

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA, PESQUISA DE GENE
mecA DE RESISTÊNCIA À METICILINA E DETECÇÃO
MOLECULAR DE GENES CODIFICADORES DE
ENTEROTOXINAS, EM ESPÉCIES DE ESTAFILOCOCOS
COAGULASE POSITIVA E NEGATIVA, ISOLADOS DE MASTITES
BOVINAS

FELIPE DE FREITAS GUIMARÃES

Botucatu-SP
Junho/2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PERFIL DE SENSIBILIDADE MICROBIANA, PESQUISA DE GENE
mecA DE RESISTÊNCIA À METICILINA E DETECÇÃO
MOLECULAR DE GENES CODIFICADORES DE
ENTEROTOXINAS, EM ESPÉCIES DE ESTAFILOCOCOS
COAGULASE POSITIVA E NEGATIVA, ISOLADOS DE MASTITES
BOVINAS

FELIPE DE FREITAS GUIMARÃES

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

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni

Botucatu/SP

Junho/2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Guimarães, Felipe de Freitas.

Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene *mecA* de resistência à meticilina e detecção molecular de genes codificadores de enterotoxinas, em estafilococos coagulase positiva e negativa, isoladas de mastites bovinas / Felipe de Freitas Guimarães. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Helio Langoni

Capes: 50502034

1. Estafilococos. 2. Reação em cadeia de polimerase. 3. Bovino de leite.

Palavras-chave: Enterotoxinas; Espécies de SCN e SCP; Mastite bovina; *mecA*; PCR; Saúde Pública.

Felipe de Freitas Guimarães. Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene *mecA* de resistência à meticilina e detecção molecular de genes codificadores de enterotoxinas, em espécies de estafilococos coagulase positiva e negativa, isoladas de mastites bovinas. Defesa: 27/06/2011. Local: FMVZ/UNESP – Campus de Botucatu/SP.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Helio Langoni

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Adjunto Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Membro Titular

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Associado Dr. Nilson Benites

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP – São Paulo/SP

Prof. Adjunto Dr. Paulo Francisco Domingues

Membro Suplente

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Associado Dr. Marcos Veiga dos Santos

Membro Suplente

Departamento de Nutrição e Produção Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP - Pirassununga/SP

DEDICATÓRIA

A Deus

Por tudo que ele me proporciona

à Família

À minha mãe Elizabeth Oliveira da Costa Freitas Guimarães, a pessoa mais importante da minha vida, sempre estará comigo incentivando, ajudando, torcendo a cada conquista.

Ao meu pai Antônio Eduardo Alencar de Freitas Guimarães (in memorian), que está sempre comigo.

Aos meus avós Nadyr da Costa e Elizabeth Oliveira da Costa (in memorian) são dois grandes exemplos que tive em minha vida, por todo amor, alegria e dedicação em minha criação.

Aos meus padrinhos João Luiz Corso e Ruth Maria Campos Moraes Corso, são meus pais também e muito contribuem em minha vida.

A todas essas pessoas fazem parte da minha vida e me guiaram até aqui

Por elas tento ser uma pessoa melhor, pois tenho muito a me espelhar

À minha namorada Luísa Martelli Soares, estamos crescendo juntos um dia de cada vez.

Aos meus filhos Boomer, Chico, Farofa, Maiada, Rabuja, Totti e Selminha (in memorian) por toda alegria e companheirismo que me proporcionam, com eles não tem há tempo ruim!

AGRADECIMENTOS

Meus Familiares, Zuquinha, tio Beto e tia Maria, Víctor Hugo(in memorian), Tio Chico(in memorian) e tia Mariazinha, Tita, Patrícia, Cristiano, Helton, Celinha, Arnaldo, Ana Regina, Zé Paulo, Pedrinho muito obrigado por todo carinho.

Meus amigos Danilo Bononi, Gabriel Pedroso e Lucas Pedroso, verdadeiros irmãos, estamos cada vez mais distantes geograficamente, mas sempre que nos vemos segura a bagunça...

Meus amigos da Vet Unisa Mau, Guara, Cris, Dudu, Digo, estou em falta com eles, mas eles compreendem.

Minhas amigas Milena e Melina, Lara, Michelle, Carol, saudades de vocês.

Meu amigo, eterno R1 e parceiro de república Felipe Fornazari, tornou-se um grande amigo para todas as horas.

Ao colega e amigo Diego Borin pela ajuda nas coletas, processamento das amostras.

As amigas Virgínia e Pâmela obrigado por toda ajuda e ensinamentos referentes à Biologia Molecular

À Patrícia Faccioli por sua ajuda na realização dos bioquímicos.

Minha turma de Botucatu, que me acolheu logo que cheguei aqui, Juliana, Selene, Veridiana(Skond), Luana(pelãoço), Muriel(Gina), Mariana(Zaca), Osvaldo(Netão), Fabiano(Ritchie), Gustavo, Janaina, Luciana, Vitória, Marcela (Ber), João Marcelo, Marcel, Ana.

Minhas amigas e colegas de residência Dulce e Leila por todo apoio em todos esses anos.

Aos meus amigos de pós-graduação e residentes, Rodrigo, Amanda, Tatiana, Gustavo(gusga), Marcella, Carla(estribo) Mariana, Raissa, Diego Generoso.

AO meu orientador e amigo Prof. Helio Langoni por ter me acolhido e me ensinado muito e à sua esposa Cidinha Langoni que sempre me tratou com muito carinho todos esses anos.

À Minha Professora querida, Acácia Orieth Elias, graças a ela acabei vindo para cá, muito obrigado pelos ensinamentos e oportunidades.

À Professora Maria de Lourdes Ribeiro de Souza Cunha por toda ajuda tanto na elaboração do projeto como na parte prática cedendo amostras controle e tirando dúvidas.

A todos os professores do DHVSP muito obrigada. Principalmente aos professores Antônio Carlos Paes, Jane Megid, Marcio Garcia Ribeiro pelos ensinamentos e principalmente por todo cuidado e atenção que proporcionaram ao meu filhote Boomer quando esteve internado. E Prof. Paulo Francisco Domingues que muito contribuiu em minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP), principalmente ao técnico do laboratório de Zoonoses, Benedito D. Menozzi e Diego (Mogli) pela grande ajuda nas coletas, que não foram poucas.

À Fapesp pela concessão da bolsa de mestrado (2008/08780-7) e de auxílio pesquisa (2008/11614-1).

Lista de Tabelas

	Páginas
Tabela 1. Resumo das principais características de produção, rebanho bovino e instalações das dez fazendas estudadas. Botucatu, SP, 2011.....	25
Tabela 2. Resumo das principais características de manejo de ordenha de vacas em dez fazendas estudadas. Botucatu, SP, 2011.....	26
Tabela 3. Ocorrência de mastite bovina em dez fazendas de cinco regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	34
Tabela 4. Mastite clínica e subclínica bovina em dez propriedades leiteiras de cinco regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	34
Tabela 5. Frequência dos principais agentes etiológicos de mastite bovina em propriedades leiteiras do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	35
Tabela 6. Isolamentos de espécies de SCN das amostras de leite de casos de mastite bovina diagnosticados em dez fazendas estudadas em cinco regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	36
Tabela 7. Isolamentos de espécies de SCP das amostras de leite de casos de mastite bovina diagnosticados em dez fazendas estudadas em cinco regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	37
Tabela 8. Intensidade do processo inflamatório em relação à CCS em 263 casos de mastite bovina por micro-organismos do gênero <i>Staphylococcus</i> avaliados em 10 (dez) fazendas leiteiras do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	38

Tabela 9. Intensidade do processo inflamatório em CCS em relação à intensidade da infecção quanto ao número de colônias (ufc) de SCN e SCP isoladas de amostras de leite de 263 casos de mastite bovina por micro-organismos do gênero <i>Staphylococcus</i> (SCN=128 e SCP= 135), de 10 (dez) fazendas leiteiras do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	38
Tabela 10. Contagem de células somáticas de amostras de leite de glândulas mamárias bovinas infectadas por espécies de SCN das dez propriedades leiteiras de diferentes de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	39
Tabela 11. Contagem de células somáticas de amostras de leite de glândulas mamárias bovinas infectadas por espécies de SCP das dez propriedades leiteiras de diferentes de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	40
Tabela 12. Frequência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas em isolados de SCP e SCN isolados de casos de mastite em bovinos em propriedade leiteiras do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	41
Tabela 13. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em espécies de SCN e SCP isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	42
Tabela 14. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em linhagens de <i>S. warneri</i> e <i>S. aureus</i> isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	42
Tabela 15. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em linhagens de <i>S. epidermidis</i> e <i>S. aureus</i> isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	42

Tabela 16. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em linhagens de <i>S. hyicus</i> e <i>S. aureus</i> isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	43
Tabela 17. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em linhagens de SCN: <i>S. warneri</i> e <i>S. epidermidis</i> , isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	43
Tabela 18. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em linhagens de SCN: <i>S. warneri</i> e <i>S. hyicus</i> isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	43
Tabela 19. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em linhagens de SCP: isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	44
Tabela 20. Frequência dos tipos de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas nos principais espécies SCN isolados de casos de mastite em bovinos em propriedade leiteiras do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	45
Tabela 21. Frequência dos tipos de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas nos principais espécies SCP isolados de casos de mastite em bovinos em propriedade leiteiras do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	45
Tabela 22. Resistência à metilina e <i>mecA</i> em 263 linhagens do gênero <i>Staphylococcus</i> isolados de mastite bovina em dez fazendas do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	47

Tabela 23. Gene <i>mecA</i> e resistência à metilina em 263 linhagens do gênero <i>Staphylococcus</i> isolados de mastite bovina. Botucatu, SP, 2011.....	48
Tabela 24. Presença de <i>mecA</i> e resistência à metilina em espécies de SCN isolados das amostras de leite de glândulas mamárias bovinas infectadas das dez propriedades leiteiras de diferentes de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	49
Tabela 25. Presença de <i>mecA</i> e resistência à metilina em espécies de SCP isolados das amostras de leite de glândulas mamárias infectadas das dez propriedades leiteiras de diferentes de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	50
Tabela 26. Resistência aos antimicrobianos em 128 SCN isolados de casos de mastite bovina em dez fazendas do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	51
Tabela 27. Resistência aos antimicrobianos em 135 SCP isolados de casos de mastite bovina em dez fazendas do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	52
Tabela 28. Multirresistência aos antimicrobianos em 128 SCN isolados casos de mastite bovina. Botucatu, SP, 2011.....	55
Tabela 29. Multirresistência aos antimicrobianos em 135 SCP isolados casos de mastite bovina. Botucatu, 2011.....	55
Tabela 30. Principais perfis de resistência microbiana “in vitro” e <i>mecA</i> de 19 <i>S. epidermidis</i> isolados de casos de mastite. Botucatu, SP, 2011.....	56
Tabela 31. Principais perfis de resistência microbiana “in vitro” e <i>mecA</i> de 11 <i>S. hyicus</i> isolados de casos de mastite. Botucatu, SP, 2011.....	57
Tabela 32. Principais perfis de resistência microbiana “in vitro” e <i>mecA</i> 40 <i>S. warneri</i> isolados de casos de mastite. Botucatu, SP, 2011.....	57

Tabela 33. Principais perfis de resistência microbiana “in vitro” e mecA de 90 <i>S. aureus</i> isolados de casos de mastite. Botucatu, SP, 2011.....	58
---	----

Lista de Figuras

	Paginas
Figura 1. Sequência das bases, localização dentro dos genes e tamanhos previstos dos produtos amplificados pelos primers oligonucleotídeos toxina-específicos utilizados na reação de PCR para detecção de genes <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> , codificadores de enterotoxinas.....	30
Figura 2. Contagem de células somáticas em amostras de leite de glândulas mamárias bovinas infectadas por espécies de SCN de dez propriedades leiteiras de diferentes regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	39
Figura 3. Contagem de células somáticas em amostras de leite de glândulas mamárias bovinas infectadas por espécies de SCP de dez propriedades leiteiras de diferentes regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	40
Figura 4. Resistência aos antimicrobianos em 128 SCN isolados de casos de mastite bovina em dez fazendas do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	53
Figura 5. Resistência aos antimicrobianos em 135 SCP isolados de casos de mastite bovina em dez fazendas do estado de São Paulo. Botucatu 2011.....	54
Figura 6. Perfis de resistência microbiana e <i>mecA</i> de isolados de SCN de casos de mastite de 10 fazendas de cinco regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.....	58
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 2%. Limiar de detecção do gene <i>mecA</i> em linhagens de SCN e SCP; controle positivo (<i>S. aureus</i> ATCC 33591); controle negativo (água); 100bp DNA ladder.....	59
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 2%. Limiar de detecção do gene codificador da enterotoxina B - <i>seb</i> em linhagens de SCN e SCP; controle positivo (<i>S. aureus</i> ATCC 14458); controle negativo (água); 100bp DNA ladder.....	59

Lista de Quadros

	Paginas
Quadro 1. Incubação em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf).....	31

Lista de abreviaturas

PIB	Produto Interno Bruto
ELISA	ensaio imuno enzimático
RPLA	aglutinação passiva reserva em látex
PBP's	proteínas ligadoras de penicilina
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCR	reação em cadeia pela polimerase
DNA	ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
TSST-1	Toxina 1 da Síndrome do Choque tóxico
SE	Enterotoxina Estafilocócica
IN 51	Instrução Normativa nº51
PNMQL	Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite
CCS	Contagem de Células Somáticas
CBT	Contagem Bacteriana Total
SCP	estafilococos coagulase positiva
SCN	estafilococos coagulase negativa
UFC	unidades formadoras de colônias
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

Sumário

1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Produção Leiteira	5
2.2. Contagem de Células Somáticas (CCS)	6
2.3. Mastite	7
2.4. Etiologia microbiana das mastites	8
2.5. Gênero <i>Staphylococcus</i>	11
2.5.1. SCP	11
2.5.2. SCN	13
2.6. Aspectos de Saúde Pública	14
2.6.1. Enterotoxinas	14
2.6.2. Infecções Nosocomiais	18
2.6.3. Resistência aos antimicrobianos	19
3. OBJETIVOS	22
3.1 Geral	22
3.2 Específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Propriedades rurais	24
4.2. Diagnóstico do Processo Inflamatório:	27
4.3. Coleta do leite dos animais	27
4.4. Cultivos microbiológicos	27
4.5. Perfil de sensibilidade antimicrobiana	28
4.6. Identificação de SCN e SCP	28
4.7. Extração do DNA de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados do leite de casos de mastite bovina	29
4.8. <i>Primers</i> utilizados na detecção dos genes codificadores das enterotoxinas	30
4.9. Visualização dos produtos amplificados	31
4.10. Detecção do gene <i>mecA</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> e SCN	32
4.10.1. Extração do Ácido Nucléico	32
4.10.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR)	32
4.11. Análises estatísticas	32
5. RESULTADOS	34
5.1. Mastite	34
5.2. Etiologia	35
5.3. CCS	38
5.3.1. CCS e espécies SCN	39
5.4. Enterotoxinas	41
5.5. Resistência aos antimicrobianos	46
5.5.1. Gene <i>mecA</i> e resistência à metilina	46
5.5.2. Resistência geral aos antimicrobianos	50
5.5.3. Perfis de resistência aos antimicrobianos	56
6. DISCUSSÃO	61
6.1. Mastite	61
6.2. Etiologia	62
6.2.1. SCN	63

6. 3. CCS.....	65
6.3.1. CCS e espécies SCN	67
6.4. Enterotoxinas	69
6.5. Resistência aos antimicrobianos.....	72
6.5.1. Gene mecA e resistência à meticilina.....	74
6.5.2. Resistência geral aos antimicrobianos	75
6.5.3. Perfis de resistência a antimicrobianos	77
7. Conclusões	82
8. Bibliografia	85
9. Trabalho Científico	105

GUIMARÃES, F.F. Perfil de sensibilidade microbiana, pesquisa de gene *mecA* de resistência à meticilina e detecção molecular de genes codificadores de enterotoxinas, em estafilococos coagulase positiva e negativa, isolados de mastites bovinas. Botucatu, 2011. 147p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

RESUMO

Alguns dos agentes patogênicos de mastite bovina são relevantes em relação à qualidade do leite, bem como, para a saúde pública. Foram estudadas dez fazendas localizadas em cinco regiões do estado de São Paulo. Foram examinadas 1.148 vacas, correspondentes a 4.592 glândulas mamárias avaliadas pelos testes de tamis e CMT. Foram colhidas 1.318 amostras de leite, das vacas positivas na triagem para avaliação microbiológica e contagem de células somáticas (CCS). A frequência dos agentes variou de 0,3 a 36,4%. Do total de isolados de *Staphylococcus* spp (36,4%), 48,7% corresponderam a estafilococos coagulase negativa (SCN), 34,2% *S. aureus* e 15,9% outros estafilococos coagulase positiva (SCP). *Streptococcus* spp foram isolados de 23,3% das amostras, dos quais 41,7% *Streptococcus. agalactiae*, 41,1% *Streptococcus dysgalactiae* e 17,3% *Streptococcus uberis*. *Corynebacterium* spp. foram isolados em 31,8% dos casos de mastite. As amostras de leite das glândulas mamárias infectadas apresentaram CCS significativamente mais elevada que as negativas. Dos 48,7% de SCN foram identificadas 18 espécies: *S. warneri*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. auriculares*, *S. cohnii subsp cohnii*, *S. lugdunensis*, *S. pasteurii*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus subsp bovis*, *S. schleiferi subsp scheleiferi*, *S. simulans*, *S. saccharolyticus*, *S. capitis*, *S. saprophyticus subsp saprophyticus*, *S. sciuri subsp sciuri* e *S. chromogenes*. As fazendas, II (27,3%) e III (26,7%) apresentaram maior frequência de SCN, enquanto as fazendas I (13,3%) e X (44,4%) revelaram maior prevalência de SCP sendo as diferenças significantes. Foram avaliados por PCR 263 estafilococos para detecção de gene codificadores das enterotoxinas clássicas. Entre os SCN foram detectados: *sea* (35,5%) *seb* (7,1%), *sec* (6,5%), *sed* (1,8%) e associações destes genes. Em SCP foram detectados: *sea* (9,5%) *seb* (4,4%), *sec* (5,0%) e *sed* (1,9%). A porcentagem de genes codificadores de enterotoxinas detectada em SCN (66,4%) foi superior à detectada em SCP

(34,8%). Ao se comparar a potencial capacidade de produção de enterotoxinas, entre as principais espécies de SCN com *S. aureus* verificou-se, que as espécies de SCN apresentaram genes codificadores em quantidade superior aos isolados de *S. aureus*. As espécies com maior potencial enterotoxigênico foram: *S. hyicus* (81,3%), *S. warneri* (70%), *S. epidermidis* (63,1%) entre os SCN e *S. aureus* (32,2%) e *S. hyicus* (47,4%) entre SCP. Avaliou-se por PCR o gene *mecA*, codificador da resistência à meticilina em espécies de SCN e SCP. A maior porcentagem de isolados *mecA* positivos entre os SCN foi detectada em *S. hyicus* (56,3%), *S. epidermidis* (31,6 %) e *S. warneri* (32,5 %). Entre os SCP detectou-se *mecA* em 45,6% de *S. aureus*, em 42,1% de *S. hyicus* e em 38,2 % de *S. intermedius*. As mais altas taxas de resistências observadas foram à oxacilina, penicilina e ampicilina. Nenhuma das 128 amostras de SCN apresentou resistência à enrofloxacin, cefoxitina ou cefalotina. Os isolados de *S. aureus* mostraram resistência principalmente à oxacilina, penicilina, ampicilina. Não foi detectada resistência à gentamicina e fluorquinolonas. Deve-se ressaltar a alta ocorrência de SCN isoladas de mastite e a elevada CCS nas amostras de leite dos casos por SCN. Várias espécies apresentaram médias maiores e/ou próximas a 10^6 células somáticas/mL de leite (*S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. warneri*, *S. sciuri* subsp. *sciuri*). A CCS de amostras de leite de mastite por SCP foram maiores nas infecções por *S. intermedius* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. Foram analisados perfis de resistência e *mecA* entre espécies de SCN. *S. epidermidis*, o principal agente das infecções nosocomiais, apresentou nove perfis, sendo preocupante o isolado com perfil KK, isto é, *mecA* positivo e resistência à tetraciclina, à ciprofloxacina, gentamicina, ampicilina, penicilina e vancomicina. A presença de genes codificadores de enterotoxinas, fatores de virulência e de resistência aos antimicrobianos, foi mais elevada em SCN que em *S. aureus*. Os resultados do estudo demonstraram a importância de SCN não só como agentes etiológicos de mastite, mas por representar um sério risco à saúde do consumidor de leite e produtos lácteos.

Palavras-chave: espécies de SCN e SCP, mastite bovina, PCR, *mecA*, genes codificadores de enterotoxinas, Saúde Pública

GUIMARÃES, F.F. Microbial susceptibility profile, search for *mecA* gene of methicillin resistance and molecular detection and genes encoding enterotoxins in staphylococcus coagulase positive and negative, isolated from bovine mastitis Botucatu, 2011. 147p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, São Paulo.

ABSTRACT

The purpose of this study was to assess the occurrence of mastitis cases in ten Brazilian dairy herds located in five regions in São Paulo state, to characterize the main etiological agents and, to proceed staphylococcal isolates identification to species level, to perform detection by PCR assays of enterotoxin encoded genes aiming the awareness of their potential capability in producing the classical enterotoxins and, *mecA* a methicillin resistance gene and, evaluated resistance toward antimicrobials. A total of 4,592 mammary glands of 1,148 dairy cows were examined by strip cup and CMT. From these 1,318 milk samples were collected for microbiological exams. It was isolated 263 (19.9%) staphylococci from mastitis cases and they were identified, as being: *S. aureus* (34.2%), other CPS (15.9%) respectively, *S. intermedius* (15.2%), *S. hyicus* (12.9%) and, *S. schleiferi subsp coagulans* (3.8%), and CNS (48.7%). Among these 128 CNS isolates eighteen species were identified: *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. auriculares*; *S. cohnii subsp cohnii*, *S. lugdunensis*, *S. pasteurii*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus subsp bovis*, *S. schleiferi subsp scheleiferi*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. saprophyticus subsp saprophyticus*, *S. sciuri subsp sciuri* and, *S. chromogenes*. The more frequently isolated species were: *S. warneri* (31.3%), *S. epidermidis* (14.8%) and *S. hyicus* (12.5%). The milk samples from infected mammary glands showed higher CCS than the negatives. PCR assay was used to determine the presence of classical enterotoxin codifying genes (*sea*, *seb*, *sec* and *sed*). Among CNS the occurrence of enterotoxin classical genes was determined as: 35.1% for *sea*, 7.1% for *seb*, 6.5% for *sec*, 1.8% for *sed*) 5.3% for both *sea* and *seb*, 3.6% for both *sea*, *sec* and *sed*, 1.8% for both *sec* and *sed*. Whereas among CPS isolates the occurrence of enterotoxin genes was: 9.5% for *sea*, 4.4% for *seb*, 5.0% for *sec*, 1.9% for *sed*; for both *sea* and *seb* 1.3%, 1.3% for both *sea*, *sec* and *sed*, 4.4 % for both *sec* and *sed*, 0.6% for both *sea* and *seb*. The highest enterotoxigenic potential were found in: *S. hyicus*, 81.3% of the isolates were positive for enterotoxin codifying genes, 70%

of *S. warneri* isolates and, 63.1% of *S. epidermidis*. In parallel, only 32.2% of *S. aureus* isolates were positive for enterotoxin codifying genes. PCR assay was used to verified the presence of *mecA* methicillin codifying genes. It was detected *mecA* in 38% strains 263 staphylococci isolates. Among the 90 *S. aureus*, 45.6% isolates showed *mecA* gene, and 27.8 %. Among the CNS 32% presented gene *mec A* and, 25% were methillicin resistance. *S. hyicus* (56,3%) showed the highest percentage of *mecA* positivity, *S. epidermidis* presented 31.6 % of *mecA* positivity and, 32.5 % of *S. warneri*. On the other hand, among the CPS, 45.6% of *S.aureus* isolates presented *mecA*, 42.1% of *S. hyicus* isolates and, 38.2 % of *S. intermedius*. The antimicrobial resistance was detected by *in vitro* susceptibility diffusion test with the main antimicrobials used in bovine mastitis therapy, as well to some used in human staphylococci infection therapy. The highest resistances were registered toward oxacillin, penicillin and ampicillin, and the lowest were toward ciprofloxacin, cotrimozaxolle e vancomycin. None of the 128 CNS isolates showed resistance to enrofloxacin, cephoxtin, cephalotin. Among the 90 *S. aureus* isolates the highest resistances were registered toward oxacillin, penicillin and ampicillin, and the lowest were toward gentamicin and quinolones. It is important to refer the high SCC detected on milk samples of CNS mastitis cases, since milk samples of several CNS species mastitis cases presented SCC near or higher than 10^6 cells/mL of milk (*S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. schleiferi* subesp. *schleiferi*, *S. warneri*, *S. sciuri* subsp *sciuri*). The profile of resistance and *mecA* were analyzed among the CNS species. It was a serious cause of concern, that *S.epidermidis*, considered internationally as one of the main staphylococci isolated from nosocomial infections, showed nine profiles and, one isolated showed KK profile, characterized to be *mecA* and resistant to tetracyclin, ciprofloxacin, gentamicin, ampicillin, penicillin and to vancomycin. The last antimicrobial was the first choice to be used in serious cases of methicillin staphylococcal nosocomial infections. The obtained results highlight the relevance of the CNS, that was not restrict to the etiology of bovine mastitis as emergent pathogens but, mainly pointed out toward their high potentiality in being a real hazard to public health.

