponto de impedir a instalação destas estirpes no úbere.

Na Tabela 13 observa-se a persistência do pulsotipo 5, por três colheitas consecutivas, o qual apresentou perfis de resistência 12, 6 e 6 nos meses de fevereiro (F) a abril (H) de 2006, respectivamente. Isto pode ser devido ao fato de estirpes de *S. aureus* serem capazes de colonizar ou de persistir na glândula mamária bovina (LARSEN et al., 2008), principalmente por serem capazes de formar vacúolos que envolvem o microrganismo e impedem o acesso e a ação de antimicrobianos (WAITTIAUX, 2007).

Segundo TENOVER et al. (1994), a combinação de dois ou mais métodos de tipagem proporciona maior possibilidade de discriminação dos padrões das estirpes estudadas. É o que pode ser observado, ainda na Tabela 13, onde o pulsotipo 29, além de persistir por três colheitas consecutivas, apresentou maior variabilidade de resistência aos antimicrobianos testados, ressaltando a importância do uso de pelo menos duas técnicas para discriminar, ainda mais, as estirpes em estudo. Para reforçar esta condição, o pulsotipo 12 apresentou a segunda maior variabilidade em relação ao perfil de resistência, com 5 estirpes de *S. aureus* de um mesmo pulsotipo apresentando 5 padrões de resistência distintos.

A variabilidade dos perfis de resistência aos antimicrobianos encontrada entre estirpes de mesmo pulsotipo indica que, caso as informações do antibiograma sejam obtidas única e exclusivamente de uma amostra de cada padrão genotípico, pode ocorrer o risco de falhas no tratamento desta enfermidade.

Na Tabela 14, observa-se que o pulsotipo 17 apresentou, dentre os 23 padrões de macrorrestrição do crDNA, a maior prevalência entre as estirpes, representando 14,0% dos *S. aureus* com presença de pelo menos um dos genes enterotoxigênicos, seguido pelos padrões 24 e 29, com 12,0% cada. Esta grande variabilidade genética entre estirpes que amplificaram pelo menos um dos tipos de gene foi encontrada também por SRINIVASAN et al. (2006) em estudo realizado com 78 estirpes de *S. aureus* isoladas de leite, com a presença de 15 pulsotipos distintos.

Ainda na Tabela 14, observa-se que o padrão 17 apresentou estirpes isoladas do leite (3), dos óstios (2) e dos insufladores (2). Quanto ao padrão 29, 5 (83,3%) estirpes foram isoladas do leite e somente 1 (16,7%) do óstio. No entanto, não se encontram relatos na literatura científica referentes à comparação de pulsotipos e produção de genes enterotoxigênicos obtidos de *S. aureus* isolados de óstio e insufladores.

Assim sendo, depreende-se que os resultados obtidos, no presente trabalho, evidenciaram a necessidade da implementação de medidas eficazes na higienização dos insufladores durante a ordenha, uma vez que foi constatada a sua participação no mecanismo de transmissão da mastite. E, ainda, a identificação de genes das enterotoxinas estafilocócicas e da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*) evidencia possível risco potencial que o leite, oriundo destes animais, pode representar para a saúde da população consumidora.

7. CONCLUSÕES

7.1. O monitoramento das estirpes de *S. aureus* evidenciou a manutenção e a disseminação clonal de alguns pulsotipos identificados nas amostras de leite, óstios papilares e nos insufladores da ordenhadeira mecânica;

7.2. A variabilidade de pulsotipos dos *S. aureus* estudados evidenciou a ocorrência de heterogeneidade genética das estirpes envolvidas nos casos de mastite bovina;

7.3. A ocorrência de estirpes de *S. aureus* com pulsotipos iguais em uma mesma colheita evidenciou, nas amostras de leite, óstios papilares e insufladores da ordenhadeira mecânica, a relação epidemiológica existente entre as fontes de infecção e vias de transmissão.

7.4. As estirpes de *S. aureus* isoladas dos insufladores da ordenhadeira mecânica e dos óstios papilares apresentaram maior resistência *in vitro* frente aos antimicrobianos, evidenciando a importância da higienização deste equipamento no mecanismo de transmissão da mastite bovina.