Key words: species of CNS and CPS , bovine mastitis, PCR, *mecA*, encode enterotoxins genes, Public Health

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento perfeito. Apresenta composição rica em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais essenciais à saúde dos humanos. O consumo do leite é importante para o ser humano de todas as idades, especialmente para crianças e idosos. Portanto, a qualidade do produto é fundamental, não só para atingir seu pleno valor nutricional, como para preservar a saúde do consumidor (COSTA, 2005).

Além da importância nutricional, deve-se ressaltar que o leite é o sexto produto do agronegócio brasileiro (superando o café e arroz), cada R\$ 1,00 investido na produção leiteira resulta em R\$ 5,00 a mais no PIB (Produto Interno Bruto) do país. Esse segmento do agronegócio tem grande importância social e é responsável por mais de três milhões e seiscentos mil empregos diretos. Em 2007 foram produzidos 26.134 bilhões de litros, dos quais cerca de 18 bilhões sob inspeção. O Brasil exportou no período 3% de sua produção leiteira, equivalente a 716 milhões de litros (EMBRAPA, 2008).

A mastite é uma enfermidade complexa de múltipla etiologia (Langoni et al. 1998), e impacta negativamente a pecuária leiteira, tanto pelos prejuízos econômicos, como pela redução na produção e comprometimento da qualidade do leite, mas também pelo grave problema de Saúde Pública, em virtude do potencial de transmissão de patógenos e riscos de toxi-infecções alimentares (COSTA et al., 2000a, SÁ et al., 2004).

Estimativas em vários países calculam redução na produção de leite de um país da ordem de 10 a 15% em decorrência da mastite (SANTOS & FONSECA, 2007). De fato, em 1987, os EUA perderam, devido à mastite 8 bilhões de litros, o equivalente à produção brasileira no mesmo ano. A perda econômica por mastite nos Estados Unidos é de aproximadamente 185 dólares por vaca anualmente. Considerando que o rebanho leiteiro norte-americano é de 9,5 milhões de bovinos leiteiros, o prejuízo estimado é de cerca de US\$ 1,8 bilhão (COSTA, 2011).

As mastites causadas por micro-organismos do gênero *Staphylococcus* estão entre as mais prevalentes mundialmente. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) tem sido considerado como o principal agente causal de mastites em rebanhos leiteiros. Estima-se que 19% a 47% das vacas em cada rebanho podem estar infectadas por este micro-organismo (NICKERSON, 1993). A alta prevalência de *S. aureus* se deve às infecções de longa duração e resistência aos antimicrobianos, com tendência à cronicidade, e baixas taxas de cura, com consequente redução da produção leiteira (SABOUR et al., 2004; ZAFALON et al., 2007).

Paralelamente, a mastite constitui problema de extrema relevância em saúde pública em decorrência do risco potencial na transmissão de patógenos aos humanos pelo leite e/ou derivados lácteos. A capacidade de espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivas (SCP), assim como das coagulase-negativas (SCN), de produzirem enterotoxinas reforça a importância destes micro-organismos no tocante à saúde pública (BRABES et al., 1999).

As intoxicações e/ou toxi-infecções alimentares ocorrem tanto em países emergentes (em desenvolvimento) como nos desenvolvidos. *S. aureus* é o agente mais frequentemente encontrado nas toxi-infecções de origem alimentar. A intoxicação estafilocócica também é particularmente frequente por ingestão das toxinas termoestáveis produzidas e liberadas durante a multiplicação no alimento, que podem permanecer viáveis após tratamento térmico (ALCARÃS et al., 1997).

É importante que sejam desenvolvidos estudos para contribuir com o esclarecimento de fatores que comprometam a qualidade do leite, pesquisando-se patógenos emergentes na etiologia da mastite bovina, tais como, espécies de estafilococos coagulase-negativa (SCN) e suas toxinas, para se avaliar o risco à Saúde Pública.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Produção Leiteira

O leite é o sexto produto do agronegócio brasileiro, superando o café e arroz, e o Brasil é o sexto maior produtor. A produção leiteira no Brasil vem aumentando substancialmente, pois em 1990 correspondia a 14,5 bilhões de litros e hoje está ao redor de 30,6 bilhões de litros de leite (GUIMARÃES, 2006; IBGE, 2010).

Há estimativas, baseadas em estudos realizados por uma empresa paulista de consultoria, de que o Brasil triplicará o excedente de leite em menos de dez anos. Foi estimado que, em 2017, as exportações do produto representarão cerca de 7% do leite produzido no país, tendo sido projetada uma produção de cerca de 36 bilhões de litros (AGRAFNP, 2008).

É, entretanto, importante referir que para o sucesso na exportação desse produto, não é suficiente obter-se expressiva produção em quantidade de leite, mas o preço deve ser competitivo no mercado internacional e particularmente, a qualidade do leite constitui fator determinante para a exportação (COSTA, 2011).

A legislação brasileira que trata especificamente do assunto leite e seus derivados foi submetida a recente processo de modernização para acompanhar as tendências mundiais e contribuir para melhorar o setor nacional como um todo. Na atualidade, a questão da “qualidade e segurança” dos alimentos tem recebido maior atenção. A aprovação da Instrução Normativa número 51 do Ministério da Agricultura, estabeleceu índices mais rígidos de contagem de células somáticas, contagem bacteriana e detecção de resíduos de antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) no leite (BRASIL, 2002).

A presença de resíduos de antimicrobianos no leite está estreitamente relacionada ao tratamento de mastite e o aumento de células somáticas no leite é determinado pela ocorrência de mastite.

No Brasil ainda é comum a comercialização do leite cru no mercado informal, mesmo sendo proibido por lei desde 1952 (Decreto-

Lei 30.691). Estima-se que cerca de 30% do leite consumido, seja oriundo desse tipo de mercado. As deficiências na fiscalização da comercialização do leite e derivados têm sido amplamente discutidas em âmbito nacional, mas ainda assim, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a cada dez litros de leite produzidos em todo país, três não passam por qualquer tipo de fiscalização sanitária (IBGE, 2010).

Além disso, aliado à comercialização irregular e indevida, deve-se destacar o hábito da utilização do produto “in natura”, tanto para consumo como fabricação de derivados lácteos (FONSECA & SANTOS, 2000).

Há, ainda, o agravante da utilização inadvertida ou mesmo deliberada do leite de animais com mastite. O conjunto destes fatores alerta para o risco, em potencial, no contexto de saúde pública, representado pela veiculação de micro-organismos patogênicos e/ou suas toxinas para os humanos pelo consumo de leite.

2.2. Contagem de Células Somáticas (CCS)

As células somáticas são reconhecidas como células de defesa (leucócitos) do organismo presentes no leite, que migram do sangue para o interior da glândula mamária nos processos inflamatórios (BENITES et al, 2002). Esta migração ocorre frequentemente nos casos de mastite (MACHADO et al., 1999).

As células somáticas presentes no leite são polimorfonucleares neutrófilos (PMN), mononucleares (MN) e células epiteliais. A resposta inflamatória é constituída de 80 a 90 % por células polimorfonucleares neutrófilos (PAAPE, 1977). A migração de PMN para o leite é detectável após três horas do início do processo inflamatório, caracterizando o início do processo de defesa imunológica.

Benites et al. (2000) observaram que em processos inflamatórios agudos, 98,7% de PMN e 14,3% de MN encontravam-se no lúmen alveolar e nos parênquimas glandulares, enquanto nos processos

crônicos 51,9% eram representados por MN e apenas 48,4% eram PMN.

De acordo com Thiers et al. (2001) a CCS total reflete a extensão do processo inflamatório enquanto que a contagem diferencial permite verificar o estágio da inflamação, ou seja, a evolução do processo inflamatório.

A CCS é importante indicador para o monitoramento da qualidade do leite e da saúde da glândula mamária, seja para a detecção de mastite subclínica em nível de rebanho ou para estimar as perdas de produção de leite em decorrência da mastite. Ademais é empregada como parâmetro das características qualitativas e higiênicas do leite (SANTOS, 2002).

2.3. Mastite

A mastite é a inflamação da glândula mamária, de ordem fisiológica, traumática, alérgica, metabólica, psicológica ou infecciosa. Constitui o problema mais sério nos rebanhos leiteiros pela sua elevada prevalência, prejuízos pela redução da produção, menor rendimento industrial, comprometimento funcional da glândula mamária, descarte prematuro e ocasional morte de animais (COSTA, 1998; LANGONI et al., 1998; RADOSTITS et al., 2007). A mastite infecciosa assume maior importância pela prevalência e pelo risco à saúde pública devido a transmissão de agentes etiológicos de zoonoses tradicionais e emergentes (GUIMARÃES & LANGONI, 2009).

É uma enfermidade complexa que acarreta os maiores problemas na pecuária leiteira, tanto no ponto de vista de prejuízos econômicos pela redução na produção, comprometimento da qualidade do leite, honorários veterinários, descarte precoce de animais, mas também pelo grave problema de Saúde Pública pela transmissão de patógenos e risco de toxi-infecções pelo leite. (COSTA et al., 2000, LANGONI et al., 2000, NADER FILHO et al., 2002)

A forma clínica de mastite se caracteriza por alterações visíveis da glândula e/ou do leite. Pode ser aguda apresentando sintomatologia

evidente do processo inflamatório (edema, dor, calor, rubor) ou crônica, manifestada por fibrosamento, e presença de grumos e coágulos no leite (COSTA, 1998).

A forma de evolução subclínica caracteriza-se pela diminuição da produção leiteira sem que, contudo, sejam observados sinais de processo inflamatório ou fibrosamento, e ausência de modificações visíveis no leite e/ou na glândula mamária. Para o diagnóstico da mastite subclínica são utilizados testes indiretos como o CMT (California Mastitis Test), Whiteside, condutibilidade elétrica, contagem eletrônica de células somáticas, ou em lâmina, pelo método de Prescott Breed (COSTA, 1998, CUNHA, 2008).

Os patógenos causadores de mastite são classificados quanto à origem e modo de transmissão, em dois grupos: ambientais e contagiosos. Os patógenos ambientais são da família Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp), *Pseudomonas* spp, leveduras, fungos, algas e certas espécies do gênero *Streptococcus*. Esses são veiculados por manejo inadequado de camas, excesso de sujeira nas áreas de permanência dos animais, higiene inadequada no preparo de pré-ordenha, ou por objetos em instalações e pastos que favoreçam a ocorrência de lesões nos tetos (COSTA et al., 1998).

Entre os contagiosos destacam-se *Staphylococcus* spp, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, e *Mycoplasma* spp.. São conhecidos como “vaca dependentes”, transmitidos a partir de vacas infectadas ou portadoras para outras no momento da ordenha, pelas mãos de ordenhadores, equipamentos de ordenha, toalhas de secagem dos tetos e outros fômites de uso comum entre os animais (COSTA, 1998, RADOSTITS et al., 2007).

2.4. Etiologia microbiana das mastites

Amplo estudo sobre a etiologia da mastite bovina realizado por Langoni et al. (1998) em 7.902 amostras de leite de animais com mastite subclínica revelou, além da importância do gênero

Staphylococcus e *S. aureus*, a participação de *Streptococcus* spp. em 16,41%, de *Streptococcus agalactiae* em 14,32%, de *Corynebacterium bovis* em 15,94%, entre outros micro-organismos menos frequentes.

Brito et al. (1998) examinaram 6315 amostras de leite, provenientes de 1609 vacas em lactação, de 48 rebanhos localizados na Zona da Mata e Campo das Vertentes, em Minas Gerais. Foram isolados 3919 micro-organismos, dos quais 3637 casos de infecção por um agente e 283 de infecção mista, dos quais *S. aureus* em 19,2% das amostras, SCN em 12,4%, *Streptococcus agalactiae* em 6,9%, *Streptococcus* spp. esculina positivos (ESCPOS) em 4,0%, *Streptococcus* spp. esculina negativos (ESCNEG) em 2,1%, *Corynebacterium* sp. em 55,2%, leveduras em 0,1% e *Pseudomonas* sp. em 0,1%.

No Agreste do estado de Pernambuco, Freitas et al. (2005) avaliaram 984 quartos mamários. Destes dez (1,0%) apresentavam mastite clínica, 562 (57,1%) mastite subclínica e 412 (41,9%) foram negativos. Os agentes mais prevalentes foram SCN em 36%, *Corynebacterium* spp. em 34,8% e *S. aureus* em 13,6%.

Oliveira et al. (2009) em dois municípios localizados na região de Tabuleiros Costeiros, em Sergipe, avaliaram 893 amostras de leite isolaram 433 micro-organismos, 21,95% *S. aureus*, 11,65% SCN, 7,50% *Streptococcus agalactiae* e 5,49% *Streptococcus* sp.

Medeiros et al. (2009) identificaram, em amostras de leite de vacas com mastite subclínica, em 15 propriedades localizadas na Região Metropolitana do Recife, Agreste e Zona da Mata do Estado de Pernambuco, 291 agentes, destes, 170 (58,4%) foram classificados como SCN, 84 (28,9%) como *S. aureus* e 37 (12,7%) como SCP.

Andrade et al. (2009) investigaram a etiologia da mastite em amostras de leite não pasteurizadas de três rebanhos da raça Jersey na região de Curitiba, PR, de janeiro a dezembro de 2009. Foram realizadas duas coletas mensais de todas as vacas do rebanho, totalizando 1132 amostras. Dos 966 isolamentos realizados, os micro-organismos mais prevalentes foram *Staphylococcus* spp. (32,7%), *S.*

aureus (19,5%), *Streptococcus agalactiae* (14%), entre outros com menor frequência.

Martins et al. (2010) avaliaram casos de mastite subclínica na microregião de Cuiabá, MT, e os agentes mais frequentes foram, *Corynebacterium* spp. (27,6%) e *S. aureus* (21,5%). Nos casos de mastite clínica, encontraram maior frequência de *S. aureus* (44%) e *Corynebacterium* spp. (12%).

Nickerson et al. (1995) referiram que *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. chromogenes* eram as espécies do gênero *Staphylococcus* isoladas com maior frequência do leite de casos de mastite bovina no EUA.

Na Finlândia, Pitkälä et al. (2004) verificaram que os micro-organismos de maior ocorrência em casos de mastite bovina foram SCN (49,6%), seguido por *Corynebacterium bovis* (34,4%).

Estudos etiológicos de mastite bovina realizados em diversos países vêm demonstrando crescente participação de SCN (WAAGE et al., 1999; MACOVEC & RUEGG, 2003; NEVALA et al., 2004; PITKÄLÄ et al., 2004; TENHAGEN et al., 2006).

Por razões ainda não esclarecidas as infecções por SCN são muito frequentes em novilhas primíparas (HONKANEN-BUZALSKI et al., 1994; COSTA et al., 1996). SCN causam geralmente mastites subclínicas ou clínicas leves (TAPONEN et al., 2006), mas determinam redução na produção leiteira (TIMMS & SCHULTZ, 1987; GRÖHN et al., 2004; DE VLIEGHER et al., 2005).

Piepers et al. (2007), na Bélgica, verificaram que 41% das infecções intramamárias eram causadas por SCN e 18% por *S. aureus*, em estudo que abrangeu 178.668 amostras de leite de glândulas mamárias analisadas em três anos.

No Brasil, a primeira notificação da identificação de espécies SCN isolados de casos de mastite bovina em propriedades leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais, foi publicado no final dos anos noventa (BRABES et al., 1999).

Depreende-se com os dados apresentados em estudos realizados em diferentes regiões do país, bem como em estudos em outros países, que os estafilococos se destacam entre os agentes causais mais

prevalentes, confirmando a sua importância enquanto patógenos envolvidos na etiologia das mastites.

2.5. Gênero *Staphylococcus*

Descrito em 1884 por Rosenbach, o gênero *Staphylococcus* tem sido classificado dentro da família Micrococcaceae. Na última década, com o avanço da biologia molecular, estudos genéticos, de composição da parede celular e, principalmente, com RNA ribossômico, o gênero *Staphylococcus* foi transferido para família: Staphylococcaceae (GARRITY & HOLT, 2001).

O gênero *Staphylococcus* é composto por 43 espécies (ELZÉBY, 2010). Ao Gram apresenta-se sob a forma de cocos, cujo diâmetro varia de 0,8 a 1,0 μm , com arranjos semelhantes a “cachos de uva”. Em sua maioria são anaeróbios facultativos, catalase-positiva, imóveis, oxidase-negativa e não formam esporos. São geralmente encontrados na pele e mucosas (principalmente nasal) dos animais e humanos. Sua principal classificação baseia-se na produção da enzima coagulase, o que os divide em dois grupos, denominados estafilococos coagulase positiva e coagulase negativa (QUINN et al., 2005; KONEMAN et al., 2008).

2.5.1. SCP

Os SCP há muito tempo são considerados importantes como causadores de doenças em humanos e nos animais, uma vez que *S. aureus*, a espécie considerada de maior patogenicidade, é também coagulase positiva. Os SCN, entretanto, eram tradicionalmente considerados saprófitas ou raramente patogênicos (KLOOS & SCHLEIFER, 1975). Em contraste, na atualidade, verifica-se crescente preocupação com o aumento das infecções por esses micro-organismos tanto nos humanos como nos animais.

No gênero *Staphylococcus*, destaca-se *S. aureus* por estar relacionado com diversas infecções e intoxicações no homem e nos animais (BANNERMAN et al. 2003). Multiplica-se à temperatura de 15 a

45°C e em concentrações de NaCl tão altas quanto 15%. Outras espécies de estafilococos que são também coagulase-positivas como *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus*, diferenciam-se de *S. aureus* pelas provas de fermentação dos açúcares, trealose, manitol, maltose, pela resistência à polimixina B (300 UI) e produção de acetoina (QUINN et al., 2005; KONEMAN et al., 2008).

Em meio sólido como ágar sangue ovino ou bovino 5-8%, as colônias são circulares, convexas, com 2 a 3 mm de diâmetro, de coloração branca ao amarelo-dourado, com halo total de hemólise ao redor. *S. aureus* pode ser isolado ainda em meios seletivos como o ágar Baird Parker, apresentando colônias negras, circundadas por halo interno de precipitação do telurito de potássio e outro externo transparente. Além do simples isolamento deste micro-organismo e sua caracterização fenotípica, é possível a caracterização genotípica permitindo-se estudos epidemiológicos mais aprofundados com a possibilidade de identificação de clones do patógeno (CABRAL et al., 2004).

S. aureus expressa grande variedade de fatores de virulência, os quais contribuem para a invasão, colonização e persistência do patógeno no hospedeiro, como a produção de biofilme e cápsula. A maioria das linhagens do micro-organismo produz exotoxinas, ou citolisinas, incluindo hemolisinas, enterotoxinas, toxina da síndrome do choque tóxico e toxinas exfoliativas, além de nucleases, proteases, lipases, coagulases, hialuronidase e collagenase (TODAR, 2002). A ação combinada destes fatores de virulência determina efeitos deletérios às células do hospedeiro, e a ocorrência de infecções em humanos e animais, bem como síndromes tóxicas em suscetíveis (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004). A sua importância está relacionada à sua virulência, resistência aos antimicrobianos e associação a várias doenças sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas, oportunistas e intoxicação alimentar (LOWRY, 1998).

Frequentemente é isolado da nasofaringe dos humanos, a partir da qual pode facilmente contaminar as mãos de indivíduos e alimentos,

causando intoxicação alimentar estafilocócica (KLUYTMANS et al., 1997; MURRAY et al., 2000; VON EIFF et al., 2001).

Foi estimado que 60% da população em geral é portador intermitente e 20% é portador persistente de *S. aureus* (KLUYTMANS et al., 1997). O risco de desenvolver infecções mais graves quando há comprometimento das defesas imunológicas é maior entre os portadores. Os não portadores podem adquirir a infecção a partir dos portadores por transmissão aerógena, ou por ingestão de alimentos contaminados quando manipulados por portadores (VON EIFF et al., 2001). Em muitos países, *S. aureus* é considerado um dos principais patógenos de intoxicações alimentares, superado somente por *Salmonella* spp. (BEAN et al., 1996).

2.5.2. SCN

O grupo denominado de SCN, têm sido isoladas de amostras clínicas humanas e de animais. É representado principalmente pelas seguintes espécies, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. capitis*, *auricularis*, *S. cohnii*, *S. pasteurii* e *S. caprae* (KLOOS & BANNERMAN, 1994; TAN et al. 2006). *Staphylococcus warneri* é membro da microbiota da pele dos humanos e animais (KLOOS & SCHLEIFER, 1975; NAGASE et al., 2002, CIMIOTTI et al., 2007).

Staphylococcus chromogenes parece estar bem adaptado à glândula mamária e tem sido isolado da pele do úbere e do canal do teto (BODDIE et al., 1987; MATTHEWS et al., 1992; TAPONEN, 2008). Taponen (2008) detectou os mesmos pulsotipos (PFGE) de *Staphylococcus chromogenes* da pele do úbere e do leite de casos de mastite, o que corrobora com a hipótese de que linhagens de *S. chromogenes* que colonizam a pele podem constituir patógenos da glândula mamária.

Em estudo em duas fazendas com alta ocorrência de infecções intramamárias por *S. epidermidis*, os isolados do leite foram comparados com estirpes da pele de ordenhadores por PFGE. Neste estudo foi encontrado o mesmo padrão genotípico, indicando que as

infecções intramamárias por *S. epidermidis* poderiam ser de origem humana (THORBERG et al., 2006).

Staphylococcus hemolyticus tem sido isolado tanto de pele de úbere como da microbiota da pele humana (BABA et al., 1980; DEVRIESE & KEYSER, 1980).

Staphylococcus xylosus era considerado não patogênico nas últimas décadas. Entretanto já tem sido isolado de casos de mastite (HARMON & LANGLOIS, 1989; JARP, 1991; BIRGERSSON et al., 1992; TODHUNTER et al., 1993; AARESTRUP & JENSEN, 1997). *S. xylosus* é frequentemente isolado da microbiota da pele de bovinos (KLOOS, 1980).

S. simulans não tem sido encontrado com frequência na pele do úbere ou canal do teto de bovinos (TAPONEN, 2008). *Staphylococcus xylosus* também tem sido isolado do meio ambiente bovino, como cama (MATOS et al., 1991).

Considerável diversidade tem sido observada entre as linhagens de *S. xylosus* (DORDET-FRISONI et al., 2007)

As infecções em humanos com estes grupos de bactérias têm sido associadas à indivíduos imunossuprimidos (KARMATH et al, 1992), mas também como contaminantes de utensílios médicos, como cateteres, próteses de vários tipos, bem como infecções da pele, olhos, trato urinário e as infecções nosocomiais em pacientes imunocomprometidos e neonatos (KLOOS & BANNERMAN, 1994; TAN et al. 2006).

2.6. Aspectos de Saúde Pública

2.6.1. Enterotoxinas

Linhagens de diversas espécies do gênero *Staphylococcus* podem produzir toxinas termoestáveis e causar intoxicação alimentar (MELCHIADES et al., 1993).

A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída à ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante a multiplicação no

alimento, constituindo risco para a população consumidora de leite e derivados provenientes de animais com mastite (ALCARÃS et al., 1997; SÁ et al., 2004).

Menos de 1mg de toxina pura desencadeia os sinais característicos de intoxicação estafilocócica. Estima-se que é necessária a ingestão de 10^5 UFC de *Staphylococcus* spp. por grama ou mililitro de alimento para provocar sinais de toxi-infecção (BERGDOLL, 1989).

As enterotoxinas são importantes fatores de virulência. São os principais desencadeantes da intoxicação de origem bacteriana nos humanos tendo sido relatadas em vários surtos de doenças transmissíveis por alimentos (CLIVER, 1994). Podem permanecer viáveis após tratamento térmico comumente aplicado ao leite, como a pasteurização e esterilização (BHATIA & ZAHOOOR, 2007). As intoxicações alimentares causadas por enterotoxinas estafilocócicas (SEs) têm evolução aguda com rápida manifestação dos sinais que incluem náuseas e emese grave acompanhada ou não de diarreia (BHATIA & ZAHOOOR, 2007). A doença é usualmente auto-limitante, mas ocasionalmente pode ser grave e necessitar de hospitalização. SEA é mundialmente a mais frequente toxina relacionada a intoxicação estafilocócica, embora haja registros do envolvimento de outras enterotoxinas (ARGUDÍN et al., 2010).

O período de incubação da intoxicação estafilocócica é extremamente curto, variando de quinze minutos a seis horas, após a ingestão do alimento contaminado (CARMO, 2001). Os sinais variam de acordo com a susceptibilidade individual, embora sejam mais graves em recém nascidos, idosos, pessoas com doenças crônicas e imunossupressoras (CLIVER, 1994). A sintomatologia é decorrente da reação imunológica do indivíduo, visto que as enterotoxinas têm propriedade de superantígenos. A resposta imune celular se desenvolve frente a esses antígenos pela ligação aos receptores (TCR) ligados à membrana dos linfócitos T e liberação exacerbada de citocinas (BALABAN & RASOOLY, 2000).

Carmo et al. (2004) relataram grave surto de intoxicação alimentar por estafilococos ocorrido em Minas Gerais, no qual aproximadamente 8.000 pessoas foram acometidas pelo consumo de alimentos, dos quais 16 morreram. Há relatos de surtos de intoxicação estafilocócica associados com espécies de SCN (BRECKINRIDGE & BERGDOLL, 1971; VERAS et al., 2003).

São conhecidas 23 enterotoxinas estafilocócicas. As mais frequentemente associadas às intoxicações alimentares são A, B, C e D (SILVA & GANDRA, 2004). Os tipos clássicos SEA, SEB, SEC1, 2, 3, SED E SEE são considerados os de maior ocorrência (DINGES et al., 2000; MARTIN et al., 2001). As enterotoxinas são proteínas simples, resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais. São estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos, não são inativadas totalmente pela cocção normal, pasteurização e outros tratamentos térmicos usuais (JAY, 1994).

O Comitê Internacional de Nomenclatura para Superantígenos Estafilocócicos propuseram que somente superantígenos estafilocócicos que induzem à emese, após administração oral em modelo experimental, devem ser denominados de enterotoxinas. (VASCONCELOS & CUNHA, 2010).

Brabes et al. (1999) analisaram 127 amostras de leite de casos de mastite em cinco propriedades nos estados de São Paulo e Minas Gerais e encontraram prevalência de 40,15% para a espécie de *S. aureus*. Entre os SCN foram identificados: *S. chromogenes* (11,8%), *S. sciuri* (9,5%), *S. simulans* (7,8%), *S. hyicus* (6,3%), *S. xylosus* (4,7%), *S. warneri* (2,36%); *S. epidermidis* (0,8%), *S. saprophyticus* (0,8%), *S. caprae* (0,8%) e *S. hominis* (0,8%). Destes isolados detectaram por RPLA e ELISA que 16 linhagens eram produtoras de enterotoxinas e dentre os SCN isolados verificaram a produção de enterotoxinas por amostras de *S. chromogenes* e *S. sciuri*. O estudo ressaltou o risco potencial à saúde humana associado ao consumo do leite dos rebanhos analisados, uma vez que a maioria dos casos de mastite era subclínica, portanto, de animais sem alterações visíveis na glândula mamária e tampouco no leite.

Algumas linhagens de *Staphylococcus* produzem também a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), que determina sinais agudos e potencialmente fatais, caracterizados por febre, descamação da pele, hipotensão, congestão em vários órgãos e choque letal (LAMAITA, 2003). Esta síndrome, diferentemente da gastroenterite causada pelas enterotoxinas, ainda não foi associada ao consumo de alimentos. No entanto, sua presença no alimento pode indicar possível via de transmissão do patógeno para os humanos (SENA, 2000), além de se constituir em fator de virulência da linhagem.

Cardoso et al. (2000) avaliaram 127 amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite de bovinos leiteiros do estado de Minas Gerais e detectaram 47,2% produtoras de TSS-1. Esta toxina se constitui de um peptídeo de cadeia simples, com propriedades biológicas comuns com outras exotoxinas pirogênicas, como o estímulo da proliferação inespecífica de células T, indução da produção de interleucina-1, gama-interferon e do fator alfa de necrose tumoral (alfa-TNF). Os autores verificaram também a produção de enterotoxinas em 30% das amostras do tipo SED, 19% SEB, 8% SEC e 3% do tipo SEA.

Pimentel et al. (2002) constataram que 24,6% dos *pools* de amostras de SCP que produziram algum tipo de toxina, assim como, 41,3% dos *pools* de amostras de SCN eram enterotoxigênicos. Esses resultados indicam que, no caso de leite cru, espécies não produtoras de coagulase produziram enterotoxinas em maior frequência, fato preocupante, pois para muitos a produção de enterotoxinas é mais significativa no caso dos SCP.

Sá et al. (2004) avaliaram 209 amostras de leite oriundas de vacas com mastite subclínica por *S. aureus*, e nove amostras (4,39%) foram produtoras de enterotoxinas. Destas, uma (0,49%) foi caracterizada como do tipo SED, três (1,46%) SEC, e três (1,46%) SEB. Em um (0,49%) isolado, detectou-se concomitantemente SEA e SEB e em outro SEB e SEC.

Faccioli (2010) evidenciou com a utilização de PCR a presença *S. aureus* em 99% dentre 104 amostras de leite de tanques de refrigeração de propriedades leiteiras, com moderada concordância

com o microbiológico nas amostras positivas. Detectaram genes codificadores das enterotoxinas *sea* (43,27%), *seb* (23,27%), *sec* (58,5%), *sed* (1,28%) e utilizando o método de RPLA revelaram enterotoxinas em 9% das amostras de leite em quantidade que variou de 1 a 5 ng/mL. A autora ressaltou a importância da pesquisa de estafilococos enterotoxigênicos no leite para salvaguardar a saúde dos consumidores.

Veras et al. (2003) ao investigarem surtos originados de derivados lácteos, isolaram linhagens enterotoxigênicas de bebida láctea (SEB + TSST-1), do queijo canastra (SEC + TSST-1) e do queijo ralado (SEB + TSST-1). Desta forma tanto o leite “in natura” como seus derivados podem veicular tais tipos de enterotoxinas, aspecto preocupante no contexto de saúde pública.

Lamaita (2003) enfatizou que os padrões legais para alimentos especificam apenas a presença de espécies coagulase positiva e reforça a necessidade de revisão da legislação brasileira, visando incluir também a participação dos SCN, dada a importância do ponto de vista de segurança alimentar.

2.6.2. Infecções Nosocomiais

Além dos graves problemas relacionados ao gênero *Staphylococcus* nas toxi-infecções alimentares, outra grande preocupação são as infecções nosocomiais. SCN são na atualidade considerados importantes agentes nas infecções hospitalares, principalmente nas septicemias em pacientes que necessitam de cuidados intensivos (National Nosocomial Infections Surveillance, NNIS System Report, 2001).

As infecções por SCN têm sido relatadas em pacientes recém-nascidos de baixo peso, imunocomprometidos, nos casos de linfoma, leucemia, pós-transplante de medula óssea, indivíduos com queimaduras graves, ou pacientes com dispositivos intravasculares, derivações ventriculares, cateteres peritoneal, ou outro dispositivo médico (CUNHA et al, 2007).

Estudos epidemiológicos com os SCN são limitados pelo fato destes micro-organismos pertencerem a microbiota da pele (VENKATESH et al., 2006). Sabe-se que as infecções por SCN estão associadas a altas taxas de morbimortalidade (KARLOWICZ et al., 2000; STOLL et al., 2002), e determinam aumento no período de internação e custos hospitalares (PITTET et al., 1994).

S. epidermidis é a bactéria predominante nos isolamentos de casos clínicos. No entanto, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis* e *S. warneri* têm sido também frequentemente relatados (PATEL et al., 2000; RUHE et al., 2004). Os SCN são responsáveis pela maioria dos episódios de septicemias em Unidades de Terapia Intensiva Neonatal, causados principalmente por *S. epidermidis*, seguido por *S. haemolyticus* (FREDHEIM et al., 2009). Estas Infecções ocorrem com frequência após implantação de dispositivos médicos. Em estudo realizado constataram a taxa de incidência de infecção hospitalar de 19,7%, representadas, em sua maioria, por episódios de sepsis (88,8%). SCN responderam por 68,8% dessas bacteremias, dos quais 97,7% por *S. epidermidis* e 2,3% por *S. haemolyticus* (BRITO et al., 2007).

S. simulans tem sido um patógeno subestimado, mas potencialmente importante. Causa infecção nos animais, como bovinos, mas raramente é relatado como isolado clínico em humanos. Entretanto, ocasionalmente está relacionado a infecções em humanos como septicemia, endocardite, infecção do trato urinário, osteomielite e infecção de próteses articulares (RAZONABLE et al., 2001).

2.6.3. Resistência aos antimicrobianos

Outro aspecto de grande significado em saúde pública refere-se à resistência bacteriana, que é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes que codificam diferentes mecanismos bioquímicos, impedindo a ação de diversos fármacos. Deve-se ressaltar que pode ocorrer a transmissão cruzada interespecífica de linhagens resistentes pelo consumo de alimentos de origem animal. Desta forma, o problema do aumento da resistência bacteriana em humanos não é somente

devido ao uso indiscriminado e intensivo destes pelo pessoal de saúde, mas também pela transmissão via alimentos de origem animal (STÖHR & WEGENER, 2001).

S. aureus resistentes aos antimicrobianos representam um problema mundial, e o controle de sua transmissão constitui importante desafio. Há numerosos relatos da disseminação de linhagens resistentes aos betalactâmicos, anteriormente eficazes no tratamento das infecções estafilocócicas. A modificação das proteínas ligantes de penicilina (PBP's), sintetizadas pelo gene *mecA*, é um dos principais mecanismos de resistência aos betalactâmicos (AARESTRUP et al., 1998).

A associação de métodos fenotípicos e genotípicos na identificação do perfil de resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras clínicas de humanos e animais fornece subsídios para o diagnóstico mais acurado, capaz de determinar a prevalência destes estafilococos como agentes de infecções e de proporcionar o desenvolvimento de estratégias de controle da disseminação das estirpes resistentes. Isolados clínicos mostraram elevada proporção de SCN que possuem o gene *mecA*, associado à resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, dificultando a escolha dos fármacos para o tratamento (KREDIET et al., 2001). Atualmente tem se verificado também, crescente resistência aos antimicrobianos em SCN isolados de mastite bovina (GUIMARÃES et al, 2009).

Os aspectos abordados evidenciam a necessidade de pesquisas que dimensionem a participação dos SCN em problemas relevantes na saúde de animais produtores de alimentos, como a mastite. Paralelamente, é fundamental avaliar a capacidade desses micro-organismos na produção de fatores de virulência, como enterotoxinas e fatores de resistência aos antimicrobianos, que facultem a adoção de medidas terapêuticas e preventivas, com vista não só a saúde dos animais, como também da saúde pública.

Objetivos

3.OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente projeto fundamenta-se na necessidade de contribuir para avaliação da mastite por micro-organismos do gênero *Staphylococcus*, particularmente SCN, avaliando-se o risco potencial representado por estes para a segurança alimentar de consumidores de leite e desta forma a partir do dimensionamento do problema evidenciar a necessidade de se estudar estratégias para minimizar seu impacto na saúde pública e animal.

3.2 Específicos

3.2.1. Avaliar a ocorrência de mastite subclínica e clínica em rebanhos bovinos de dez propriedades leiteiras de cinco diferentes regiões do estado de São Paulo;

3.2.2. Identificar bioquimicamente os isolados do gênero *Staphylococcus* do leite de casos de mastite bovina;

3.2.3. Determinar as espécies de estafilococos coagulase negativas, isoladas do leite de casos mastite bovina;

3.2.4. Estabelecer o perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados de estafilococos;

3.2.5. Investigar a ocorrência do gene *mecA* de resistência à meticilina em linhagens de estafilococos coagulase negativos e positivos;

3.2.6. Detectar a presença de genes codificadores de enterotoxinas A, B, C e D em linhagens de estafilococos coagulase negativos e positivos;

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

A colheita do material foi realizada em dez propriedades leiteiras de cinco diferentes regiões do estado de São Paulo.

As análises microbiológicas, contagem de células somáticas e moleculares foram realizadas no Laboratório do Núcleo de Pesquisas em Mastites (NUPEMAS), do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, UNESP- Campus de Botucatu (SP).

4.1 Propriedades rurais

Dessas foram examinadas, pelos testes de triagem (tamis e CMT), 1.148 vacas em lactação, perfazendo um total de 4.584 glândulas mamárias avaliadas. Foram colhidas assepticamente para a realização dos exames microbiológicos 1.318 amostras de leite das glândulas mamárias, que apresentaram reações positivas em qualquer dos exames de triagem assim como amostras de leite para determinação da CCS.

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentadas informações sobre as principais características da produção, do rebanho e do manejo das propriedades leiteiras estudadas.

Tabela 2. Resumo das principais características de manejo de ordenha de vacas em dez fazendas estudadas. Botucatu, SP, 2011.

CARACTERÍSTICAS das FAZENDAS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Nº de ordenhas	2	3	3	3	3	3	2	2	1	2
Alimentação pós ordenha	Sim	sim	Sim	Sim	Sim	Sim	sim	sim	não	não
Tipo secagem:	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Abrupta	Intermitente	Abrupta
Ordenha mecânica	Duplo 4	Carrossel	Duplo 20	Linha 5	Duplo 5	Duplo 16	Duplo 4	Duplo 6	Balde ao pé 4 conjuntos Ruim	Duplo 5 regular
Higiene equipamento	Boa	Boa	Excelente	Regular	Regular	Excelente	Boa	Boa		
Qualidade da mão de obra	Regular	boa	Boa	regular	Ruim	Boa	boa	boa	ruim	ruim
Assistência veterinária	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Frequência dos testes para diagnóstico de Mastite										
• Tamis	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Antes das ordenhas	Não faz	Antes das ordenhas Bimestral
• CMT	trimestral	bimestral	Mensal	Mensal	trimestral	Mensal	Trimestral	Trimestral	Não faz	Bimestral
• CCS	trimestral	bimestral	Mensal	Mensal	trimestral	Mensal	Trimestral	Trimestral	Não faz	Bimestral

4.2. Diagnóstico do Processo Inflamatório

A metodologia e os critérios de interpretação utilizados para diagnóstico de mastite clínica e subclínica foram: exame dos animais antes de cada ordenha pelos testes da caneca preta (RADOSTITS et al, 2007) California Mastitis Test - CMT (SCHALM e NOORLANDER, 1957). As glândulas mamárias que apresentaram alterações visíveis (grumos, filamentos, pus ou sangue) nos primeiros jatos de leite ao exame da caneca preta e/ou, alterações visíveis da glândula mamária (edema, calor, dor e rubor), foram classificados como casos de mastite clínica. As glândulas mamárias sem alterações visíveis e com leite de característica normal, porém positivos ao teste de CMT (escores 1 a 3+), foram classificados como mastite subclínica.

4.3. Coleta do leite dos animais

Foram colhidas as amostras de leite das glândulas mamárias com mastite clínica e subclínica. Após realização da anti sepsia do óstio do teto com álcool iodado (2,5%) foram colhidas as amostras em tubos de ensaio esterilizados para realização dos exames microbiológicos e transportadas ao laboratório sob refrigeração (4-8°C) em caixas isotérmicas com gelo reciclável.

Paralelamente, das glândulas dos mesmos animais, foram colhidas amostras individuais de 25 mL de leite de todos os quartos mamários para realização da Contagem de Células Somáticas (CCS), em frascos contendo o conservante celular Bromopol (Bertrand, 1996). As análises de CCS foram realizadas por citometria fluxométrica em equipamento Bentley Somacount 300 (Bentley®).

4.4. Cultivos microbiológicos

As amostras foram semeadas em meio ágar-sangue de carneiro a 5% e ágar McConkey e incubadas em condições de aerobiose a 37°C, sendo realizadas leituras com 24, 48 e 72 horas de incubação. Foram realizados exames bacterioscópicos pelo método de Gram. Os micro-organismos isolados foram submetidos às provas de identificação e classificadas de acordo com

Murray et al. (2007). Nos casos de colônias suspeitas de SCN e SCP as mesmas foram contadas e categorizadas em: crescimento discreto até nove colônias, moderado 10 a 29 colônias e exuberante 30 ou mais colônias.

4.5. Perfil de sensibilidade antimicrobiana “in vitro”

Foi realizado perfil de sensibilidade para todas as amostras de estafilococos isoladas, de acordo com Bauer et al. (1966), em placas de ágar Mueller Hinton, utilizando os seguintes antimicrobianos: gentamicina (10µg), tetraciclina (30µg), penicilina G (10 U.I.), neomicina (30µg), ampicilina (10µg), cotrimoxazol (25µg), oxacilina (10µg), ciprofloxacina (10µg), enrofloxacina (10µg), vancomicina (10µg), novobiocina (5µg), cefoxitina (10µg) e cefalexina (30µg). Referência interpretação dos halos de inibição de acordo com National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2005).

As linhagens padrão de *S. aureus* ATCC 25923 (sensível à oxacilina, gene *mecA* negativo), ATCC 33591 (resistente à oxacilina, gene *mecA* positivo) e *S. epidermidis* ATCC 12228 foram usadas como controles.

4.6. Identificação de SCN e SCP

Após a análise morfo-tintorial, cocos Gram positivos foram submetidos a provas de catalase e coagulase (KONEMAN et al., 2008). O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base nas provas de oxidação e fermentação da glicose, e pela resistência à bacitracina (0,04 U), indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm e pela sensibilidade à furazolidona (100 mg), caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro (BAKER, 1984).

Para a identificação das espécies de SCN foi utilizado o método de Kloos & Schleifer (1975), modificado por Cunha et al. (2004), que consiste na fermentação dos açúcares xilose, sacarose, trealose, maltose e manitol, produção de hemolisina e multiplicação em condições de anaeróbiose em caldo tioglicolato. As linhagens foram mantidas a 37°C por 72 horas. Quando necessário e de acordo com os resultados obtidos pelo método modificado por Cunha et al. (2004), para complementar a classificação das demais espécies e subespécies de SCN também foram utilizadas outras provas bioquímicas,

como a redução de nitrato, produção de urease e/ou ornitina descarboxilase, fermentação de β -D-frutose e resistência à novobiocina.

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

Posteriormente à identificação da espécie, os isolados foram conservados em caldo cérebro-coração com glicerol (- 80°C), para posterior realização das técnicas de biologia molecular pela metodologia descrita a seguir.

4.7. Extração do DNA de *Staphylococcus* isolados do leite de casos de mastite bovina

O ácido nucléico total foi extraído a partir de linhagens de *Staphylococcus* spp. cultivadas em ágar sangue e inoculadas individualmente em caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI), incubadas a 37°C por 24 h. A extração foi realizada com o kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin® (GE Healthcare), que consistiu na digestão inicial das células de estafilococos com lisozima (10 mg/mL) e proteinase K (20 mg/mL). A seguir 400 μ L do tampão de extração foram adicionados à mistura, que em seguida foi centrifugada a 11.000 x g por 1 min. O sobrenadante foi transferido para a coluna GFX e centrifugado a 11.000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e 500 μ L de tampão de extração foi adicionado novamente à coluna. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500 μ L da solução de lavagem foi adicionada à coluna, submetendo o material a nova centrifugação a 11.000 x g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e adicionado 200 μ L de tampão de eluição aquecido a 70°C. As amostras foram centrifugadas a 11.000 x g por 1 minuto, e a coluna GFX foi desprezada. O DNA extraído foi mantido a -20°C.

4.8. *Primers* utilizados na detecção dos genes codificadores das enterotoxinas

Foram utilizados *primers* específicos (Quadro 1) para os genes codificadores de cada enterotoxina, EEA (*sea*), EEB (*seb*), EEC (*sec*) e EED (*sed*), de acordo com Johnson et al. (1991).

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

Fonte: JOHNSON *et al.*, 1991

Figura 1. Sequência das bases, localização dentro dos genes e tamanhos previstos dos produtos amplificados pelos *primers* oligonucleotídeos toxina-específicos utilizados na reação de PCR para detecção de genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, codificadores de enterotoxinas.

As reações de PCR foram realizadas em micro tubos de 0,5mL em volumes totais de 25µL, contendo 10pmol de cada primer (tabela 3), 1,0U de *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen), 200µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, PCR buffer 1x, 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL da amostra.

Em todas as reações realizadas foi utilizado controle negativo, pela substituição do ácido nucléico por água. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), empregando-se inicialmente os parâmetros descritos por Johnson et al. (1991) com algumas modificações de padronização e adaptação para laboratório, conforme Quadro 1:

Quadro 1. Incubação em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf).