7.5. A maior ocorrência de casos de mastite bovina verificada no período pós-parto evidenciou a importância da adoção da antibioticoterapia no período seco como medida de prevenção desta enfermidade.

7.6. A ocorrência do gene *sea* nos *S. aureus* isolados dos casos de mastite, dos óstios papilares e dos insufladores da ordenhadeira mecânica, representa motivo de enorme preocupação, principalmente se considerado o fato de esta enterotoxina ser a mais freqüentemente envolvida em casos de intoxicações alimentares.

7.7. A identificação de genes das enterotoxinas dos tipos A, B, C e D e da toxina da síndrome do choque tóxico nas estirpes de *S. aureus* isoladas dos sítios investigados, evidenciou o risco potencial que o leite contaminado pode representar à Saúde Pública.

7.8. Os resultados obtidos sugerem maiores cuidados durante a desinfecção dos tetos antes e depois da ordenha e, também, dos insufladores da ordenhadeira sob imersão completa em balde com solução clorada.

7.9. A carência de informações evidencia a necessidade da realização de outros trabalhos desta natureza, com a finalidade de trazer subsídios que possam contribuir para o aprimoramento das medidas de prevenção e controle desta enfermidade.

8. REFERÊNCIAS*

AARESTRUP, F. M.; WEGENER, H. C.; ROSDAHL, V. T. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. **Vet. Microbiol.** Amsterdan, v. 45, p. 139-150, 1995.

AGUILAR, B.; ITURRALDE, M. Binding of a surface protein of *Staphylococcus aureus* to cultured ovine mammary gland epithelial cells. **Vet. Microbiol.,** Amsterdan, v. 82, p.165-175, 2001.

AKINEDEN, Ö. et al. Toxin Genes and Other Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Milk of Cows with Mastitis. **Clin. Diagn. Labor. Immunol.**, v. 8, n. 5, p. 959-964, 2001.

AKPAKA, P. E. et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from regional hospitals in Trinidad and Tobago. **Intern. J. of Infec. Diseases,** v. 11, p. 544-548, 2007.

AMORENA, B. et al. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. **J. Antimic. Chemoth.**., v. 44, p. 43-55, 1999.

ARCHER, G. L.; NIEMEYER, D. M. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in staphylococci. **Trends Microbiol.** London, v. 2, n. 10, p. 343-347, October, 1994.

APHA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, D.C., 676 p, 2001.

BARBER, M. Methicillin-resistant staphylococci. **J. Clin. Pathol.**, v. 14, 385-393, 1961.

BARBERIO, A.; GIETL, H.; DALVIT, P. “In vitro” sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. **Rev. Napgama***,* São Paulo, v. 5, n. 1, p. 10, 2002.

BASELGA, R. et al. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity.,** v. 61, p. 4857-4862., 1993.

*NBR 6023 / ABNT 2003

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; TRUCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am. J. Clin. Pathol.**, Hagerstown, v. 45, p. 493-496, 1966.

BELKUM, A. et al. Dissemination of a single clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Turkish hospitals. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 35, n. 4, p. 978-981, 1997.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle,M.P. (ed). **Foodborne bacterial pathogens**. INC, New York, p. 463-523, 1989.

BRAMLEY, A. J., DODD, F. H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control – progress and prospects. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 51, p. 481-512, 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva, SIH/SUS, DATASUS, Brasília, 1998.

BRITO, M. A. V. P. et al. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.,** Rio de Janeiro, v. 18 (1), p. 39-44, jan/mar., 1998.

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da syndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 52, n. 1, p. 7-10, 2000.

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

CIIAGRO. Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas. Portal do Governo do Estado de São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.ciiagro.sp.gov.br/>. Acesso em: 13 jun. 2007.

CIFRIAN, E. et al. Adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured bovine mammary epithelial cells. **J. Dair. Sc.**, v.77, p. 970-983, 1994.

COSTA, E. O. et al. Estudo etiológico da mastite clínica bovina. **Rev. Bras. Med. Vet.,** v. 17, n. 4, p. 156-158, 1995a.

COSTA, E. O. et al. Índices de mastite bovina clínica e subclínica nos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Rev. Bras. Med. Vet.,** v. 17, n. 5, p. 215-217, 1995b.

COSTA, E. O. et al. Mastite subclínica: prejuízos causados e custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Rev. Napgama,** São Paulo, n. 2, p. 16-29, 1999.