Genes codificadores de enterotoxinas	Tempo de incubação em termociclador Minutos
SEA	94 ⁰ C-4min 94 ⁰ C-2min 51 ⁰ C-2min 72 ⁰ C-1min30s 35x { 94 ⁰ C-2min 53 ⁰ C-2min 72 ⁰ C-1min30s 72 ⁰ C-7min
SEB	94 ⁰ C-4min 38x { 94 ⁰ C-2min 55,5 ⁰ C-2min 72 ⁰ C-1min30s 72 ⁰ C-7min
SEC	94 ⁰ C-4min 38x { 94 ⁰ C-2min 52,4 ⁰ C-2min 72 ⁰ C-1min30s 72 ⁰ C-7min
SED	94 ⁰ C-4min 94 ⁰ C-2min 55 ⁰ C-2min 72 ⁰ C-1min30s 94 ⁰ C-2min 53 ⁰ C-2min 72 ⁰ C-1min30s 38x { 94 ⁰ C-2min 51 ⁰ C-2min 72 ⁰ C-1min30s 72 ⁰ C-7min

Referência: Johnson et al. (1991) adaptado

4.9. Visualização dos produtos amplificados

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese em gel de agarose a 2% preparado em tampão de TBE 1,0 X (89 nM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) e corado com 1,0µL/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão 100 pb e posteriormente fotografado sob transiluminação UV.

4.10. Detecção do gene *mecA* em *S. aureus* e SCN

4.10.1. Extração do Ácido Nucléico

O ácido nucléico total foi extraído a partir de linhagens de *Staphylococcus* spp. conforme descrito no item 5.7.

4.10.2. Amplificação do ácido nucléico (PCR).

As reações de PCR foram realizadas em micro tubos de 0,5mL em volumes totais de 25µL, contendo 10 pmol de cada primer, 1,0U de *Taq Platinum* DNA polimerase (Invitrogen), 200µM de desoxiribonucleotídeos trifosfatados, PCR buffer 1x, 0,75 mM de MgCl₂ e 3 µL da amostra. A incubação foi realizada em termociclador, utilizando os *primers mecA1* (5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG-3') e *mecA2* (5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG-3'), que amplifica 533pb, empregando os parâmetros descritos por Murakami et al. (1991) : 40 ciclos de desnaturação a 94°C por trinta segundos, anelamento dos *primers* a 55,5°C por trinta segundos e extensão a 72°C por um minuto. Após completar os 40 ciclos, os tubos foram incubados a 72°C por cinco minutos antes de resfriar à 4°C. Em todas as reações foram utilizadas linhagens de referência internacional com controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591) e negativo (*S. aureus* ATCC 25923).

Foram utilizadas como controle positivo cepas-padrão ATCC, cedidas pela Profa. Dra. Maria de Lourdes R. S. Cunha, do Departamento de Imunologia e Microbiologia da UNESP Botucatu, SP.

4.11. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com GRAPHPAD INSTAT software. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS FOR PERSONAL COMPUTERS. 1990-1993., utilizando os testes de Kruskal-Wallis -ANOVA não paramétrica, teste de Mann-Whitney e teste exato de Fisher.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Mastite

As tabelas 3 e 4 apresentam os resultados, em número e porcentagem respectivamente, referentes à mastite clínica e subclínica nas dez propriedades leiteiras avaliadas em cinco regiões do estado de São Paulo.

Tabela 3. Ocorrência de mastite bovina em dez fazendas de cinco regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Fazendas	Nº Animais	Total animais examinado	Total quartos	Mastite clínica Nº (%)	Mastite subclínica Nº (%)	Quartos Perdidos Nº (%)	Quartos negativos Nº (%)
I	80	74	296	5 (1,7)	85 (28,7)	6 (2,0)	200 (67,6)
II	320	287	1148	10 (0,1)	239 (20,8)	35 (3,0)	864 (75,3)
III	970	183	728	4 (0,5)	258 (35,4)	21 (4,8)	445 (61,1)
IV	121	101	404	6 (1,5)	95 (23,5)	13 (3,2)	290 (71,8)
V	96	78	312	2 (0,6)	150 (48,1)	22 (7,1)	138 (44,2)
VI	560	93	372	6 (1,6)	126 (33,9)	4 (1,1)	236 (63,4)
VII	96	85	340	1 (0,3)	97 (28,5)	5 (1,5)	237 (69,7)
VIII	90	87	348	2 (0,6)	65 (18,7)	1 (0,3)	280 (81,1)
IX	80	80	320	1 (0,3)	70 (21,9)	3 (0,9)	246 (76,8)
X	80	80	320	2 (0,6)	94 (29,4)	13 (4,1)	211 (65,9)
Total	2493	1148	4588	39 (0,9)	1279(27,9)	123(2,7)	3147 (68,6)
Média	249,3	114,8	458,8	3,9	127,9	12,3	314,7
Mediana	96	87	348	4	97	13	246

Tabela 4. Mastite clínica e subclínica bovina em dez propriedades leiteiras de cinco regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Fazendas	Total Quartos Examinados	Quartos Mastite clínica (%)	Quartos Mastite subclínica (%)	Quartos Perdidos (%)	Quartos negativos (%)	CCS (tanque) x 10 ³ células/mL
I	296	1,7	28,7	2,0	67,6	630
II	1148	0,1	20,8	3,0	75,3	236
III	728	0,5	35,4	4,8	61,1	383
IV	404	1,5	23,5	3,2	71,8	315
V	312	0,6	48,1	7,1	44,2	700
VI	372	1,6	33,9	1,1	63,4	402
VII	340	0,3	28,5	1,5	69,7	640
VIII	348	0,6	18,7	0,3	81,1	418
IX	320	0,3	21,9	0,9	76,8	120
X	320	0,6	29,4	4,1	65,9	602

5.2. Etiologia

Os micro-organismos isolados das amostras de leite das 4.584 glândulas mamárias das 1.148 vacas em lactação avaliadas pelos testes de diagnóstico de mastite, foram submetidas à identificação bioquímica e os resultados estão reunidos na Tabela 5. Foram apresentados, nessa tabela, em número e as respectivas porcentagens de ocorrência em relação ao total das amostras microbiologicamente positivas e em relação ao gênero ou à família.

Tabela 5. Frequência dos principais agentes etiológicos de mastite bovina em propriedades leiteiras do estado de S. Paulo. Botucatu, 2011.

Microbiológico Quartos mamários	Espécies em relação ao gênero		Relacionado ao total microbiológico
	nº	%	%
<i>S. aureus</i>	90	34,2	12,5
SCP*	45	17,1	6,2
SCN**	128	48,7	17,7
<i>Staphylococcus</i> total	263		36,4
<i>Streptococcus agalactiae</i>	70	41,7	9,7
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	69	41,1	9,5
<i>Streptococcus uberis</i>	29	17,3	4,0
<i>Streptococcus</i> Total	168		23,3
<i>Corynebacterium</i> spp.	230		31,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	28	58,3	3,9
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	4,2	0,3
<i>Escherichia coli</i>	15	31,3	2,1
<i>Enterobacter</i> sp	3	6,3	0,4
<i>Enterobacteriaceae</i>	48		6,7
Outros micro-organismos***	13		1,8
Total Microbiológico positivo	722		

(amostras contaminadas: 1 na Faz. I; 3 na Faz II; 1 na Faz.VI ; 3 na Faz VII)

* SCP (estafilococos coagulase positiva): *S. intermedius* 21 (8%) *S. hyicus* 19 (7,2%), *S. schleiferi subsp coagulans* 5 (1,9 %).

** SCN (estafilococos coagulase negativa) espécies identificadas na Tabela 6.

*** Faz.III: *Candida* spp.(1), *Pasteurella* spp.(2), *Nocardia* spp.(1), *Citrobacter* spp.(1); Faz.VI: *Candida* spp.(1), *Pasteurella* spp.(3); Faz.VII: *Nocardia* spp.(1), *Pseudomonas aeruginosa* (1). Faz. VIII *Candida* spp.(1), *Citrobacter* spp.(1)

5.2.1. Espécies SCN e SCP

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados da identificação das espécies dos 128 SCN isolados das amostras de leite de casos de mastite bovina, diagnosticados nas dez fazendas. Verificou-se a maior frequência de mastites por SCN nas fazendas II (27,3%) e III (26,7) e as mais baixas nas fazendas X (0,8%) e VIII (1,6%). A diferença na frequência de isolamento de SCN nas fazendas II e III foi estatisticamente significativa quando comparada com a das fazendas VIII e X.

Tabela 6. Isolamentos de espécies de SCN das amostras de leite de casos de mastite bovina diagnosticados em dez fazendas estudadas em cinco regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

SCN											Total	%
Fazendas	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X		
Espécies												
<i>S. auriculares</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,8
<i>S. capitis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,8
<i>S. chromogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,8
<i>S. cohnii subsp cohnii</i>	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	4	3,1
<i>S. epidermidis</i>	4	5	4	1	2	0	1	1	0	1	19	14,8
<i>S. haemolyticus</i>	1	2	0	0	0	2	1	0	0	0	6	4,7
<i>S. hominis</i>	0	0	2	3	0	0	0	0	1	0	6	4,7
<i>S. hyicus</i>	2	7	3	2	1	0	0	0	1	0	16	12,5
<i>S. lugdunensis</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2	1,6
<i>S. pasteurii</i>	0	0	1	1	0	2	0	0	1	0	5	3,9
<i>S. saccharolyticus</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	1,6
<i>S. saprophyticus subsp bovis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,8
<i>S. saprophyticus subsp saprophyticus</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2,3
<i>S. schleiferi subsp schleiferi</i>	1	1	1	3	0	0	0	0	0	0	6	4,7
<i>S. sciuri subsp sciuri</i>	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	3	2,3
<i>S. simulans</i>	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	4	3,1
<i>S. warneri</i>	2	12	14	6	4	1	1	0	0	0	40	31,3
<i>S. xylosum</i>	0	2	2	2	0	1	1	0	0	0	8	6,3
Total	14	35	32	19	8	9	5	2	3	1	128	100
% SCN	10,9	27,3	26,7	14,8	6,3	7	3,9	1,6	2,3	0,8		

P = 0.0001, significante Kruskal-Wallis Teste (ANOVA não paramétrica)

P<0.05 diferença significativa na frequência de isolamento de SCN faz II quando comparado com a faz VIII

P<0.01 diferença significativa na frequência de isolamento de SCN faz II quando comparado com a faz X

P<0.05 diferença significativa na frequência de isolamento de SCN faz III quando comparado com a faz VIII

P<0.01 diferença significativa na frequência de isolamento de SCN faz III quando comparado com a faz X

Na tabela 7 estão apresentadas as espécies de SCP isolados das amostras de leite de casos de mastite bovina, diagnosticados nas dez fazendas. Verificou-se a maior frequência de mastites por SCP nas fazendas I (13,6%) e fazenda X (44,4%) e as mais baixas nas fazendas VI (1,5%) e VII (0,7%), as diferenças entre estas foram estatisticamente significantes. A ocorrência de *S. aureus* na fazenda X foi estatisticamente superior ao observado nas outras fazendas. Quando se analisou a ocorrência total as dez fazendas o isolamento de *S. aureus* foi superior a *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. schleiferi* subsp *coagulans* e as diferenças foram estatisticamente significantes. Quando se comparou as frequências de isolamento das espécies de SCP dos casos de mastite verificou-se que a frequência de isolamento na fazenda X foi superior às demais fazendas ($P < 0.0001$), enquanto a frequência de isolamento de SCP na fazenda I foi estatisticamente superior às fazendas II, V, VI e VII.

Tabela 7. Isolamentos de espécies de SCP das amostras de leite de casos de mastite bovina diagnosticados em dez fazendas estudadas em cinco regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

SCP Espécies	Faz I	Faz II	Faz III	Faz IV	Faz V	Faz VI	Faz VII	Faz VIII	Faz IX	Faz X	Total	%
<i>S. aureus</i>	2	0	4	2	1	1	1	11	8	60	90 ^{a,b,c}	68,2
<i>S. intermedius</i>	9	2	4	2	3	0	0	0	1	0	21 ^a	15,2
<i>S. hyicus</i>	4	3	4	3	2	1	0	0	2	0	19 ^b	12,9
<i>S. schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	5 ^c	3,8
Total	18 ^{d,e}	5 ^{d,e}	13 ^d	8 ^d	6 ^{d,e}	2 ^{d,e}	1 ^{d,e}	11 ^d	11 ^d	60 ^d	135	100
% SCP	13,3	3,7	9,6	5,9	4,4	1,5	0,7	8,1	8,1	44,4		

$P < 0,0001$ ocorrência de *S. aureus* na faz X foi estatisticamente superior ao observado nas outras fazendas (Teste de Exato de Fisher aproximação de Katz)

^a $P < 0,0001$ isolamento de *S. aureus* foi superior a *S. intermedius*

^b $P < 0,0001$ isolamento de *S. aureus* foi superior a *S. hyicus*

^c $P < 0,0001$ isolamento de *S. aureus* foi superior

^d $P < 0,0001$ frequência de isolamento na faz X das espécies de SCP dos casos de mastite foi superior às demais fazendas.

^e $P < 0,0001$ de isolamento na faz I das espécies de SCP dos casos de mastite foi superior à fazenda VII, fazenda VI ($P = 0,0002$) e faz II ($P = 0,0076$) e faz V ($P = 0,0171$)

5.3. CCS

A intensidade do processo inflamatório foi avaliada por CCS. Na tabela 8 estão apresentados os resultados de CCS de amostras de leite de 263 casos de mastite bovina por micro-organismos do gênero *Staphylococcus*, sendo comparados aos isolamentos de SCN (128) e SCP (135).

Tabela 8. Intensidade do processo inflamatório em relação à CCS em 263 casos de mastite bovina por micro-organismos do gênero *Staphylococcus* avaliados em 10 (dez) fazendas leiteiras do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

CCS	SCN (Coagulase Negativo) (células x 10 ³ /mL)	SCP (Coagulase positivo) (células x 10 ³ /mL)
Mediana	424,5	792,0
Desvio padrão	1422,3	1584,2
Erro padrão	125,7	136,3
Mínimo	19,0	15,0
Máximo	8633,0	8650,0

P = 0,0172, diferença significativa (teste de Mann-Whitney).

Tabela 9. Intensidade do processo inflamatório em CCS em relação à intensidade da infecção quanto ao número de colônias (ufc) de SCN e SCP isoladas de amostras de leite de 263 casos de mastite bovina por micro-organismos do gênero *Staphylococcus* (SCN=128 e SCP= 135), de dez fazendas leiteiras do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

SCN Número estimado colônias (ufc)*	Mediana CCS .10 ³ /mL	Mínimo CCS. 10 ³ /mL	Máximo CCS .10 ³ /mL
SCN Discreto (0 a 9 col.)	342.00 ^a	19.000	5904.0
SCP Discreto (0 a 9 col.)	348.50 ^b	15.000	3322.0
SCN Moderado (10 a 29 col.)	356.50 ^c	45.000	3365.0
SCP Moderado (10 a 29 col.)	962.00	47.000	7496.0
SCN Exuberante (≥ 30 col.)	560.50	50.000	8633.0
SCP Exuberante (≥ 30 col.)	1187.5 ^{abc}	46.000	8650.0

*Número estimado classificado como: exuberante (≥ de 30 ufc/0,001mL); moderado (10-29 ufc/0,001mL); discreto(<10 cfc/0,001 ufc/mL).

P < 0,0001, significativa Kruskal-Wallis Teste-ANOVA não paramétrica)

^aP < 0,01 diferença significativa SCN Discreto e SCP exuberante

^bP < 0,001 diferença significativa entre SCP Discreto e SCP exuberante

^cP < 0,01 diferença significativa entre SCN moderado e SCP exuberante

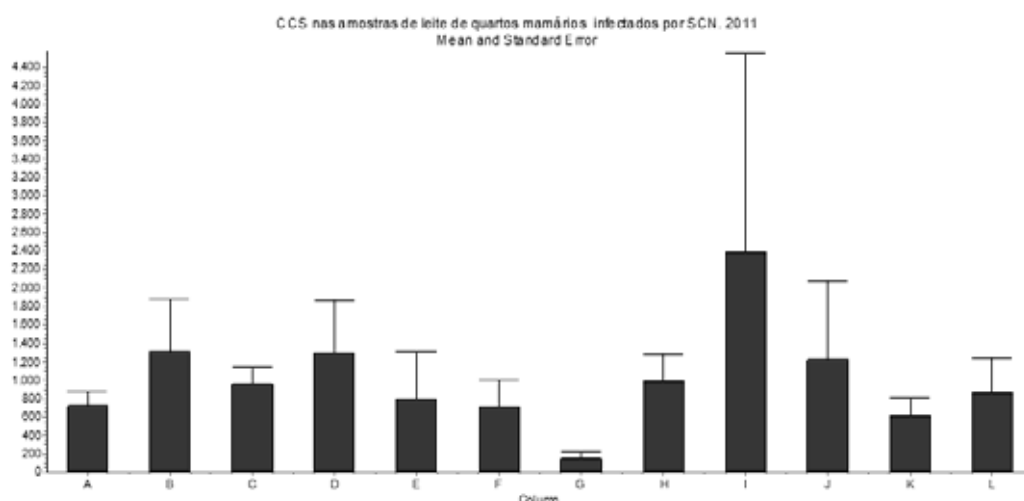
5.3.1. CCS e espécies SCN

A tabela 10 apresenta os resultados da CCS entre 14 das espécies de SCN isoladas. Entretanto, não foram detectadas diferenças estatísticas entre elas. *S. auriculares* (faz. II); *S. capitis* (faz. II); *S. saprophyticus* subsp bovis (faz. VI), *S. chromogenes* (faz. VII), foram isoladas de apenas uma amostra de leite, não foram incluídas nesta tabela (Tabela 10). Resultados ilustrados pela figura 2.

Tabela 10. Contagem de células somáticas de amostras de leite de glândulas mamárias bovinas infectadas por espécies de SCN das dez propriedades leiteiras de diferentes de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

SCN	Mediana CCS .10 ³ /mL	Mínimo CCS .10 ³ /mL	Máximo CCS .10 ³ /mL
<i>S.epidermidis</i>	465,0	19,0	2.158,0
<i>S. hyicus</i>	472,0	48,0	8.633,0
<i>S. warneri</i>	472,0	45,0	5.904,0
<i>S. xylosus</i>	838,0	105,0	4.465,0
<i>S. haemolyticus</i>	348,5	200,0	2.308,0
<i>S. cohnii</i> subsp <i>cohnii</i>	436,0	387,0	1.582,0
<i>S. pasteurii</i>	108,0	30,0	343,0
<i>S. sciuri</i> subsp	1.240,5	73,0	1.373,0
<i>S. hominis</i>	459,0	22,0	6.706,0
<i>S. schleiferi</i> subsp <i>schleiferi</i>	134,0	45,0	5.324,0
<i>S. saprophyticus</i> subsp <i>sapro</i>	460,0	368,0	1.000,0
<i>S. simulans</i>	712,0	310,0	1.572,0
<i>S. saccharolyticus</i>	458,0	300,0	616,0
<i>S. lugdunensis</i>	207,5	86,0	329,0

P = 0,7204 considerado não significante (Teste Kruskal-Wallis /ANOVA não paramétrico)



Coluna A= *S.epidermidis*

Coluna B= *S. hyicus*

Coluna C= *S. warneri*

Coluna D= *S. xylosus*
 Coluna E= *S. haemolyticus*
 Coluna F= *S. cohnii subsp cohnii*
 Coluna G= *S. pasteurii*
 Coluna H= *S. sciuri subsp sciuri*
 Coluna I= *S. hominis*
 Coluna J= *S. schleiferi subsp schleiferi*
 Coluna K= *S. saprophyticus subsp saprophyticus*
 Coluna L= *S. simulans*

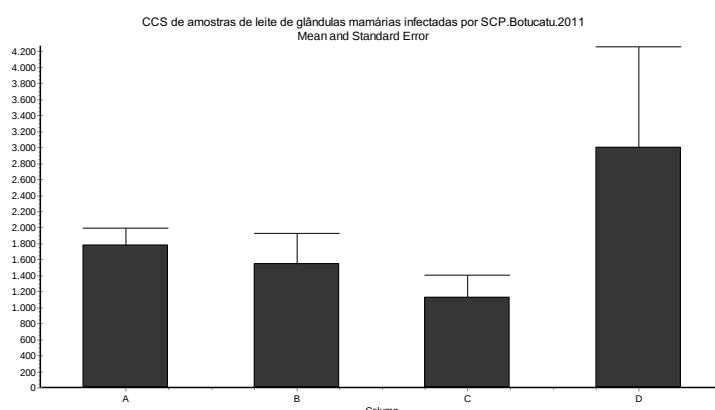
Figura 2. Contagem de células somáticas em amostras de leite de glândulas mamárias bovinas infectadas por espécies de SCN de dez propriedades leiteiras de diferentes de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

A tabela 11 apresenta os resultados da CCS entre as espécies de SCP isoladas. Resultados ilustrados pela figura 3.

Tabela 11. Contagem de células somáticas de amostras de leite de glândulas mamárias bovinas infectadas por espécies de SCP das dez propriedades leiteiras de diferentes de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

SCP	Mediana CCS .10 ³ /mL	Mínimo CCS .10 ³ /mL	Máximo CCS .10 ³ /mL
<i>S. aureus</i>	972,5	26,0	8.650,0
<i>S. intermedius</i>	1.211,5	33,0	7.496,0
<i>S. hyicus</i>	582,0	60,0	3.322,0
<i>S. schleiferi subsp coagulans</i>	2.199,0	15,0	6.597,0

P= 0,4617 não significativo (Teste Kruskal-Wallis /ANOVA não paramétrico)



Colunas: A= *S. aureus*, B= *S. intermedius*, C= *S. hyicus*; D= *S. schleiferi subsp coagulans*

Figura 3. Contagem de células somáticas em amostras de leite de glândulas mamárias bovinas infectadas por espécies de SCP de dez propriedades leiteiras de diferentes regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

5.4. Enterotoxinas

A frequência na detecção de genes codificadores dos diferentes tipos clássicos de enterotoxinas estafilocócicas em SCP e SCN isolados de casos de mastite em bovinos em dez fazendas de cinco regiões de São Paulo está apresentada na tabela 12.

Tabela 12. Frequência de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas em isolados de SCP e SCN isolados de casos de mastite em bovinos em propriedade leiteiras do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

<i>Enterotoxinas</i>	SCP		SCN	
	No.	%	No.	%
<i>Sea</i>	15	9,5	59	35,1
<i>Seb</i>	7	4,4	12	7,1
<i>Sec</i>	8	5,0	11	6,5
<i>Sed</i>	3	1,9	3	1,8
<i>sea + seb + sec</i>	2	1,3	0	0
<i>sec + sed</i>	7	4,4	3	1,8
<i>sea + sec</i>	1	0,6	6	3,6
<i>sea + sec + sed</i>	2	1,3	6	3,6
<i>seb + sec</i>	0	0	1	0,6
<i>sea + sed</i>	0	0	1	0,6
<i>sea + seb</i>	2	1,3	9	5,3
Positivo	47*	34,8	85*	66,4
Negativo	88	66,2	43	33,6
Total	135		128	

*P < 0.0001, (Fisher's Exact Test) a detecção de genes codificadores de enterotoxinas foi superior em SCN isolados de mastite bovina que em SCP.

Na tabela 13, foram comparadas as proporções de isolados SCP e SCN positivos para a presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas isolados de casos de mastite em bovinos em propriedade leiteiras do estado de São Paulo. Verificou-se que os isolados SCN apresentaram positividade significativamente maior ($P < 0,0001$) em relação aos SCP, quanto à presença de genes codificadores de enterotoxinas.

Tabela 13. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em espécies de SCN e SCP isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Enterotoxinas*	Positivas	Negativas	Total
SCN	85 ^a (66,4%)	43(33,6%)	128
SCP	47 ^a (34,8%)	88(65,2%)	135
Total	132	131	263

*Genes codificadores de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus* detectados por PCR em isolados de mastite bovina

^aP < 0,0001, diferença significativa (Teste de Exato de Fisher)

Nas tabelas 14, 15, 16, comparou-se a presença de genes codificadores de enterotoxinas entre as principais espécies de SCN isoladas e em relação a isolados de *S.aureus*. Foram detectadas diferenças significantes, em *S. warneri* a presença destes genes foi superior a *S. aureus* (P = 0,0001); também em *S. epidermidis* a presença destes genes foi superior a *S. aureus* (P = 0,0178) e assim como, também em *S. hyicus* foi superior a *S. aureus* (P =0,0227)

Tabela 14. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em linhagens de *S. warneri* e *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Enterotoxinas*	Positivas	Negativas	Total
<i>S. warneri</i>	28 ^a (70%)	12(30%)	40
<i>S. aureus</i>	29 ^a (32,2%)	61(58,8%)	90

*Genes codificadores de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus* detectados por PCR em isolados de mastite bovina

P = 0.0001,significante (Fisher's Exact Test)

Tabela 15. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em linhagens de *S. epidermidis* e *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Enterotoxinas*	Positivas	Negativas	Total
<i>S. epidermidis</i>	12 ^a (63,2%)	7(36,8%)	19
<i>S. aureus</i>	29 ^a (32,2%)	61(58,8%)	90

*Genes codificadores de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus* detectados por PCR em isolados de mastite bovina

^aP = 0.0178,significante (Fisher's Exact Test)

Tabela 16. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em linhagens de *S. hyicus* e *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Enterotoxinas*	Positivas	Negativas	Total
<i>S. hyicus</i>	13 ^a (81,3%)	3(19,7%)	16
<i>S. aureus</i>	29 ^a (32,2%)	61(58,8%)	90

*Genes codificadores de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus* detectados por PCR em isolados de mastite bovina

^aP = 0,0227,significante (Fisher's Exact Test)

Entretanto, quando se comparou a presença de genes codificadores das enterotoxinas entre as diferentes espécies de SCN não foram detectadas diferenças estatisticamente significante (Tabelas 17, 18).

Tabela 17. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em linhagens de SCN: *S. warneri* e *S. epidermidis*, isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Enterotoxinas*	Positivas	Negativas	Total
<i>S. warneri</i>	28(70%)	12(30%)	40
<i>S. epidermidis</i>	12(63,1%)	7(36,8%)	19

*Genes codificadores de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus* detectados por PCR em isolados de mastite bovina

P = 0,7663, não significante (Fisher's Exact Test)

Tabela 18. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em linhagens de SCN: *S. warneri* e *S. hyicus* isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Enterotoxinas*	Positivas	Negativas	Total
<i>S. warneri</i>	28(70%)	12(30%)	40
<i>S. hyicus</i>	13(81,3%)	3(19,7%)	16

*Genes codificadores de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus* detectados por PCR em isolados de mastite bovina

P = 0,5133, não significante (Fisher's Exact Test)

Na tabela 19 estão apresentados os resultados da pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas em 135 espécies de SCP isolados de casos de mastite das dez propriedades leiteiras. Verificou-se que 45 dos isolados foram positivos e, quando se comparou a detecção de genes codificadores de

enterotoxinas entre as espécies SCP, que os isolados de *S.aureus* foram significativamente superiores aos isolados *S. intermedius* e *S. hyicus* e *S. schleiferi subsp coagulans*.

Tabela 19. Genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas detectados por PCR em linhagens de SCP: isoladas de casos de mastite bovina de animais de dez fazendas de regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Enterotoxinas*	Positivas
<i>S. aureus</i>	29 ^a (64,4%)
<i>S. intermedius</i>	6 ^b (13,3%)
<i>S. hyicus</i>	9 ^b (20%)
<i>S. schleiferi subsp coagulans</i>	1 ^b (2,2%)
Total	45

P < 0.0001, letras diferentes diferença estatisticamente significante (Fisher's Exact Test),

A frequência na detecção de genes codificadores dos diferentes tipos clássicos de enterotoxinas estafilocócicas em espécies de SCN foi apresentada em número e porcentagem na tabela 20 e em espécies de SCP isolados de casos de mastite em bovinos em dez fazendas de cinco regiões de São Paulo, estão dispostos na tabela 21. Verificou-se que predominantemente foram detectados genes codificadores para sea entre as espécies de SCN, respectivamente foram positivos para sea: 64,3% dentre *S. warneri*, 50% em *S. epidermidis* e 61,5% em *S. hyicus*. Enquanto que entre as espécies de SCP, não foi detectada predominância, verificou-se uma distribuição entre os quatro tipos de genes. Tanto nas espécies de SCN como nas de SCP foram observados genes codificador para mais de um tipo ou mesmo para três tipos de enterotoxinas em um mesmo isolado.

Tabela 20. Frequência dos tipos de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas nos principais espécies SCN isolados de casos de mastite em bovinos em propriedade leiteiras do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Enterotoxinas	S <i>warneri</i>	%	S. <i>epidermidis</i>	%	S. <i>Hyicus</i>	%
<i>Sea</i>	18	64,3	6	50	8	61,5
<i>Seb</i>	1	3,6	2	16,7	2	15,4
<i>Sec</i>	0		0		1	7,7
<i>Sed</i>	0		1	8,3	0	
<i>sea + seb + sec</i>	0		0		0	
<i>sec + sed</i>	3	10,7	1	8,3	0	
<i>sea + sec</i>	2	7,1	0		0	
<i>sea + sec + sed</i>	2	7,1	2	16,7	0	
<i>seb + sec</i>	1	3,6	0		0	
<i>sea + sed</i>	0		0		0	
<i>sea + seb</i>	1	3,6	0		2	15,4
Positivo	28	70	12	63,2	13	81,25
Negativo	12	30	7	36,8	3	18,75
Total	40		19		16	

P=0,3702 não significante

Tabela 21. Frequência dos tipos de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas nos principais espécies SCP isolados de casos de mastite em bovinos em propriedade leiteiras do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Enterotoxinas	S <i>aureus</i>	%	S. <i>intermedius</i>	%	S. <i>Hyicus</i>	%
<i>Sea</i>	7	24,1	1	16,7	3	33,3
<i>Seb</i>	6	20,7	1	16,7	1	11,1
<i>Sec</i>	4	13,8	1	16,7	3	33,3
<i>Sed</i>	3	10,3	0	0	0	0
<i>sea + seb + sec</i>	3	10,3	0	0	0	0
<i>sec + sed</i>	3	10,3	3	50	1	11,1
<i>sea + sec</i>	2	6,9	0	0	0	0
<i>sea + sec + sed</i>	0	0	0	0	1	11,1
<i>sea + seb</i>	1	3,4	0	0	0	0
Positivo	29	32,2	6	28,6	9	47,4
Negativo	61	67,7	15	71,4	10	52,6
Total	90		21		19	

P=0,0432, significante Kruskal-Wallis Test (Nonparametric ANOVA)

5.5. Resistência aos antimicrobianos

5.5.1. Gene *mecA* e resistência à meticilina

Na Tabela 22 estão apresentados os resultados da pesquisa de gene *mecA* e resistência à meticilina em micro-organismos do gênero *Staphylococcus* isolados de casos de mastite bovina, nas dez fazendas estudadas. O gene *mecA* foi identificado em 38% dos isolados. A resistência à meticilina foi observada em 26,6% dos estafilococos isolados. Em 62% não foi detectado o gene *mecA* e 73,4% dos 263 estafilococos isolados não apresentaram resistência à meticilina. A diferença foi estatisticamente significativa quando se comparou *mecA* positivo e *mecA* negativo ($P < 0,001$). Foi também significativa entre isolados resistentes e sensíveis à meticilina ($P < 0,001$), *mecA* positivos e resistência negativa ($P < 0,01$) e também entre isolados em que não se detectou o gene *mecA* e eram resistentes à meticilina ($P < 0,001$). Entre os 263 micro-organismos do gênero *Staphylococcus* 14,4% (38) foram positivas para *mecA* e apresentaram simultaneamente resistência à meticilina.

Tabela 22. Resistência à metilicina e mecA em 263 linhagens do gênero *Staphylococcus* isolados de mastite bovina em dez fazendas do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Fazendas	mecA positiva		mec A negativa-		Resistência positiva		Resistência negativa	
	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%
Fazenda I	16	16%	16	9,8%	9	12,8%	23	11,9%
Fazenda II	15	15%	25	15,3%	10	14,3%	30	15,5%
Fazenda III	10	10%	35	21,5%	11	15,7%	34	17,6%
Fazenda IV	7	7%	20	12,3%	10	14,3%	17	8,8%
Fazenda V	10	10%	4	2,4%	4	5,7%	10	5,9%
Fazenda VI	1	1%	10	6,1%	1	1,4%	10	5,9%
Fazenda VII	0	0	6	6,1%	0	0	6	3,1%
Fazenda VIII	1	1%	12	7,4%	3	4,3%	10	5,9%
Fazenda IX	11	11%	3	1,8%	8	11,4%	6	3,1%
Fazenda X	29	29%	32	19,6%	14	20%	47	24,3%
Total	100	38%	163	61,9%	70	26,6%	193	73,4%

P < 0.0001, significativa (Teste Kruskal-Wallis ,ANOVA não paramétrica)

** P<0,01, diferença significativa entre mecA positivo e mecA negativo

*** P<0,001, diferença significativa entre mecA positivo e resistência negativa

*** P<0,001, diferença significativa entre mecA negativo e resistência positiva

*** P<0,001, diferença significativa entre resistência positiva e Resistência negativa

P>0,05, diferença não significativa entre mecA positivo e Resistência positiva

P>0,05, diferença não significativa entre mecA negativo e Resistência negativa

Na tabela 23 estão apresentados os resultados da pesquisa de gene *mecA* e resistência à metilicina em *S. aureus*, em SCN e em outros SCP que não *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina. O gene *mecA* foi identificado em 45,6% das 90 linhagens de *S. aureus* isolados e a resistência à metilicina foi observada em 27,8 %. Em 21,1% das 90 linhagens de *S. aureus* detectou-se *mecA* e simultaneamente foi observada resistência à metilicina.

Tabela 23. Gene *mecA* e resistência à metilicina em 263 linhagens do gênero *Staphylococcus* isolados de mastite bovina. Botucatu, SP, 2011.

<i>Staphylococcus</i> spp	<i>mecA</i> +	<i>mecA</i> -	<i>mecA</i> + resistencia	Resistência	Sensibilidade
<i>S. aureus</i> (90)	41(45,6%)	49(54,4%)	19(21,1%)	25(27,8%)	65(72,2%)
SCP (45)	18(40%)	27(60%)	4(8,9%)	13(28,9%)	32(71,1%)
SCN (128)	41(32%)	87(68%)	15(11,7%)	32 (25%)	96(75%)
Total (263)	100(38%)	163(62%)	38(14,4%)	70(26,6%)	193(73,4%)

P = 0,0476, significativa, presença de *mecA* em *S.aureus* foi superior à presença em SCN (teste de Fisher IC 95%)

P= 0,5843, não significativa *mecA* entre *S.aureus* e SCP

P=0,6428 não significativa resistência à metilicina entre *S.aureus* e SCN

P=0,6932, considered não significativa a resistência à metilicina entre SCP e SCN.

P= 0.0868, não significativa presença de *mecA* e resistência à metilicina resistente *S.aureus* e SCN

Pela análise da tabela 24, verifica-se que uma grande porcentagem dos isolados SCN dos quais se detectou gene *mecA*, não estavam expressando uma vez que muitos isolados foram metilicina sensíveis, apenas 11,7 % dos isolados foram *mecA* positivo e metilicina resistentes.

Tabela 24. Presença de *mecA* e resistência à metilicina em espécies de SCN isolados das amostras de leite de glândulas mamárias bovinas infectadas das dez propriedades leiteiras de diferentes regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

SCN	<i>mecA</i> positivo Nº (%)	<i>mecA</i> negativo Nº (%)	<i>mecA</i> positivo e Metilicina resistente	Metilicina resistente Nº (%)	Metilicina sensível Nº (%)
<i>S. epidermidis</i>	6 (31,6%)	13 (68,4)	3(15,8%)	4 (21,1%)	15(78,9%)
<i>S. hyicus</i>	9 (56,3%)	7 (43,7%)	1(6,25%)	2 (12,5%)	14(87,5%)
<i>S. warneri</i>	13(32,5%)	27(67,5%)	7(17,5%)	13(32,5%)	27(67,5%)
<i>S. xylosus</i>	1 (12,5%)	7 (87,5%)	1(12,5%)	2 (25%)	6 (75%)
<i>S. haemolyticus</i>	1	5	0	1	5
<i>S. cohnii subsp cohnii</i>	2	2	0	0	4
<i>S. pasteurii</i>	1	4	1	2	3
<i>S. sciuri subsp</i>	1	2	0	1	2
<i>S. hominis</i>	2	4	1	2	4
<i>S. schleiferi subsp schleiferi</i>	2	4	0	2	4
<i>S. saprophyticus subsp saprophyticus</i>	0	3	0	1	2
<i>S. simulans</i>	1	3	0	0	4
<i>S. saccharolyticus</i>	1	1	0	0	2
<i>S. lugdunensis</i>	1	1	1	2	0
<i>S. auricularis</i>	0	1	0	0	1
<i>S. capitis</i>	0	1	0	0	1
<i>S. chromogenes</i>	0	1	0	0	1
<i>S. saprophyticus subsp bovis</i>	0	1	0	0	1
TOTAL	41(32,0%)	87(68%)	15(11,7%)	32(25%)	96(75%)

OBS: não foram calculadas porcentagens devido ao pequeno número de isolados

Ao se analisar a tabela 25, verifica-se que grande porcentagem dos isolados SCP dos quais se detectou gene *mecA* não estavam expressando, apenas 16,3% dos isolados eram *mecA* positivo e metilicina resistentes. A maior porcentagem de isolados *mecA* positivos foi encontrada entre os isolados da espécie *S. aureus*, em 45,6% das linhagens. Entre as principais espécies de SCP detectou-se *mecA* em 45,6% dos isolados de *S. aureus*, em 42,1% de *S. hyicus* isolados e em 38,2 % dos isolados de *S. intermedius*.

Tabela 25. Presença de *mecA* e resistência à metilicina em espécies de SCP isolados das amostras de leite de glândulas mamárias bovinas infectadas em dez propriedades leiteiras de diferentes regiões do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

SCN	<i>mec A</i> positivo Nº (%)	<i>mec A</i> negativo Nº (%)	<i>mec A</i> positivo e Metilicina resistente	Metilicina resistente Nº (%)	Metilicina sensível Nº (%)
<i>S. aureus</i>	41(45,6%)	49(54,4%)	19(21,1%)	25(27,8%)	65(72,2%)
<i>S. intermedius</i>	8 (38,1%)	13(61,9%)	0	4(19,1%)	17(80,9%)
<i>S. hyicus</i>	8 (42,3%)	11(57,9%)	2(9,1%)	5(26,3%)	14(73,7%)
<i>S. schleiferi subsp coag.</i>	3 (60%)	2 (40%)	1(4,5%)	1(20%)	4 (80%)
TOTAL	60(44,4)	75(55,6%)	22(16,3%)	35(25,9%)	100(74,1%)

5.5.2. Resistência geral aos antimicrobianos

Na tabela 26 (ilustrada pela Figura 4) estão os resultados da resistência dos 128 SCN isolados a 13 antimicrobianos. Verificou-se que as maiores resistências dos isolados foram frente à ampicilina, penicilina e oxacilina.

Em contraste, as menores taxas de sensibilidade dos isolados foram observadas frente à ciprofloxacina, cotrimoxol e vancomicina. Nenhuma das 128 linhagens de SCN apresentou resistência à enrofloxacina, cefalexina, cefalexina.

Em relação aos 90 *S. aureus* isolados, dados na tabela 27 (ilustrada pela Figura 5), observou-se que também as mais altas resistências foram verificadas frente à ampicilina (35,5%), penicilina (35,5%) e oxacilina (27,8%), e não foi detectada resistência frente à gentamicina, tampouco frente às quinolonas (ciprofloxacina e enrofloxacina).

Tabela 26. Resistência aos antimicrobianos em 128 SCN isolados de casos de mastite bovina em dez fazendas do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Espécies SCN	Isolados	AMP	PEN	COT	OXA	TET	CIP	NEO	GEN	CFE	ENO	VAN	FOX	CEF
<i>S. warneri</i>	40	10	10	1	13	7	1	7	2	1	0	1	0	0
<i>S. epidermidis</i>	19	4	4	1	4	3	1	3	2	0	0	1	0	0
<i>S. hyicus</i>	16	4	4	0	2	2	0	3	0	1	0	0	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	6	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus saprophyticus</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
<i>S. schleiferi</i>	6	2	2	0	2	2	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>S. saccharolyticus</i>	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. cohnii</i>	4	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. hominis</i>	6	2	2	0	2	0	0	3	1	0	0	0	0	0
<i>S. lugdunensi</i>	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. pasteurii</i>	5	2	2	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>S. xyloso</i>	8	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sciuri</i>	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. simulans</i>	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. auriculares</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus bovis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. chromogenes</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. capitis</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	128	31 (24,2%)	31 (24,2%)	2 (1,6%)	31 (24,2%)	17 (13,3%)	2 (1,6%)	18 (14%)	6 (6,7%)	2 (1,6%)	0 (0%)	2 (1,6%)	0 (0%)	0 (0%)

P < 0,0001, diferenças significativas (Kruskal-Wallis Teste, ANOVA não paramétrica)

* P<0.05Amp vs. cot ; ** P<0.01Amp vs. cfe ; * P<0.05Amp vs. cip ; ** P<0.01 Amp vs. eno ; * P<0.05 Amp vs. van ; ** P<0.01 Amp vs. fox ;

*** P<0.001Amp vs. cefa ; ** P<0.01 pen vs. Cfe ; ** P<0.01 pen vs. Eno ; * P<0.05 pen vs. van ; ** P<0.01 pen vs. fox ; *** P<0.001 pen vs. cefa ;

* P<0.05pen vs. ; ** P<0.01oxa vs. cfe ; * P<0.05 pen vs. cip ; ** P<0.01 oxa vs. eno ; * P<0.05 oxa vs. van ; ** P<0.01 oxa vs. fox ; ** P<0.01 oxa vs. cefa

Legenda: AMP=ampicilina, PEN=penicilina, COT=cotrimoxazol, OXA=oxacilina, TET=tetraciclina, CIP=ciprofloxacino, NEO=neomicina, GEN=gentamicina, CFE=cefalexina, ENO=enrofloxacino, VAN=vancomicina, FOX=cefoxitina, CEF=cefalexina

Tabela 27. Resistência aos antimicrobianos em 135 SCP isolados de casos de mastite bovina em dez fazendas do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Espécies SCP	Isolados	AMP	PEN	CO	OXA	TET	CIP	NEO	GEN	CFE	ENO	VAN	FOX	CEF
<i>S. aureus</i>	90	32	32	1	25	4	0	11	0	0	0	3	0	0
<i>S.intermedius</i>	21	4	3	0	4	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>S. hyicus</i>	19	3	3	0	5	0	1	1	1	2	0	1	0	0
<i>S. schleiferi</i> <i>subsp coagulans</i>	5	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Total	135	39	38	1	35	6	1	12	3	2	0	5	0	0
(%)		(28,8)	(28,1)	(0,7)	(25,9)	(4,4)	(0,7)	(8,9)	(2,2)	(1,5)		(3,7)		

P = 0,0337, diferenças significantes (Kruskal-Wallis Teste, ANOVA não paramétrica) em relação à resistência aos antimicrobianos entre *S.aureus* e o grupo de outros SCP

Multirresistência: *S. intermedius*= 1 isolado (resistente a três antimicrobianos: amp, pen e gen; 1 isolado resistente : amp e à van; *S. hyicus* = 1 isolado (resistência a três antimicrobianos: à cipro, à gen e à cfe); *S. schleiferi* subsp *coagulans*= i isolado(resistente à oxa e à neo)

Legenda: AMP=ampicilina, PEN=penicilina, COT=cotrimoxazol, OXA=oxacilina, TET=tetraciclina, CIP=ciprofloxacino, NEO=neomicina, GEN=gentamicina, CFE=cefalexina, ENO=enrofloxacino, VAN=vancomicina, FOX=cefotaxima,

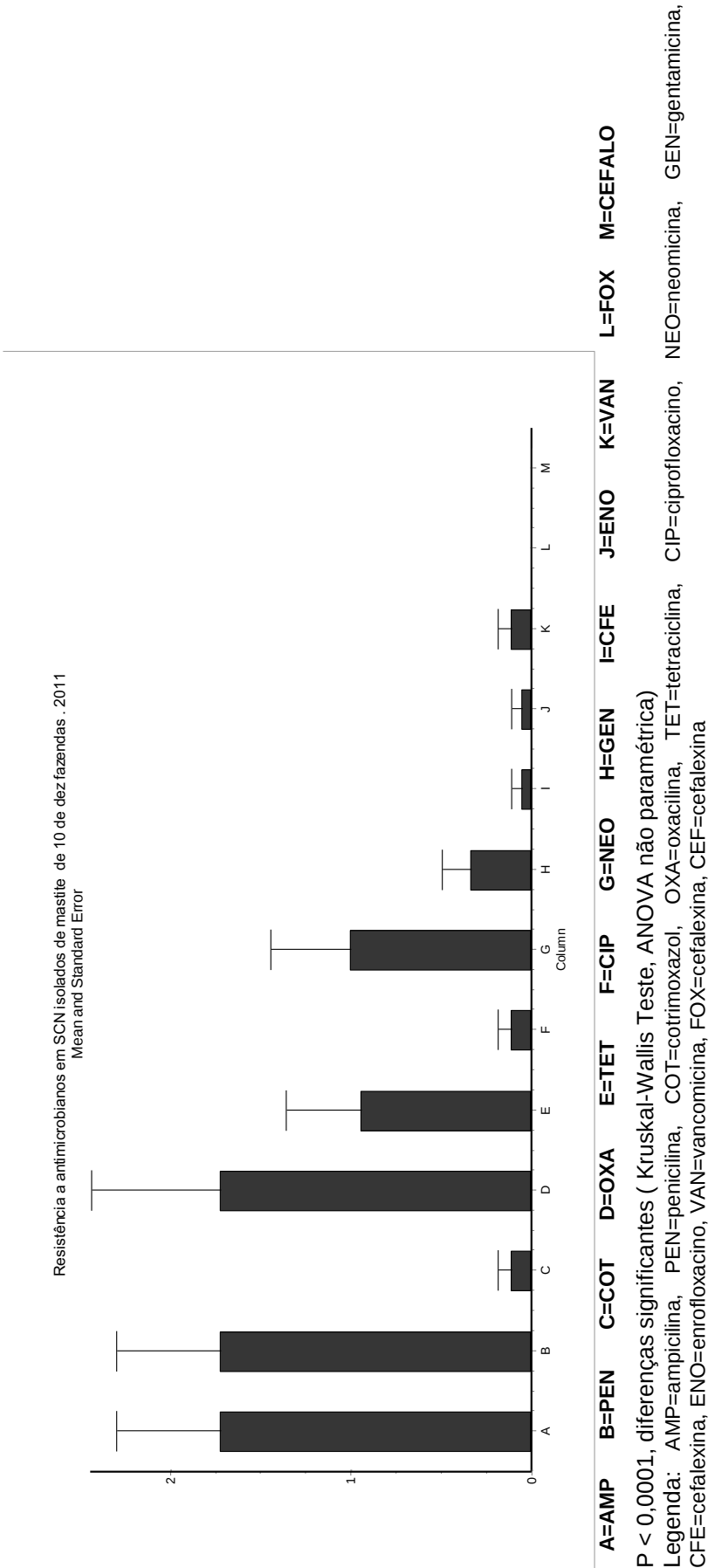


Figura 4. Resistência aos antimicrobianos em 128 SCN isolados de casos de mastite bovina em dez fazendas do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