COSTA, E. O. et al. Resistência aos antimicrobianos de microorganismos 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.

CUCARELLA, C. et al. Bap a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal Bacteriology.**, v.183, p. 2888-2896, 2001.

CUNHA, M. L. R. S.; CALSOLARI, R. A. O.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 genes in *Staphylococcus,* with emphasis on coagulase-negative Staphylococci. **Microbiol. Immunol.,** Tokyo, v. 51, n. 4, p. 381-390, 2007.

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

DINIZ, M. A. P. R. et al. Tratamento de mastite subclínica e clínica, em vacas lactantes, com ácido acetilsalicílico, mastenzin e associação mastenzin com ácido acetilsalicílico. **A Hora Veterinária,** Porto Alegre, ano 18, n. 104, p. 27-33, 1998.

DOLZANI, L. et al. Typing of *Staphylococcus aureus* by amplification of the 16S-23S rRNA intergenic sequences. **FEMS Microbiol. Lett.** Amsterdam, v. 119, p. 167-174, 1994.

ELVINGER, F.; NATZKE, R. Elements of Mastitis Control. In: VAN HORN, H. H.; WILCOX, C. J. **Large dairy management.** Champaign: American Dairy Science Association, p. 440-447, 1992.

EVENSON, M.L.; HINDS, M. W.; BERNSTEIN, R.S. et al. Estimation of human dose of Staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **Intern. J. of Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 7, p. 311-316, 1988.

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

FERENS, et al. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxin C. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 573-580, 1998.

FERREIRA, L. M. et al. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Rev. Ciência Rural**. Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1228-1234, jul-ago, 2006.

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

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

FOX, K. L.; ZADOKS, N. R.; GASKINS, T.C. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Vet. Microbiol.**, Amsterdan, v. 107, p. 295-299, 2005.

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

FREITAS, M.F.L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. **Arq. Instit. Biológ.**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.

GARCIA, M. L. et al. Characterization of staphylococci isolated form mastitis cows in Spain. **Appl. Microbiol.**, v. 39, p. 584-553, 1980.

GILETTO, A.; FYFFE, J.G. A novel ELISA format for the rapid and sensitive detection of *Staphylococcal* enterotoxin A. **Biosc. Biotech. and Bioch.**, Bunkyo-ku, v. 62, n. 11, p. 2217-2222, 1998.

GOH, S. et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphism. **J. Clin. Microbiol.** Washington, v. 30, p. 1642-1645, 1992.

HARMON, R. J. et al. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. **National Mastitis Council**, Arlington. 34p., 1990.

HOIBY, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. **Microbes Infection**., v.3, p. 23–35, 2001.

HOLMBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. **Acta Vet. Scand.**, v. 45, p.1-144, 1973 (Supplement).

HOLT, J. G. et al. Gram-positive cocci. In: BERBEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, p. 544-551, 1994.

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

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

ICHIKAWA, M., ICHIKAWA, T., MIZOMOTO, T. Productivity of enterotoxins and toxic shock syndome toxin-1, and coagulase type of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovines and humans in the same district. **Anim. Sci. Technol.**, v. 67, p. 780-786, 1996.

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

INGAWA, K.; ADKINSON, R.; GOUGH, R. Evaluation of gel teat cleaning and sanitizing compound status of the goat udder. **J. Dairy Res.**, Cambridge, v. 59, p. 21-28, 1992.

JARRAUD, S. et al. Involvement of Enterotoxins G and I in Staphylococcal Toxic Shock Syndrome and Staphylococcal Scarlet Fever. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 8, p. 2446-2449, 1999.

JOHNSON, W. M. et al. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 29, n. 3, p. 426-430, 1991.

JONES, T.O.; WIENEKE, A.A. Staphylococcal toxic shock syndrome. **Vet. Rec.**, v. 119, p. 435, 1986.

KAPUR, V. et al. Molecular population genetic análisis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **J. Clin. Microbiol.** Washington, v. 33, p. 376-380, 1995.

KENNY, K. et al. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 31, n. 3, p. 706-707, 1993.

KERR, D. E. et al. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. **Nature Biotech.,** v. 19, Jan. 2001.