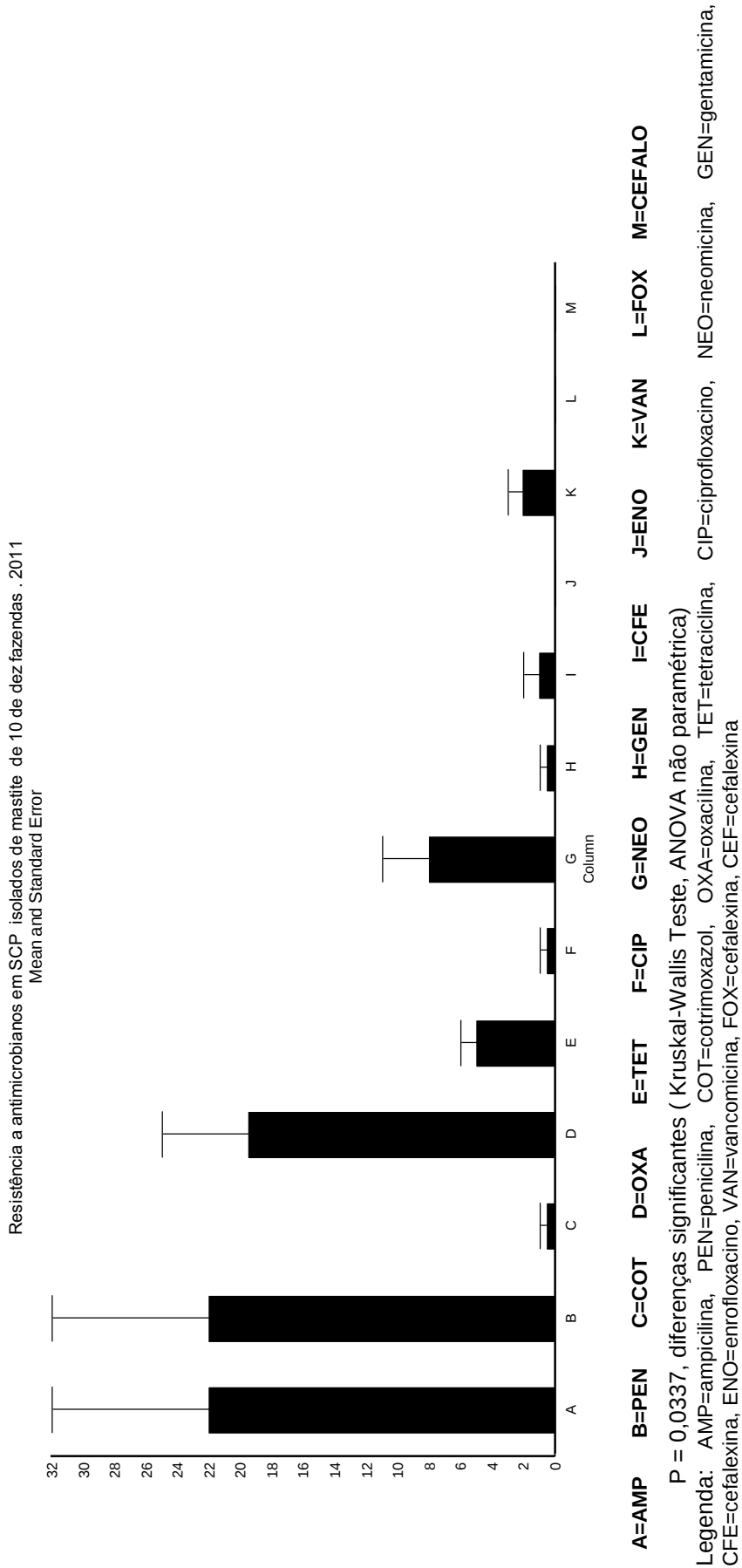


Figura 5. Resistência aos antimicrobianos em 135 SCP isolados de casos de mastite bovina em dez fazendas do estado de São Paulo. Botucatu, 2011.

Tabela 28. Multirresistência aos antimicrobianos em 128 SCN isolados casos de mastite bovina. Botucatu, SP, 2011.

Espécies	Isolados Nº	Multirresistência Antimicronianos	Antimicrobianos
<i>S. warneri</i>	1	2	oxa e gen
	1	2	cip, cfe
	2	3	amp, pen, oxa
	2	3	amp, pen, tet
	1	4	cot, oxa, gen, van
	2	4	amp, pen, oxa, tet
	1	7	amp, pen, oxa, tet, neo, cip, gen
<i>S. epidermidis</i>	1	3	amp, pen e oxa
	1	3	amp pen e tet
	1	3	amp pen e neo
	1	3	tet, neo e gen
	1	6	tet, cip, gen, amp, pen, van
<i>S. hyicus</i>	1	3	cipro, gen e cfe
	1	4	amp, pen, oxa, tet, neo
	1		amp, pen, neo, cfe
<i>S. schleiferi</i> subsp <i>schleiferi</i>	1	5	amp, pen, oxa, tet, neo
<i>S. xilosus</i>	1		amp, pen, oxa
<i>S. hominis</i>	1	3	neo, eno, gen,
<i>S. cohnii</i> subsp <i>cohnii</i>	1	3	amp, pen, tet
<i>S. haemolyticus</i>	1	4	amp, pen, oxa, tet
<i>S. pasteurii</i>	1	4	amp, pen, oxa, tet
Total	24 (18,7%)		

Critério de multirresistência= resistência a dois ou mais antimicrobianos de grupos diferentes ou a três ou mais antimicrobianos do mesmo grupo

Tabela 29. Multirresistência aos antimicrobianos em 135 SCP isolados casos de mastite bovina. Botucatu, SP, 2011.

Espécie	Isolados Nº	Multirresistência Antimicronianos	Antimicrobianos
<i>S. aureus</i>	1	2	neo e van
	1	2	pen e neo
	1	2	gen e eno
	4	3	amp, pen, oxa
	3	3	amp, pen, neo
	1	4	amp, pen, oxa, tet
	1	4	amp, pen, oxa, , neo
	1	5	amp, pen, oxa, tet, van
	2	5	amp, pen, oxa, tet, neo
<i>S. intermedius</i>	1	3	amp, pen e gen
	1	2	amp e van
<i>S. hyicus</i>	1	3	cipro, gen e cfe
<i>S. schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>	1	2	oxa e neo
Total	19(14,1%)		

Critério de multirresistência= resistência a dois ou mais antimicrobianos de grupos diferentes ou a três ou mais antimicrobianos do mesmo grupo

Nas tabelas 28 e 29 estão apresentados por espécie, número de isolados e estão discriminados os antimicrobianos aos quais se detectou multirresistência entre os isolados das espécies de SCN (Tabela 28) e SCP (Tabela 29).

5.5.3. Perfis de resistência aos antimicrobianos

Os principais perfis associando-se resistência a antimicrobianos “in vitro” e mecA observados entre as espécies de SCN isoladas de casos de mastite bovina de cinco regiões do estado de São Paulo com maior frequência, no presente estudo, respectivamente *S. epidermidis*, *S. hyicus* e *S. warneri* estão apresentados nas tabelas 30, 31 e 32.

Na tabela 33 estão reunidos os principais perfis dentre 90 linhagens de *S. aureus* isolados de mastite bovina de cinco regiões do estado de São Paulo.

Tabela 30. Principais perfis de resistência microbiana “in vitro” e mec A de 19 *S. epidermidis* isolados de casos de mastite. Botucatu, SP, 2011.

Perfis	Nº de isolados	%	Fazendas (identificação das fazendas)	Nº de Fazendas
A	2	12,5	(Faz I, V)	2
B	9	47,4	(Faz I,II,III,VII,X)	5
C	2	12,5	(Faz II, III)	2
K	1	5,3	(Faz IV)	1
N	1	5,3	(Faz II)	1
S	1	5,3	(Faz VIII)	1
T	1	5,3	(Faz I)	1
FF	1	5,3	(Faz III)	1
KK	1	5,3	(Faz V)	1

Perfil A → mecA positivo, sensibilidade aos 13 antimicrobianos

Perfil B → mecA negativo sensibilidade aos 13 antimicrobianos

Perfil C → mecA positivo oxa resistente

perfil K → mecA negativo amp, pen e oxa resistente

perfil N → mecA negativo amp e pen resistente

perfil S → mecA negativo amp, pen e neo resistente

perfil T → mecA positivo amp pen tetra resistente

perfil FF → mecA negativo tetra, neo genta resistente

perfil KK → mecA positivo tetra, cipro, genta, van amp, pen resistente

Tabela 31. Principais perfis de resistência microbiana “in vitro” e mecA de 11 *S. hyicus* isolados de casos de mastite. Botucatu, SP, 2011.

Perfis	Nº de isolados	%	Fazendas (identificação das fazendas)	Nº de Fazendas
A	7	43,8	(Faz I,II,III,IV,IX)	5
B	3	18,8	(Faz I,II,III)	3
C	1	6,3	(Faz II)	1
M	1	6,3	(Faz V)	1
N	1	6,3	(Faz II)	1
R	1	6,3	(Faz III)	1
AA	1	6,3	(Faz II)	1
BB	1	6,3	(Faz II)	1

Perfil A→ mecA positivo sensibilidade aos 13 antimicrobianos

Perfil B→ mecA negativo sensibilidade aos 13 antimicrobianos

Perfil C → mecA positivo oxa resistente

perfil M→ mecA positivo amp, pen resistente

perfil N→ mecA negativo amp e pen resistente

perfil R→mecA negativo pen resistente

perfil AA→ mecA negativo amp peni oxa tetra neo resistente

perfil BB→mecA negativo amp pen neo cefa resistente

Tabela 32. Principais perfis de resistência microbiana “in vitro” e mecA 40 *S. warneri* isolados de casos de mastite. Botucatu, SP, 2011.

Perfis	Nº de isolados	%	Fazendas (identificação das fazendas)	Nº de fazendas
A	1	2,5	(Faz II)	1
B	16	40,0	(Faz I,II,III,IV,VI,VII)	6
C	3	7,5	(Faz II,III)	2
D	4	10,	(Faz II,IV)	1
G	1	2,5	(Faz II)	1
K	1	2,5	(Faz III)	1
L	1	2,5	(Faz IV)	1
M	1	2,5	(Faz V)	2
N	2	5,0	(Faz II,III)	1
U	2	5,0	(Faz I,III)	2
W	1	2,5	(Faz II)	1
CC	2	5,0	(Faz II,V)	2
DD	1	2,5	(Faz II)	1
EE	1	2,5	(Faz III)	1
HH	1	2,5	(Faz V)	1
JJ	1	2,5	(Faz IV)	1
MM	1	2,5	(Faz V)	1

Perfil A→ mecA positivo sensibilidade aos 13 antimicrobianos

Perfil B→ mecA negativo sensibilidade aos 13 antimicrobianos

Perfil C → mecA positivo oxa resistente

Perfil D→ mecA negativo oxa resistente

Perfil G→ mecA positivo tet resistente

perfil k→ mecA negativo amp, pen e oxa resistente

perfil L→ mecA positivo amp, pen e oxa resistente

perfil M→ mecA positivo amp, pen resistente

perfil N→ mecA negativo amp e pen resistente

perfil U→mecA positivo amp pen oxa, tetra resistente

perfil W→mec A positivo neo resistente

perfil CC→ mecA negativo tetra resistente

perfil DD→ mecA negativo amp pen tetra resistente

perfil EE→ mecA positivo cotri, oxa, genta, van resistente

perfil HH→ mecA negativo amp pen oxa tetra resistente

perfil JJ→ mecA negativo neo resistente

perfil MM→ mecA negativo cipro e cefal resistente

Tabela 33. Principais perfis de resistência microbiana “in vitro” e mecA de 90 *S. aureus* isolados de casos de mastite. Botucatu, SP, 2011.

Perfis	Nº de isolados	%	Fazendas (identificação das fazendas)	Nº de Faz.
A	20	22,2	(Faz IX, X)	2
B	29	32,2	(Faz. I, III, VII, VIII, IX, X)	6
C	5	5,5	(Faz III, V, IX, X)	4
E	1	1,1	(Faz IV)	1
K	1	1,1	(Faz X)	1
L	3	3,3	(Faz VIII, IX, X)	3
M	3	3,3	(Faz I, X)	2
N	5	5,5	(Faz III, VIII, X)	3
O	2	2,2	(Faz IV, X)	2
P	2	2,2	(Faz VI, X)	1
Q	6	6,7	(Faz VIII, X)	1
R	5	5,5	(Faz VIII, X)	1
S	5	5,5	(Faz VIII, X)	2
T	1	1,1	(Faz IX)	1
II	1	1,1	(Faz VIII)	1

Perfil A → mecA positivo sensibilidade aos 13 antimicrobianos

Perfil B → mecA negativo sensibilidade aos 13 antimicrobianos

Perfil C → mecA positivo oxa resistente

Perfil E → mecA negativo van resistente

Perfil k → mecA negativo amp, pen e oxa resistente

Perfil L → mecA positivo amp, pen e oxa resistente

Perfil M → mecA positivo amp, pen resistente

Perfil N → mecA negativo amp e pen resistente

Perfil O → mecA positivo pen, neo resistente

Perfil P → mecA positivo amp, pen, neo resistente

Perfil Q → mecA positivo pen resistente

perfil R → mecA negativo pen resistente

perfil S → mecA negativo amp, pen e neo resistente

perfil T → mecA positivo amp pen tetra resistente

perfil II → mecA negativo amp peni oxa neo resistente

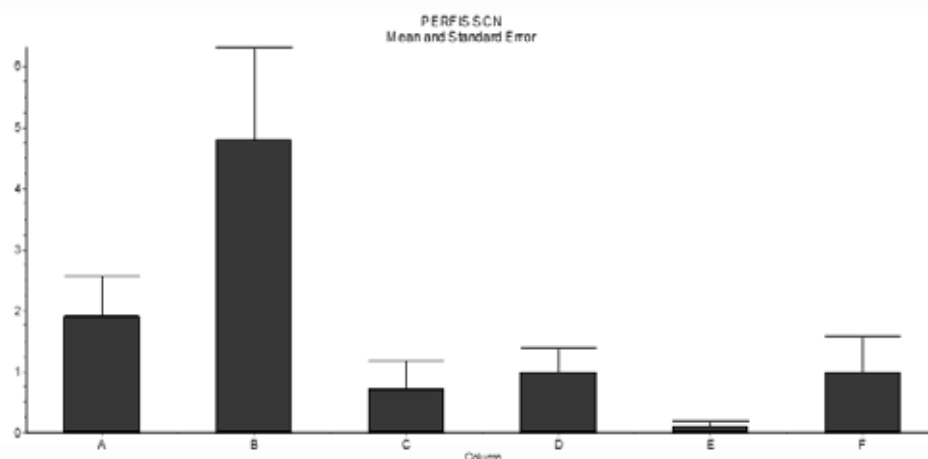


Figura 6. Perfis de resistência microbiana e mecA de isolados SCN de casos de mastite em dez fazendas de cinco regiões do estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2011.

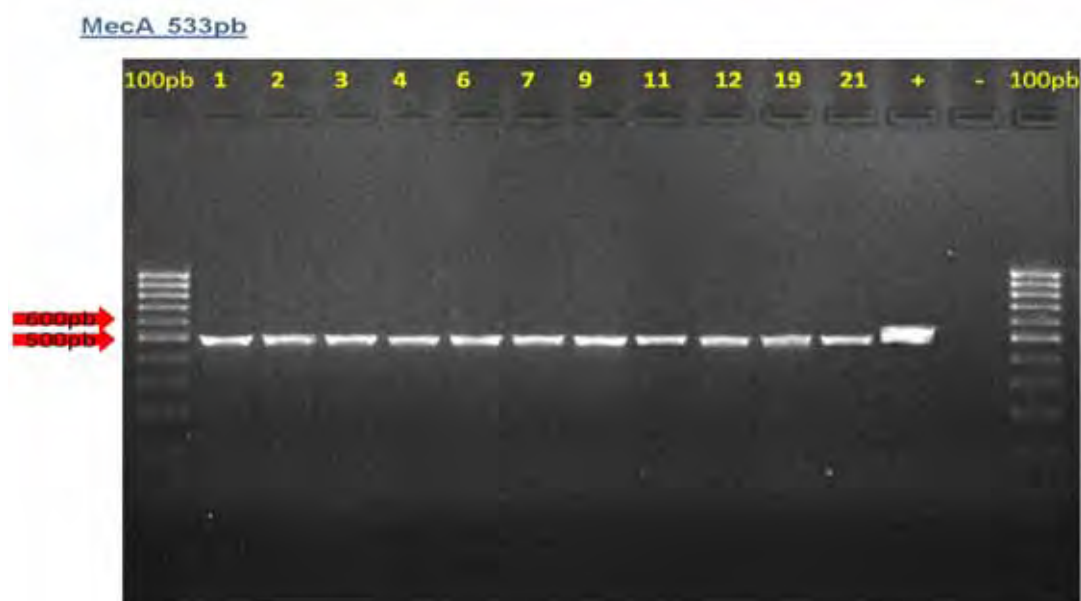


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 2%. Limiar de detecção do gene *mecA* em linhagens de SCN e SCP; controle positivo (*S. aureus* ATCC 33591); controle negativo (água); 100bp DNA ladder.



Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 2%. Limiar de detecção do gene codificador da enterotoxina B - *seb* em linhagens de SCN e SCP; controle positivo (*S. aureus* ATCC 14458); controle negativo (água); 100bp DNA ladder.

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1. Mastite

Mastite constitui o mais sério problema nos rebanhos leiteiros devido a elevada prevalência, prejuízos com a redução da produção, comprometimento funcional da glândula mamária, descarte prematuro de fêmeas e morte ocasional de animais (COSTA, 1998; LANGONI et al., 1998).

Em relação à mastite clínica verificou-se que o nível de ocorrência foi baixo, variou de 0,1 a 1,7%, níveis considerados internacionalmente como adequados (FONSECA & SANTOS, 2000), a menor ocorrência registrada foi na fazenda II (0,1%) e a maior na fazenda I (1,7%).

No tocante aos quartos perdidos que refletem o histórico de mastite clínica nas propriedades leiteiras, observou-se que os mais altos níveis de ocorrência foram registrados nas fazendas III (4,8%), fazenda V (7,1%) e fazenda X (4,1%). Portanto pode-se inferir que foram adotadas medidas efetivas para a redução na ocorrência de mastite, quanto à da propriedade V, embora o nível de mastite clínica registrada (1,7%) esteja entre os níveis internacionalmente aceitos, verificou-se alta ocorrência de mastite subclínica (48,1%), que é considerado elevado, indicando a necessidade de adoção de medidas mais eficazes para controle de mastite. Ao se considerar que os níveis aceitáveis de mastite subclínica são de 15 a 25% de ocorrência além da fazenda V também as propriedades III (35,4%) e VI (33,9%) estão com níveis elevados de mastite subclínica (Tabelas 3 e 4).

A média de mastite subclínica foi de 28,9%, sendo que a ocorrência variou de 18,7%, na fazenda VIII, a 48,1%, na fazenda V. A CCS, parâmetro internacional de qualidade do leite, é diretamente influenciado pelo nível de ocorrência de mastite, principalmente da forma subclínica, uma vez que o leite de animais com mastite clínica deve ser descartado.

Verificou-se, entretanto, que na fazenda VIII, onde foi encontrada a menor ocorrência de casos de mastite subclínica (18,7%) entre as dez estudadas, a CCS de tanque foi de 418.000 células/mL, nível relativamente elevado, superior ao aceito pela União Européia para um leite de qualidade (SCHUKKEN et al., 2003). E esse resultado da CCS de tanque da fazenda VIII foi bastante similar

ao observado na fazenda VI (402.000 células/mL), onde foi registrada uma das mais altas ocorrências de mastite subclínica (33,9%) no presente estudo e o segundo mais alto nível de mastite clínica 1,6%. Por outro lado, a fazenda V cujo nível de ocorrência de mastite subclínica foi de 48%, o mais alto entre as fazendas estudadas, apresentou como esperado também a mais alta CCS de tanque de 700.000 células/mL. Estes resultados corroboram com a importância de não se generalizar conceitos preconcebidos e evidenciam que esse tipo de correlação biológica não segue regras matemáticas. Alertam para a influência de fatores como: características do rebanho e manejo, e principalmente no tocante aos agentes etiológicos dos casos de mastite de cada rebanho.

Uma vez que a CCS como resposta inflamatória e imunológica à infecção será diretamente influenciada pelo sistema imunológico e características genéticas do hospedeiro, quanto pelas características dos micro-organismos, ou seja, quais gêneros, espécies e dos agentes causais envolvidos. O conjunto destas características determina a intensidade e tipo da resposta inflamatória, refletindo na qualidade do leite produzido na fazenda, que é avaliado pela CCS.

6.2. Etiologia

A análise microbiológica demonstrou a ocorrência nas dez fazendas dos mais importantes agentes patogênicos de mastite, que variou entre 0,3% (*Klebsiella oxytoca*) a 36,4% (*Staphylococcus* spp.). Do total o gênero *Staphylococcus* (36,4%), 48,7% foram SCN, 34,2% e *S. aureus* e 17,1% pertenciam a outros SCP. *Streptococcus* spp foram isolados de 23,3% das amostras, das quais 41,7% *Streptococcus. agalactiae*, 41,1% *Streptococcus. dysgalactiae* e 17,3% *Streptococcus uberis*. *Corynebacterium* spp foram isolados de 31,8% dos casos de mastite (Tabela 5). A elevada ocorrência de micro-organismos do gênero *Staphylococcus* (36,4%) está em conformidade ao verificado em outros estudos brasileiros, que tem referido resultados semelhantes. No estado de São Paulo, nas últimas décadas, têm sido publicados diversos estudos abrangentes sobre os principais agentes etiológicos de mastite, que registraram o predomínio da mastite por micro-organismo do gênero *Staphylococcus* (NADER FILHO, 1986; BALDASSI et al.,

1991; BRITO et al., 1998; COSTA et al., 1986, 1995, 2000; LANGONI et al., 1991, 1998, 2001, 2004).

S. aureus, agente clássico de mastite, que apresentou alta ocorrência (34,2%), no presente estudo ainda é considerado importante patógeno humano, devido à produção de muitos fatores de virulência e da alta resistência aos antimicrobianos, como assinalado em diversas pesquisas (AARESTRUP et al., 1998; NADER et al, 2007a).

6.2.1. SCN

Ainda entre os estafilococos, destacaram-se os SCN, que nas últimas décadas vem assumindo papel importante na etiologia da mastite bovina, como registrado em alguns estudos nacionais e internacionais. Piepers et al. (2007) verificaram que 41% das infecções intramamárias eram causadas por SCN e 18% por *S. aureus*, em estudo que abrangeu um total de 178.668 amostras de leite de glândulas mamárias colhidas de fazendas belgas, em um período de três anos. Em certos países, SCN estão entre os patógenos predominantes como nos EUA (WILSON et al., 1997; MACOVEC & RUEGG, 2003), Finlândia (PITKÄLÄ et al., 2004) e Alemanha (TENHAGEN et al., 2006).

Estes patógenos têm sido observados tanto em mastites subclínicas como nas clínicas, em casos onde se verifica acentuada redução na produção leiteira (TIMMS & SCHULTZ, 1987; GRÖHN et al., 2004; DE VLIEGHER et al., 2005; TAPONEN et al., 2006).

A elevada ocorrência de SCN (48,7%), nas propriedades leiteiras estudadas, corrobora com a crescente relevância destes micro-organismos e fundamenta o objetivo do presente estudo em identificar as espécies prevalentes e avaliar o potencial risco à saúde pública, representado por enterotoxinas termorresistentes e resistência a antimicrobianos.