KLOOS, W.; JORGENSEN, J. Staphylococci. In: BALOWS, A. et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology.** 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, p. 143-153, 1985.

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

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

LARSEN, A. R. et al. Epidemiology of European Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 80 Type IV Strains Isolated in Denmark from 1993 to 2004. **J. Clin. Microbiol,** Washington, v. 46, n. 1, Jan. 2008.

LIM, S.K.; JOO, Y.; MOON, J. et al. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 66, n. 5, p. 581-584, 2004.

LOWY, D. F. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus.* **J. Clin. Invest.**¸ New York, v. 111, p. 1265-1273, 2003.

MacFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**., Baltimore, Md, 21208, USA, 1976.

MANRIQUE, E. I.; GALVÃO, L. L. Racionalização e controle de antimicrobianos. In: RODRIGUES, E. A. C.; MENDONÇAS, J. S.; AMARANTE, J. M. B. (Eds). **Infecções Hospitalares:** prevenção e controle. São Paulo: Sarvier, p. 117-130, 1997.

MARTINEAU, F. et al. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.,** v. 36, p. 618-623, 1998.

MASLOW, J.; MULLIGAN, M. E. Epidemiologic Typing Systems. **Infec. Control and Hosp. Epidem.,** v. 17, n. 9, p. 595-604, 1996.

MATSUNAGA, T., KAMATA, S., KIKIICHI, N. et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **J. Med. Sci.***,* v. 55, p. 297-300, 1993.

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

McDOUGAL, L. K. et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing of Oxacilin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from the United: Establishing a National Database. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 41, n. 11, p. 5113-5120, 2003.

MCLAUCHLIN, J.; NARAYANAN,G.L.; MITHANI, V. et al. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **J. Food Protection**, Des Moines, v. 63, p. 479-488, 2000.

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

MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**., *7*. ed. Washington D.C.: ASM Press, 1999. 1773p.

MURRAY, P.R. et al. **Microbiologia Médica**. 3º Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, 513p.

MYLLYS, V. et al. Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. **Vet. Microbiol.,** Amsterdam, v. 51, p. 245-251, 1997.

NADER FILHO, A. et al. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arq. Ins. Biol.,** São Paulo, v. 74, n. 1, p. 1-4, jan-mar, 2007.

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

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORIAL STANDARDS (NCCLS) 2005. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement**, v. 25, n.1, M100-S14.

NICOLA, F. et al. Comparison of several methods to determine resistance-methicillin in *Staphylococcus aureus* with focus on borderline strains. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 36, p. 91-93, 2000.

OLDHAM, E. R.; DALEY, M. J. Use of recombinant bactericidal enzyme as a mastitis therapeutic. **J. Dairy Sci.,** v. 74, n. 12, p. 4175-4182, 1991.

OLIVEIRA, R. P. **Epidemiologia Molecular da Mastite Bovina causada por *Staphylococcus aureus*.** Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; SHIMODA, Y. et al. Detection of *seg*, *seh* and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg, seh* ou *sei* genes. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, n.3, p. 857-862, 2002.

OSTERAS, O. Mastitis epidemiology practical approaches and applications. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 24, 2006, Nice. **Proceedings.** Nice, France: 2006.

PRESCOTT, J. F. Beta-lactam Antibiotcs: Cephalosporins and Cephamycins. In: GIGUÈRE, S. et al. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.** Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006. P. 139-144.

RAPINI, L.S. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arq. Bras. Med. Vet. e Zoot.**, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.

REIS, G. L. et al. Efeito do tipo de ordenha sobre a saúde do úbere e a qualidade do leite. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. Editora FEP MVZ, v. 48, p. 6-13, setembro, 2005.

ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M.S. Detecting the enterotogenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Appl.Microbiol.**, v. 28, p. 946-50, 1974.

ROBERSON, J. R. et al. Ecology of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on dairy farms. **J. Dairy Sci.** Savoy, v. 77, p. 3354-3364, 1994.

ROBERSON, J. R. et al. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. **J. Dairy Sci.**, v. 81 (3), p. 687-693, 1998.

ROBERSON, J. R.; WILLIAMS, E. I. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy heifers. In: annual convention American association of bovine 27. 1994, Pittsburgh. **Proceedings.** Pittsburgh: 1995.

SALASIA, S. I. O. et al. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse en Germany. **J. Vet. Sci.**, Korea, v. 5, n. 2, p. 103-109, 2004.

SANTOS, F. G. B. et al. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Rev. Napgama,** São Paulo, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Manejo de ordenha visando o controle de mastite e a melhoria da qualidade do leite. In: ESTRATÉGIAS PARA CONTROLE DE MASTITE E MELHORIA DA QUALIDADE DO LEITE. 1ª ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2007. p.78-94.

SEARS, P.; GONZÁLEZ, R.; WILSON, D.; HAN, H. Procedures for mastitis diagnosis and control. In: HUNT, E.; ANDERSON, K. L. **The veterinary clinics of North America: food animal practice.** Philadelphia: W. B. Saunders, p. 445-468, 1993.

SCHALM, O. W., CARROL, E. J., JAIN, N. C. **Bov. Mast.**. Philadelphia, Lea & Febiger, 360 p, 1971.

SCHALM, O. W., NOORLANDER, D. D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J. Am. Vet. Res.**, v. 130, n. 5, p.199-204, 1957.

SCHERRER, D., S. et al. Phenotypic and genotypic characteristic of *Staphylococcus aureus* isolated from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Vet. Microbiol.,** v. 101, p. 101–107, 2004.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 67-75, may, 1984.

SILVA, F. G. P. L. et al. Pesquisa da etiologia de mastite subclínica bovina em propriedades leiteiras da região do Vale do Paraíba e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. 4º CICAM. **Biológico,** São Paulo, v. 68, n. 1/2, p. 25-82, jan./dez., 2006.

SILVA JR. E.A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. São Paulo: Varela, 1997, 385p.

SMITH, K.; HOGAN, J. Environmental Mastitis. In: HUNT, E.; ANDERSON, K. L. **The veterinary clinics of North America: food animal practice.** Philadelphia: W. B. Saunders, p. 489-498, 1993.

SOMMERHÄUSER, J. et al. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. **Vet. Microbiol.,** v. 96, p. 91-102, 2003.

SRINIVASAN, V. et al. Prevalence of enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin Genes in *Staphylococcus aureus* Isolated from Milk of Cows with Mastitis. **Foodborne Pathog. Dis.,** v. 3, n. 3, p. 274-283, 2006.

STEHLING, R.N. et al. Estudo da evolução da mamite caprina induzida por enterotoxina estafilocócica e estreptocócica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 38, p. 701-717, 1986.

TAKEUCHI, S., ISHIGURO, K., IKEGAMI, M. et al. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. **Vet. Microbiol.***,* v. 59, p. 251-258, 1998.

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

TENOVER, F. C. et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus.* **J. Microbiol.**, Washington, v. 32, p. 407, 1994.

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

VANNUFFEL, P. et al. Specific detection of methicillin-resistance *Staphylococcus* species by multiples PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, p. 2864-2867, 1995.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Vet. Microbiol.**, v. 92, p.179-185, 2003.

WAITTIAUX, M. A. Lactancia e ordeno. 1996. Disponível em: <http://babcock.cals.wisc.edu/des/lacS/lac5/mastitis.html#Heading2>. Acesso em: 18 nov. 2007.

WALL, R. J. et al. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. **Nature Biotech.,** v. 23, n. 4, april, 2005.

WUERTZ, S.; OKABE, S.; HAUSNER, M. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. **Water Science Technology**., v.49, p. 327–336, 2004.

ZADOKS, R. Application of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Binary Typing as Tools in Veterinary Clinical Microbiology and Molecular Epidemiologic Analysis of Bovine and Human *Staphylococcus aureus* Isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 5, p. 1931-1939, may, 2000.

ZADOKS, R. et al . Comparision of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed field gel electrophoresis, and binary typing. **J. Clin. Microbiol**., v. 40, p. 3894-3902, 2002.

ZSCHÖCK, M. et al. Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. **Intern. Dairy J.,** v. 10, n. 8, p. 569-574, 2000.

ZSCHÖCK, M.; RIBE, K.; SOMMERHÄUSER, J. Ocurrence and clonal relatedness of *sec*/*tst* gene positive *Staphylococcus aureus* isolated of quartermilk samples of cows suffering from mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, United Kingdon, v. 38, p. 493-498, 2004.