Verificou-se a maior frequência de mastites por SCN nas fazendas II (27,3%) e III (26,7) e as mais baixas nas fazendas X (0,8%) e VIII (1,6%), sendo as diferenças entre estas estatisticamente significantes. A diferença na frequência de isolamento de SCN nas fazendas II e III foi significante maior quando comparada com a das fazendas VIII e X (Tabela 6).

Em relação às espécies de SCN isoladas de casos de mastite bovina, Nickerson et al.(1995) referiram que *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. chromogenes* são espécies encontradas com maior frequência.

Brabes et al. (1999) isolaram: *S. sciuri*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. hominis*, *S. warneri* e *S. caprae* de 127 amostras de leite de animais com mastite. No mesmo estudo foi verificada a produção de enterotoxinas por cinco isolados de *S. sciuri* e por um isolado de *S. chromogenes*.

Costa et al. (2000) identificaram as seguintes espécies de SCN: *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*. Em contraste, no presente estudo as espécies de SCN mais frequentemente isoladas foram: *S. warneri* (31, 3%), *S. epidermidis* (14,8%) e *S. hyicus* (12,5%), como se verifica pela análise da tabela 6. Essas espécies têm sido igualmente citadas como as de maior ocorrência. Costa et al. (2008), estudaram casos de mastite por SCN em bovinos leiteiros de fazendas de São Paulo e Pernambuco e identificaram as seguintes espécies: *S. warneri* (45,5%), *S. hyicus* (18,2%), *S. chromogenes* (14,3%), *S. epidermidis* (5,2%), *S. saprophyticus* (5,2%), *S. haemolyticus* (52%), *S. capitis* (2,6%); *S. simulans* (1,3%), *S. xylosus* (1,3%), *S. hominis* (1,3%).

Em relação à dispersão, verificou-se o isolamento de *S. warneri*, *S. epidermidis* e *S. hyicus*, na maioria das propriedades estudadas, respectivamente *S. epidermidis* em 8, *S. warneri* em 7 e *S. hyicus* em 6 fazendas, enquanto, algumas espécies foram encontradas em apenas uma, como: *S. auriculares* (faz II); *S. capitis* (faz II); *S. saprophyticus* subsp bovis (faz VI), *S. chromogenes* (faz VII), como se verifica pelos dados apresentados na tabela 6.

É importante referir que nenhuma das espécies do gênero *Staphylococcus*, nem mesmo *S. aureus*, foi registrada em todas as dez fazendas estudadas, o que reforça a importância da avaliação microbiológica periódica de amostras de leite em programas de monitoramento nas propriedades leiteiras.

Surpreende o fato de *S. chromogenes* ter sido isolado de apenas um caso de mastite em uma das fazendas, uma vez que foi referido ser um dos

SCN de maior frequência na etiologia de mastite nos EUA (NICKERSON et al., 1995) e já ter sido isolado em outros estudos brasileiros (BRABES et al., 1999; COSTA et al., 2000 e 2008). Tal fato demonstra que programas de controle muitas vezes devem ser específicos e de acordo com a etiologia da mastite presente nos animais das fazendas.

Por outro lado, é importante destacar o fato de terem sido isoladas de casos de mastite bovina espécies muito pouco citadas na literatura, como: *S. auriculares*; *S. cohnii subsp cohnii*, *S. lugdunensis*, *S. pasteurii*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus subsp bovis*, *S. schleiferi subsp schleiferi*. Esses casos sugerem que a transferência horizontal de fatores de virulência e de resistência entre as espécies seja condizente com o aumento da patogenicidade. A maioria dos genes codificadores de SEs, por exemplo, estão localizados em elementos móveis, como plasmídeos, bacteriófagos ou em ilhas de patogeneidade (ZHANG et al., 1998, LINDSAY et al., 1998). Desta forma, a transferência horizontal desses fatores de virulência entre espécies e cepas não é um fenômeno raro.

Alguns dos fatores de virulência facultam a disseminação dos micro-organismos ao vencerem as defesas do hospedeiro, propiciando colonização em tecidos e órgãos. A infecção da glândula mamária determina a resposta inflamatória, a mastite.

6.3. CCS

A invasão do tecido glandular provoca lesão tecidual com a consequente ativação da cascata do ácido aracdônico, ativando cascata de complemento e outros mecanismos de defesa, humoral e celular. Os fatores quimiotáticos vão atrair mais fagócitos para o interior da glândula mamária intensificando a resposta celular, que se refletirá na elevação da CCS, que é constituída por PMN, MN e células epiteliais. A resposta inflamatória na glândula mamária é constituída de 80 a 90 % por células polimorfonucleares neutrófilos (PAAPE, 1977). A migração de PMN para o leite é detectável após três horas do início do processo inflamatório, constituindo a defesa inicial. As células somáticas presentes no leite são polimorfonucleares neutrófilos (PMN), mononucleares (MN) e células epiteliais. Benites et al. (2000), no Brasil observaram que em

processos inflamatórios agudos, 98,7% de PMN e 14,3% de MN encontravam-se no lúmen alveolar e nos parênquimas glandulares, enquanto nos processos crônicos 51,9% eram MN e apenas 48,4% eram PMN.

De acordo com Thiers et al. (2001) a CCS total reflete a extensão do processo inflamatório, enquanto a contagem diferencial permite verificar o estágio da inflamação ou a evolução do processo inflamatório.

No presente estudo a intensidade do processo inflamatório foi avaliada por CCS. Foram analisados os resultados de CCS de amostras de leite de 263 casos de mastite bovina por micro-organismos do gênero *Staphylococcus*. Foram comparadas as CCS dos 128 casos de mastite por SCN com a CCS dos 135 casos SCP. A CCS no leite de animais com mastite por SCP ($1.325,3 \times 10^3$ células/mL) foi significativamente superior à observada nos casos por SCN ($991,58 \times 10^3$ células/mL). Na tabela 8, pode-se observar, entretanto, que os valores máximos e de CCS detectados em ambos os grupos foram semelhantes, de $8.633,0 \times 10^3$ células/mL em SCN e $8.650,0 \times 10^3$ células/mL, demonstrando a capacidade dos SCN suscitarem processo inflamatório de elevada intensidade caracterizada pelo refletido na resposta celular.

A resposta inflamatória em CCS foi também avaliada em relação à intensidade da infecção quanto ao número de colônias (ufc) de SCN e SCP isoladas de amostras de leite dos 263 casos de mastite bovina por micro-organismos do gênero *Staphylococcus* e os resultados apresentados na tabela 9. A análise dessa tabela mostrou que a intensidade da infecção avaliada em u.f.c. refletiu na intensidade do processo inflamatório estimada em CCS, pois foi detectada diferença estatisticamente significativa quando se comparou a CCS nos casos SCP com crescimento discreto e SCP com crescimento exuberante ($P < 0.001$).

É evidente que a CCS alta seja parâmetro negativo quando se considera a qualidade do leite, pois constitui resposta de defesa da glândula mamária, portanto uma consequência e não uma causa. Mesmo assim, tem-se discutido a utilização da CCS para seleção genética dos bovinos leiteiros, sendo defendido por alguns que a seleção para redução da CCS poderia diminuir a susceptibilidade à mastite (PHILIPSSON et al., 1995). Contrariamente, ao se considerar que a elevação da CCS é um dos mecanismos utilizado para o hospedeiro se defender dos patógenos na glândula mamária, a seleção para

CCS muito baixas poderá diminuir a resistência dos animais à mastite (SURIYASATHAPORN et al., 2000).

6.3.1. CCS e espécies SCN

Costa et al. (2008) estudaram casos de mastite por SCN em bovinos leiteiros, os autores referiram que em relação à intensidade do processo inflamatório avaliada pela CCS foram verificadas diferenças estatisticamente significantes ($P < 0.0001$) entre CCS dos casos de mastite por SCN clínica ($5310,2 \times 10^3$), subclínica ($421,1 \times 10^3$) e negativos ($52,1 \times 10^3$). E, ressaltaram a importância do desenvolvimento de outros estudos para melhor conhecimento da mastite por estes micro-organismos tendo em vista a prevalência e a intensidade do processo inflamatório dos casos de mastite por SCN manifestada pelas elevadas CCS.

Na tabela 10 foram comparados os resultados da CCS entre 14 das espécies de SCN isoladas. Verificou-se, entretanto, que não foram detectadas diferenças estatísticas entre elas. Como, *S. auriculares* (faz II), *S. capitis* (faz II), *S. saprophyticus* subsp bovis (faz VI) e *S. chromogenes* (faz VII) foram isoladas de apenas uma amostra de leite, estes não foram incluídos nesta tabela.

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram verificar o impacto na qualidade do leite representado pela ocorrência de mastites por estes micro-organismos, uma vez que várias espécies apresentaram médias maiores e/ou próximas a um milhão de células somáticas por mililitro de leite (*S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi*, *S. warneri*, *S. sciuri* subsp *sciuri*) como pode ser observado pela análise da tabela 9. Em uma das espécies, *S. hominis* detectou-se média de CCS superior a dois milhões de células somáticas por mililitro de leite, somente duas espécies (*S. pasteurii* e *S. lugdunensis*) mostraram médias de CCS inferiores a 400.000 células/mL de leite, que é considerado o valor limite para leite de qualidade. E algumas como *S. hyicus* atingiram valores máximos de CCS superior a 8 milhões de células por mililitro de leite.

O reflexo na qualidade do leite representado por casos de mastite subclínica por algumas destas espécies como *S. warneri* em que a média de CCS foi de 960.100 células/mL de leite, sendo o valor máximo de 5.904.000 células/mL de leite, e que foi isolada de vários casos de mastite subclínica em

algumas fazendas é significativa. Resultado semelhante também foi assinalado por Costa et al. (2008) que relataram em alguns dos casos de mastite por *S. warneri* e *S. saprophyticus* que a CCS foi superior a 7.000×10^3 células/mL de leite, evidenciando a importância de mastite por SCN na qualidade do leite e a patogenicidade destas espécies nas infecções mamárias, uma vez que a CCS baixa é parâmetro para o pagamento por qualidade.

No presente estudo, na faz. III, na qual foram isolados *S. warneri*, de 14 casos de mastite pode-se fazer uma estimativa em um caso concreto. Uma vez que a média diária de produção por animal na faz. III, era de mais de 35 litros de leite, poder-se-ia estimar que o impacto dessas mastites no leite do tanque de refrigeração, como sendo da ordem de 407.400.000.000 células somáticas, ou seja, mais de 400 bilhões de células somáticas adicionadas ao leite dos demais animais no tanque, uma vez que o leite de animais com mastite subclínica é aproveitado habitualmente e somente o leite dos casos clínicos de mastite são descartados.

Deve-se referir que CCS é um dos parâmetros internacionais de qualidade do leite que foi também adotado no Brasil desde a publicação da Instrução Normativa n. 51 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), e o padrão estabelecido para CCS para as regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul, a ser adotado a partir de julho de 2011 será de no máximo 400.000 células por mL de leite e a partir de julho de 2012, para as regiões Norte e Nordeste. Está vigorando, portanto, até o mês de junho, ainda o limite de 750.000 células por mL. O leite com valores de CCS acima desse limite embora ainda esteja sendo comprado pela indústria, porém por um valor menor, deverá futuramente ser rejeitado pelos laticínios em atenção à normativa n.51 (BRASIL, 2002).

A alta celularidade no leite reflete diretamente a ocorrência de mastite no rebanho, o que corresponde não só ao prejuízo econômico na propriedade leiteira, principalmente por redução na produção, mas determina a redução nos constituintes nutricionais do produto e um considerável prejuízo para a indústria, prejudicando a qualidade dos derivados lácteos. Seegers et al. (2003) referiram aumento na proteólise em leite com CCS elevada, que compromete a produção de derivados lácteos, particularmente os queijos.

Contudo, como foi ressaltado por Leite et al. (2001), no Brasil é prática relativamente comum a utilização de leite proveniente de animais com mastite, na fabricação de queijos dos tipos “Minas Frescal” e “Minas Padrão”, devido principalmente à falta de conhecimento do produtor rural e mesmo por alguns laticínios que não recusam leite de má qualidade. No mesmo estudo, Leite et al. (2001) demonstraram que o leite “mastítico”, ou melhor, leite oriundo de animais com mastite apresentava contagem elevada de mesófilos totais, da ordem de $3,1 \times 10^{10}$ ufc/mL e $3,6 \times 10^6$ ufc/mL de *Staphylococcus*.

A Portaria 146, de março de 1996, da Secretaria de Vigilância Sanitária, estabeleceu em relação a queijos, que o produto deve apresentar menos que 10^3 ufc/g de *S. aureus*.

Muito embora o padrão normativo tenha sido estabelecido com limites definidos apenas para a espécie *S. aureus*, as evidentes implicações na sanidade das glândulas mamárias infectadas por algumas das espécies de SCN isoladas no presente estudo, com acentuada elevação na CCS merecem uma atenção maior dos técnicos e das autoridades, pelo comprometimento da qualidade do leite.

6.4. Enterotoxinas

A consciência que a emergência dos SCN na etiologia da mastite consiste problema à saúde do consumidor em virtude da produção de fatores de virulência, tais como as enterotoxinas termoestáveis, que são resistentes à pasteurização e mesmo à fervura, por intervalo de tempo superior até mesmo a 15 minutos, motivou que se investigasse os genes e a capacidade de produção dessas enterotoxinas pelos SCN isolados de mastite bovina nas fazendas estudadas.

Desta forma, as infecções das glândulas mamárias por SCN podem comprometer a saúde do consumidor, não só pela veiculação desses micro-organismos pelo leite e derivados láteos, mas deve-se ainda considerar o risco à saúde pública pela produção de enterotoxinas que, quando presentes no alimento, determinam casos de intoxicações alimentares. Foi estabelecido ser necessário menos de 1mg de toxina para desencadear os sinais característicos de intoxicação estafilocócica. A ingestão de 10^5 ufc de *Staphylococcus* por

grama ou mililitro de alimento é suficiente para provocar um quadro de toxinfecção (Bergdoll, 1989).

O período de incubação da intoxicação estafilocócica após a ingestão do alimento contaminado é curto (CARMO, 2001). Os sintomas variam de acordo com a susceptibilidade individual, sendo mais graves em recém-nascidos, idosos e pessoas acometidas de doenças crônicas imunossupressoras (CLIVER, 1994).

Carmo et al. (2004) relataram grave surto de intoxicação alimentar por estafilococos ocorrido em Minas Gerais onde aproximadamente 8.000 pessoas foram acometidas pelo consumo de alimentos e, destes, 16 vieram a óbito. Faccioli (2010), em estudo realizado no estado de São Paulo, evidenciou com a utilização de PCR a presença de *S. aureus* em 99% das 104 amostras de leite de tanques de refrigeração de propriedades leiteiras examinadas. Com moderada concordância com o microbiológico nas amostras positivas, detectaram os genes codificadores das enterotoxinas *sea* (43,27%), *seb* (23,27%), *sec* (58,5%), *sed* (1,28%) e verificaram pelo método de RPLA em 9% das amostras de leite enterotoxinas (SEs) em quantidade que variou de 1 a 5 ng/mL.

Os resultados obtidos no presente estudo, demonstraram que em 66,4% dos SCN isolados de casos de mastite bovina, nas dez fazendas estudadas foram detectados genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas clássicas: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*. Estes resultados obtidos reforçam os achados de autores brasileiros e internacionais, que verificaram a ocorrência de espécies de SCN isolados de mastite bovina produtoras de enterotoxinas, com predomínio dos tipos A,B,C e D (BRABES et al.,1999).

Verificou-se que o gene *sea* (35,1 %) codificador de enterotoxina SEA, foi o mais frequentemente detectado e o menos detectado foi *sed* (1,8 %) codificador da enterotoxina SED, entre os SCN isolados de casos de mastite bovina das dez fazendas (Tabela 12). Predominantemente foram detectados genes codificadores para *sea* entre as espécies de SCN mais isoladas. Desta forma, foram positivos para *sea* 64,3% dentre os isolados de *S. warneri*, 50% em isolados de *S. epidermidis* e 61,5% em *S. hyicus* (Tabela 20). Enquanto que entre as espécies de SCP, não foi detectada qualquer predominância, observou-se uma distribuição equivalente entre os quatro tipos clássicos de

genes codificadores de enterotoxina entre os isolados (Tabela 21). Digno de nota que alguns dos isolados, tanto nas espécies de SCN como nas de SCP, apresentaram simultaneamente genes codificadores para dois ou três diferentes tipos de enterotoxinas estafilocócicas.

Varshney et al. (2009) detectaram, em média, cinco diferentes genes codificadores de enterotoxinas entre *S. aureus* isolados de diferentes afecções.

SEA é mundialmente a mais frequente causa de intoxicação estafilocócica (DINGES et al., 2000; ARGUDÍN et al., 2010). Pinchuk et al. (2010) referiram também que a mais frequente enterotoxina estafilocócica associada às intoxicações humanas de origem alimentar é SEA, seguida por SED.

Relatos de surtos de intoxicação estafilocócica associados com espécies coagulase negativa do gênero *Staphylococcus* têm sido publicados (BRECKINRIDGE & BERGDOLL, 1971; VERAS et al., 2003).

No presente estudo foram comparadas as proporções de isolados SCP e SCN positivos para a presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas isolados de casos de mastite em bovinos. Verificou-se que, no geral os isolados SCN apresentaram positividade significativamente maior ($P < 0.0001$) em relação aos SCP, quanto à presença de genes codificadores de enterotoxinas.

Pimentel et al. (2002) constataram que 24,6% dos *pools* de amostras de SCP que produziram algum tipo de toxina, assim como, 41,3% dos *pools* de amostras de SCN eram enterotoxigênicos, e concluíram que, no caso de leite cru, espécies não produtoras de coagulase produziram enterotoxinas em maior frequência. Esses resultados concordam com os obtidos no presente estudo uma vez que foi encontrado a presença de genes codificadores de enterotoxinas em proporção estatisticamente maior entre os SCN (66,4%) isolados de mastite em relação aos SCP (34,8%). Assim, os SCN teriam potencialmente maior possibilidade de expressar a produção de enterotoxinas.

Ao se cotejar a capacidade potencial de produção de enterotoxinas, com base na detecção de genes codificadores por PCR, entre as espécies mais isoladas dos SCN (*S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. hyicus*) com os isolados de *S. aureus*, foram observadas diferenças estatisticamente significantes com efeito, a detecção de genes codificadores destas enterotoxinas foi superior nas

principais espécies de SCN isoladas em relação aos isolados de *S. aureus*, que apresentaram genes codificadores em 32,2% dos isolados. Em *S. warneri*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* a presença destes genes foi estatisticamente superior a *S. aureus*. Entretanto, quando se comparou a presença de genes codificadores das enterotoxinas entre as principais espécies de SCN não foram detectadas diferenças estatisticamente significante (Tabelas 17, 18).

Ao passo que ao se analisar a presença de gene codificadores de enterotoxinas em espécies dos 135 SCP isolados nas dez propriedades leiteiras, detectou-se que 45 dos isolados foram positivos. A comparação entre as espécies de SCP em relação à presença desses genes demonstrou que os isolados de *S. aureus* apresentavam porcentagem significativamente superior aos isolados *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. schleiferi subsp coagulans* (Tabela 19).

Silva et al., (1999) avaliaram 127 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite de bovinos leiteiros do estado de Minas Gerais e detectaram a produção de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) em 30% das amostras de *S. aureus* isoladas de mastite bovina (19% SED, 8% SEB, 8% SEC e 3% SEA).

Os resultados obtidos no presente estudo reforçam a assertiva de Lamaita (2003) ao referir que os padrões legais para alimentos especificam apenas a presença das espécies coagulase positiva e enfatizou a necessidade de revisão da legislação brasileira, para incluir estafilococos coagulase negativa, dada a importância deste grupo de patógenos no tocante à segurança alimentar.

6.5. Resistência aos antimicrobianos

Outros importantes fatores de virulência do gênero *Staphylococcus* está relacionado à resistência aos antimicrobianos, representando sério problema na sanidade animal por dificultar a terapia e, conseqüentemente, o controle de casos de mastite. Determinam prejuízos devido aos insucessos terapêuticos, resultando em gastos com medicamentos e descarte do leite durante tratamentos infrutíferos.

Deve-se ainda acrescentar que muitas vezes o insucesso terapêutico traz como consequência glândulas mamárias afuncionais. Este achado também foi observado em todos os rebanhos das dez fazendas amostradas e que na tabela 3 figuram em porcentagem de quartos perdidos e esses quartos afuncionais muitas vezes determinam o descarte prematuro do animal. Ademais, cabe ressaltar que o tratamento em alguns casos mais severos pode não impedir a morte do animal.

No estado de São Paulo a resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. e outros agentes causais de mastite foi avaliada por diversos pesquisadores nos últimas décadas (SCHOCKEN-ITURRINO & NADER FILHO, 1984; COSTA et al., 1985; NADER FILHO et al., 1986; FAGLIARI et al., 1990; BALDASSI et al., 1991; LANGONI et al., 1991; COSTA, 1999; MORENO et al., 1997; NADER FILHO et al., 2007a).

Linhagens de *S. aureus* resistentes aos antimicrobianos figuram como problema mundial, e o controle de sua disseminação considerados importante desafio para os profissionais de saúde. Há numerosos relatos da disseminação de linhagens resistentes aos betalactâmicos, anteriormente eficazes no tratamento das infecções estafilocócicas. A modificação das proteínas ligantes de penicilina (PBP's), sintetizadas pelo gene *mecA* se constitui em um dos principais mecanismos de resistência descritos (AARESTRUP et al., 1998).

No entanto, ainda são pontuais os estudos quanto à resistência aos antimicrobianos entre espécies de estafilococos coagulase negativa. Guimarães et al. (2009) avaliaram a resistência aos antimicrobianos em 92 SCN isolados de amostras de leite de vacas em lactação de propriedades leiteiras brasileiras e verificaram resistência frente à penicilina e à ampicilina em 21% dos isolados e à tetraciclina em 13%. Detectaram também resistência múltipla a dois ou mais antimicrobianos em 7% dos isolados.

A resistência bacteriana é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes que codificam diferentes mecanismos bioquímicos, impedindo a ação de diversos fármacos. Constitui relevante problema de saúde pública pelo risco de transmissão cruzada interespecífica de linhagens resistentes, pelo consumo de alimentos de origem animal. Desta forma, o problema do aumento da resistência bacteriana nos humanos não é somente

devido ao uso intensivo e/ou indevido destes fármacos, mas também devido à transmissão via alimentos de origem animal (STÖHR & WEGENER, 2001)

A possibilidade da transmissão interespecífica de populações de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos de uso humano representa sério risco à saúde pública. Uma das espécies de SCN mais frequentemente isoladas no presente estudo, *Staphylococcus epidermidis*, é internacionalmente considerado um dos principais SCN isolados de infecções nosocomiais, causando sérios problemas entre recém-nascidos, bem como pacientes imunocomprometidos (FREDHEIM et al., 2009). Entre os medicamentos mais utilizados no tratamento desses pacientes estão antimicrobianos do grupo dos betalactâmicos, como a meticilina. Foi avaliado no presente estudo o comportamento *S. epidermidis* e das demais espécies de SCN frente aos antimicrobianos (Tabela 26). Pesquisou-se não somente a expressão da resistência, como também a presença de *mecA* gene codificador da resistência à meticilina, que se presente, constitui risco potencial para expressão de resistência (Tabelas 23, 24, 25). Chu et al. (2008) registraram que as endocardites causadas por SCN meticilina-resistentes ocasionaram maior taxa de mortalidade (40%) em relação a SCN meticilina-sensíveis (16%).

6.5.1. Gene *mecA* e resistência à meticilina

Meticilina é um betalactâmico semissintético. A resistência a este antibiótico está ligada ao gene *mecA* que codifica uma proteína penicilina-ligante, designada como PBP2a, que permite a síntese da parede celular mesmo na presença de concentrações bactericidas de betalactâmicos, porque PBP2a tem uma baixa afinidade por betalactâmicos (PINCHUK, et al. 2010). *S. aureus* meticilina resistentes (MRSA) são considerados, mundialmente, sério problema de Saúde Pública e que vem crescendo nas últimas décadas. Em 2003, 60% dos isolados de UTI eram MRSA e a maioria dos MRSA eram também produtores de toxinas (PINCHUK et al, 2010).

Os resultados da pesquisa do gene *mecA* e resistência à meticilina em micro-organismos do gênero *Staphylococcus* isolados de casos de mastite bovina, nas dez fazendas estudadas, mostraram que gene *mecA* foi

identificado em 38% dos 263 isolados. A resistência à meticilina foi observada em 26,6% dos estafilococos isolados, o que significa que uma parte dos mecA positivos, não expressaram a resistência à meticilina. Em 62% dos isolados não foi detectado gene mecA e 73,4% dos 263 estafilococos isolados não apresentaram resistência à meticilina. A diferença foi estatisticamente significativa quando se comparou mecA positivo e mecA negativo ($P < 0,001$), foi também significativa entre isolados resistentes e sensíveis à meticilina ($P < 0,001$), mecA positivos e resistência negativa ($P < 0,01$) e também entre isolados em que não se detectou o gene mecA e eram resistentes à meticilina ($P < 0,001$). Entre os 263 micro-organismos do gênero *Staphylococcus* 14,4% (38) foram positivos para mecA e apresentaram simultaneamente resistência à meticilina (Tabela 23).

O gene mecA foi identificado em 45,6% das 90 linhagens de *S. aureus* isolados e a resistência à meticilina foi observada em 27,8 %. Em 21,1% das 90 linhagens *S. aureus* detectou-se mecA e simultaneamente foi observada resistência à meticilina, portanto, nem todos mecA positivos expressaram a resistência à meticilina, como também foi observado entre espécies SCN (Tabela 28). O mesmo se verificou em relação aos demais SCP e em relação aos SCN, cujos resultados estão na Tabela 23. Esses resultados indicam a presença de outros mecanismos de resistência além dos codificados por mecA.

Entre os SCN 32% apresentaram gene mecA e 25% foram resistentes à meticilina. A presença de mecA em isolados de *S. aureus* foi estatisticamente superior aos detectados em SCN, porém em relação à resistência à meticilina o mesmo não foi observado. Entre os SCN 11% apresentaram simultaneamente mecA e resistência à meticilina, porém quando comparados com *S. aureus* e SCP outros que não *S. aureus*, não foram detectadas diferenças significantes. (Tabela 23).

6.5.2. Resistência geral aos antimicrobianos

Ao ser avaliada a resistência dos 128 SCN isolados a 13 antimicrobianos, verificou-se que as maiores resistências foram frente à ampicilina, penicilina e oxacilina, resultados que são semelhantes ao verificado por Guimarães et al., (2009). Em contraste, as menores taxas de resistência dos isolados foram frente à ciprofloxacina, cotrimoxazol e vancomicina.

Nenhuma das 128 amostras de SCN apresentou resistência à enrofloxacina, cefalotina, cefoxitina (Tabela 26).

Em relação aos 90 *S. aureus* isolados (Tabela 27) e dos 45 isolados das demais espécies de SCP observou-se que também as mais altas resistências foram verificadas frente à ampicilina (28,8%), penicilina (28,1%) e oxacilina (25,9%), e não foi detectada resistência dos isolados frente à gentamicina e tampouco às fluorquinolonas (ciprofloxacina e enrofloxacina). Verificou-se que 9/21 isolados de *S. intermedius* e 11/19 isolados de *S. hyicus* foram resistentes à ampicilina, penicilina e oxacilina

Nader Filho et al. (2007b) encontraram resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo em relação a maior resistência dos isolados frente à ampicilina e penicilina, bem como a baixa resistência frente à gentamicina. Entretanto, esses autores observaram elevada sensibilidade à oxacilina, fato não observado no presente estudo. Nader Filho et al. (2007b) estudaram a sensibilidade antimicrobiana “in vitro”, pela técnica de difusão em discos em 72 *S. aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica, em 10 propriedades rurais do estado de São Paulo e verificaram maior sensibilidade das linhagens à gentamicina (98,6%) e à eritromicina (98,6%), seguidos por estreptomicina (94,4%), oxacilina (84,7%), novobiocina (73,4%), vancomicina (72,2%), ampicilina (4,2%) e a penicilina (2,8%).

A elevada resistência simultânea à penicilina e à ampicilina observada no presente estudo, também foi observada por Lange et al. (1997) no Rio Grande do Sul, Raimundo et al. (1999) e Pereira (2001) em Minas Gerais. Nader Filho et al. (2007b), em São Paulo, além da alta resistência concomitante à ampicilina e penicilina, referiram, ainda, que as 72 (100%) cepas estudadas apresentaram resistência a pelo menos dois antimicrobianos.

Foi observada multirresistência em espécies de isolados SCN e SCP frente aos antimicrobianos testados, utilizando-se como critério multirresistência quando determinado isolado apresentava resistência a dois ou mais antimicrobianos de grupos diferentes ou a três ou mais antimicrobianos do mesmo grupo farmacológico. Foi observado 14,1% de multirresistência entre as espécies de SCP. Destas três *S. aureus* isolados foram resistentes a cinco antimicrobianos, dos quais dois resistentes à ampicilina, penicilina, oxacilina, tetraciclina e neomicina, (betalactâmicos, tetraciclina e aminoglicosídeo),

enquanto outro foi resistente à ampicilina, penicilina, oxacilina, tetraciclina e vancomicina (Tabela 29). Entre os isolados de *S. intermedius*, uma linhagem foi resistente concomitantemente à ampicilina, penicilina e gentamicina e outra à ampicilina e vancomicina.

Entre os isolados das espécies de SCN observou-se multirresistência em 18,7% dos 128 isolados. Em *S. warneri* foi extremamente preocupante, o fato de um dos isolados ter apresentado resistência concomitantemente a sete antimicrobianos: ampicilina, penicilina, oxacilina, tetraciclina e neomicina, ciprofloxacina, gentamicina e outro isolado de *S. epidermidis* foi resistente a cinco antimicrobianos: ampicilina, penicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, gentamicina e vancomicina e ainda, um isolado de *S. hyicus* resistente à ampicilina, penicilina, oxacilina, tetraciclina e neomicina e isolado de *S. schleiferi* subsp *schleiferi* resistente à ampicilina penicilina, oxacilina, tetaciclina e neomicina.

Chu et al. (2008) verificaram que SCN isolados de casos nosocomiais apresentavam taxa de resistência à metilicina superior àquela de isolados dos casos da comunidade, o que determinou a necessidade de terapias alternativas eficazes e estes casos vem sendo tratados com vancomicina.

A vancomicina é considerada na atualidade medicamento de escolha nos tratamentos nosocomiais de infecções por *Staphylococcus* spp., nos casos em que há resistência à metilicina. No presente estudo, observou-se que 3,7% dos isolados de *S. aureus* e 1,6% das amostras de SCN foram resistentes a este antimicrobiano. Essa resistência emergente à vancomicina em estafilococos originários de mastite bovina, também registrada por Costa et al., (2004), que foi também observada por Nader Filho et al (2007b), constitui aspecto que merece preocupação em saúde pública.

6.5.3. Perfis de resistência aos antimicrobianos

Os SCN são responsáveis pela maioria dos episódios de septicemias em UTIs Neonatais, causados principalmente por *S. epidermidis*, enquanto *S. haemolyticus* é o segundo em frequência de isolamento em pacientes com infecções hospitalares (FREDHEIM et al., 2009).

Foram analisados os perfis observados entre as espécies de SCN de isolados de casos de mastite bovina de cinco regiões do estado de São Paulo

com maior frequência, no presente estudo, respectivamente *S. epidermidis*, *S. hyicus* e *S. warneri*, associando-se resistência a antimicrobianos “in vitro” e detecção de *mecA* por PCR (tabelas 30, 31 e 32), ou seja associando-se característica fenotípica à genotípica.

Foram verificados nove perfis de resistência “in vitro” a antimicrobianos e *mecA* entre 19 *S. epidermidis* isolados de casos de mastite em oito das fazendas estudadas. Apenas nas fazendas VI e IX, esta espécie não foi isolada. O perfil de maior ocorrência foi B (47,4%) *mecA* negativo e sensibilidade a todos antimicrobianos. Do perfil A, *mecA* positivo e sensibilidade a todos antimicrobianos testados, foram dois isolados em duas fazendas e do perfil C (12,2%) *mecA* positivo e oxacilina resistente, foram dois isolados em duas fazendas. Os demais perfis foram verificados em um só isolado. O perfil B apresentou a maior dispersão dentre os isolados de *S. epidermidis*, identificado em 5 fazendas.

É preocupante a detecção no presente estudo de *S. epidermidis*, com perfil KK, ou seja, *mecA* positivo e resistência à tetraciclina, à ciprofloxacina, à gentamicina, à ampicilina, à penicilina e à vancomicina, mesmo que tenha sido em uma só propriedade leiteira (faz. V), uma vez que *S. epidermidis* é considerado o mais frequente SCN isolado de severas infecções nosocomiais em humanos (PATEL et al., 2000; RUHE et al., 2004). Verificou-se resistência à vancomicina, que é considerado como de primeira escolha para tratamento nosocomial de casos de infecções severas por estafilococos meticilina resistentes, com resistência simultânea a outros antimicrobianos dos diferentes grupos farmacológicos: quinolonas, aminoglicosídeos, betalactâmicos e tetraciclinas.

Foram detectados nove perfis de resistência “in vitro” aos antimicrobianos testados e *mecA* entre os 11 *S. hyicus* isolados de casos de mastite em seis das fazendas estudadas. O perfil de maior ocorrência foi A (43,8%) *mecA* positivo e sensibilidade a todos antimicrobianos. Do perfil B, *mecA* negativo e sensibilidade a todos antimicrobianos testados, foram três isolados em três fazendas, e os demais perfis corresponderam apenas a um isolado. Em relação à dispersão verificou-se que o perfil A foi identificado em 5 fazendas. Não foi detectado *S. hyicus* com resistência à vancomicina (Tabela 31).

Entre os 40 *S. warneri* isolados de casos de mastite de sete das fazendas estudadas, foram evidenciados 18 perfis de resistência “in vitro” a antimicrobianos e mecA. *S. warneri* só não foi isolado nas fazendas VIII, IX e X. O perfil de maior ocorrência foi B (40%) mecA negativo e sensibilidade a todos antimicrobianos. Do perfil C, mecA negativo e resistência à oxacilina, foram 4 isolados em duas fazendas e do perfil D, mecA negativo e oxacilina resistente, que foram 3 isolados em duas fazendas, os demais perfis foram verificados em um só isolado. Em relação à dispersão verificou-se que o perfil B foi identificado em 6 fazendas. Em uma das fazendas (Faz. V) foi detectado um isolado de perfil PP mecA negativo resistente à ampicilina, penicilina, oxacilina, gentamicina, neomicina, ciprofloxacina e tetraciclina resistente. Outro perfil que chamou atenção foi o EE (Faz. III) que apresentou mecA positivo e resistência a cotrimoxazol, oxacilina, gentamicina e vancomicina o que também constitui motivo para preocupação (Tabela 32).

Foram verificados em 90 *S. aureus*, isolados de casos de mastite em nove das fazendas estudadas, 15 perfis de resistência “in vitro” aos antimicrobianos e mecA. Apenas na fazenda II, não se isolou esta espécie (Tabela 33). Os perfis de maior ocorrência foram perfil A (22,2%) foi mecA positivo e sensibilidade a todos antimicrobianos testados e perfil B (32,2%) mecA negativo e sensibilidade a todos antimicrobianos, perfil Q (6,7%) mec A positivo e penicilina resistente, seguido dos perfis que apresentaram 5,5% de ocorrência, perfil C, mecA positivo e oxacilina resistente, perfil R mecA negativo e penicilina resistente, perfil S mecA negativo e ampicilina, penicilina e oxacilina resistente. Em relação à dispersão verificou-se que o perfil B foi identificado em 6 fazendas e o perfil C em 4 fazendas. É interessante referir a detecção do E em que se verifica mecA negativo e resistência à vancomicina, presente apenas na fazenda IV, devido à gravidade representada pela resistência a esse antimicrobiano, considerado de primeira escolha para tratamento nosocomial de casos de infecções severas por *S. aureus* metilicina resistentes.

Desperta também atenção a fazenda VIII pelo grande número de diferentes perfis isolados na propriedade. Foram detectados sete perfis, o que sugere a aquisição de animais de diversas origens e incorporados diretamente ao rebanho. Provavelmente esta propriedade não cria suas novilhas de

reposição ou recentemente montou seu rebanho por aquisição de várias outras propriedades leiteiras, uma vez que só 11 *S. aureus* foram isolados de mastite nessa fazenda. Por outro lado, não surpreende que se tenha se verificado a presença de 12 diferentes perfis na fazenda X, pois nesta propriedade foram isolados mais de 30% de todos os *S. aureus* identificados nesse estudo.

Nader filho et al, (2007b) concluíram que em razão dos resultados obtidos no estudo de sensibilidade “in vitro” realizado, que para a escolha do medicamento a ser utilizado no tratamento da mastite bovina por *S. aureus*, há uma imperiosa necessidade do conhecimento do perfil de sensibilidade frente aos antibióticos e quimioterápicos das cepas isoladas.

Considera-se extremamente pertinente a assertiva de Nader filho et al, (2007b) em relação à realização de pesquisas sobre os perfis de sensibilidade de *S. aureus* isolados de mastite, mas acrescentar-se-ia, com base no demonstrado pelos resultados do presente estudo, ser igualmente fundamental a realização de estudos sobre os perfis de resistência não só de *S. aureus*, mas dos SCN. A necessidade de pesquisas dessa natureza se deve não só ao estabelecimento de medidas terapêuticas e de controle de mastite, mas também pelas sérias implicações em saúde pública.

Estudos sobre a ocorrência desses micro-organismos em rebanhos de várias regiões de produção leiteira e a pesquisa de fatores de virulência e fatores de resistência são necessárias no intuito de investigar os fatores de virulência, suas principais características epidemiológicas de ocorrência e transmissão (prevalência, incidência e vias de transmissão), pois o maior conhecimento facultaria melhor dimensionamento da participação das espécies de estafilococos coagulase negativas na mastite e o risco à saúde do consumidor e mesmo à saúde pública como um todo, além de proporcionar a adoção de medidas de controle mais efetivas, para minimizar os riscos de agravos aos humanos.

Conclusões

7. Conclusões

1. O presente estudo evidenciou a importância de espécies de SCN na etiologia da mastite bovina pela elevada frequência de ocorrência nos dez rebanhos pesquisados. Pode-se concluir pelo que foi verificado o potencial risco representado por esses micro-organismos à Saúde Pública, uma vez que foram detectados entre esses isolados genes codificadores de enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*), que são importantes fatores de virulência considerando-se o risco das intoxicações de origem alimentar.
2. O comprometimento na qualidade do leite por determinarem significativa elevação da CCS, parâmetro nacional e internacional de qualidade uma vez que os valores máximos de CCS detectados em ambos os grupos foram semelhantes demonstrando a capacidade dos SCN suscitar processo inflamatório de elevada intensidade caracterizada pelo refletido na resposta celular.
3. A alta ocorrência de espécies de SCN como *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. hyicus*, *S. haemolyticus*, ressalta a relevância deste grupo de patógenos na etiologia da mastite em vacas e os riscos em saúde pública, devido à presença de fatores de virulência como genes codificadores de enterotoxinas e fatores de resistência aos antimicrobianos.
4. Considerou-se altamente preocupante a elevada resistência a antimicrobianos de diferentes grupos farmacológicos apresentada por alguns dos isolados, como os isolados de perfil kk de *S. epidermidis* mecA positivo e resistência à tetraciclina, à ciprofloxacina, à gentamicina, à ampicilina, à penicilina e à vancomicina e *S. warneri* de perfil pp mecA negativo e resistência à ampicilina, penicilina oxacilina, cefalexina, gentamicina, neomicina, ciprofloxacina e tetraciclina. Não só pela imposição de restrições ao tratamento dos animais como pela possibilidade da transmissão de resistência cruzada interespecíficas.
5. A relevância de *S. aureus* e de outras espécies dentre os coagulase positivos isolados de casos de mastite das dez fazendas de cinco regiões do estado de São Paulo, como *S. intermedius* e *S. hyicus* na etiologia da mastite e na gênese das intoxicações de origem alimentar em humanos pela presença

de genes codificadores de enterotoxinas e ainda detecção de fatores de resistência como mecA.

Bibliografia

8. Bibliografia

AAERESTRUP, F.M.; BAGER, F.; JENSEN, N.E.; MADSEN, M.; MEYLING, A.; WEGENER, H.C. Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic, zoonotic and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: A baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, v.106, p.745-70, 1998.

AARESTRUP, F. M.; JENSEN, N. E. Prevalence and duration of intramammary infection in Danish heifers during the peripartum period. *Journal of Dairy Science*, v.80, p.307–312, 1997.

AGRAFNP. O Brasil deve exportar 7% da produção de leite em 2017. Canal Rural, 2008. Disponível em <<http://www.canalrural.com.br/canalrural/jsp/default.jsp?uf=1&local=1&action=noticias&id=2209568§ion=>>>. Acesso em 16 maio 2011.

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

ANDRADE, U. V. C.; HARTMANN, W.; MASSON, M. L. Isolamento microbiológico, ontagem de células somáticas e contagem bacteriana total em amostras de leite. *ARS Veterinária*, v. 25, n.3, 129-135, 2009.

ARGUDÍN, M. Á.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, v.2, n.7, p.1751-1773, 2010.

BABA, E.; FUKATA, T.; MATSUMOTO, H. Ecological studies on coagulase-negative staphylococci in and around bovine udder. p.69–75 in Univ. Osaka Prefecture Bull. B 32. University of Osaka Prefecture, Osaka, Japan. 1980.

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

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

BALDASSI, L.; FILHO, M. F.; HIPÓLITO, M.; MOLIN, A. A. P.; CALIL, E.M.B.; PIRES, D.C. Etiologia da mastite subclínica na Bacia Leiteira de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. *Arquivo Instituto Biológico*, v.58, p.29-36, 1991.

BANNERMAN, T.L.; MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER M.A.; YOLKEN, R.H. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically. *American Society Microbiology*, p.384-404, 2003.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BEAN, N. H.; GOULDING, J. S.; DANIELS, M. T.; ANGELO, F. J. Surveillance for food borne disease outbreaks - United States, 1988-1992. *Journal of Food Protection*, v.60, p.1265-1286, 1996.

BENITES, N. R. ; GUERRA, J. L. ; MELVILLE, P. A. ; COSTA, E. O. . Aetiology and Histopathology of Bovine Mastitis of espontaneous occurrence. *Journal of Veterinary Medicine. Series B*, Berlin, v. 49, p. 366-370, 2002.

BENITES, N.R.; MELVILLE, P.A.; COSTA, E.O. Feature and intensity of inflamatory responses in bovine mammary gland, In: Symposium on Immunology of Ruminant Mammary Gland Stresa, Itália, Proceedings, p.30-35, 2000.

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

BERTRAND, J.A. Influence of shipping container preservative and breed on analysis of milk components of shipped samples. *Journal of Dairy Science*, v.6, n.1, p.145-148,1996.

BHATIA, A.; ZAHOR, S. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2007, v.1, n. 3, p. : 188 – 197

BIRGERSSON, A.; JONSSON, P.; HOLMBERG, O. Species identification and some characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine udders. *Veterinary Microbiology*, v.31, p.181–189 1992.

BODDIE, R.L.; NICKERSON, S.C.; OWENS, W.E.; WATTS, J.L. Udder microflora in nonlactating heifers. *Agri-Practice*, v.8, p.22–25 1987.

BRABES, K.C.S.; CARVALHO, E.P.; DIONÍSIO, F.L.; PEREIRA, M.L.; GARINO Jr, F.; COSTA, E.O. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista NAPGAMA*, n.2, p. 4-11, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n.51. Diário Oficial da União, Brasília, 15 de agosto de 2002. Seção 1, p.2-4.

BRASIL. Secretária de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais. Perfil do agronegócio 2003-2009. Belo Horizonte, 142p. 2009,

BRECKINRIDGE, J. C.; BERGDOLL, M. S.. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. *New England Journal of Medicine*, Boston, v. 284, n.10, p. 541-543, 1971.

BRITO, D. D.; SOARES, J. P.; ABDALLAH, V. O. S.; FILHO, P. P. G. Bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* em neonatos: incidência e fatores de risco. *Revista Ciência Médica*, Campinas, v.16, n.2, p.71-77, 2007.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P. Programas de controle das mastites causadas por microrganismos contagiosos e do ambiente. Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 25p. 1998.

CABRAL, K.G.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M.; LANGONI, H.; SÁ, M.E.P.; VICTÓRIA, C.; SILVA, A.V. Pheno and genotyping of *Staphylococcus aureus*,

isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 50, n.11, p.901-909, 2004.

CARDOSO, H.F.T.; CARMO, L.S.; SILVA, N. Detecção da toxina-1 da síndrome do choque tóxico em amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, n. 1, p.7-10, 2000.

CARMO, L.S. Produção e purificação em grande escala das enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB, SEC2, SED e TSST-1 para uso em ensaios imuno-enzimáticos. 2001. 254f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CARMO, L.S.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V.R.; DIAS, R.S.; SOUZA, J.M.; SENA, M.J.; SANTOS, D.A.; SHUPP, J.W.; PEREIRA, R.K.P.; JETT, M.. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incidente. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.1, n.4, p.241-246, 2004.

CHU, V.H; WOODS, C.W.; MIRO, J.M.; HOEN, B.; CABELL, C.H.; PAPPAS, P.A.; FEDERSPIEL, J.; ATHAN, E.; STRYJEWSKI, M.E.; NACINPVICH, F.; MARCO, F.; LEVINE, D.P.; ELLIOTT, T.S.; FORTES, C.Q.; TORNOS, P.; GORDON, D.L.; UTILI, R.; DELAHAYE, F.; COREY, G.R.; FOWLER, V.G. Jr; International Collaboration on Endocarditis-Pro prospective Cohort Study Group: Emergence of coagulase-negative staphylococci as a cause of native valve endocarditis. *Clinical Infectious Disease*, v.46, p.232-242, 2008.

CIMIOTTI, J.P; HAAS, J.P.; DELLA-LATTA, P.; WU, F.; SAIMAN, L.; LARSON, E.L. Prevalence and clinical relevance of *Staphylococcus warneri* in the neonatal intensive care unit Infectious Control Hospital Epidemiology, v.28, p.326-30, 2007.

CLIVER, D.O. Foodborne disease handbook: diseases caused by bacteria. New York: Marcel Dekker, 1994. 613p

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S15. Wayne, PA, USA, 2005.

COSTA, E.O.; COUTINHO, S.D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C.M. Sensibilidade a antibióticos e quimioterápicos de bactérias isoladas de mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.5, p.65-69, 1985.

COSTA, E. O. da; COUTINHO, S. D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C. M.; GAMBALE, W.; GANDRA, C. R. P. Etiologia bacteriana da mastite bovina, no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Microbiologia*, v.17, n.2, p.107-112, 1986.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; VIANNI, F.C.; WHITE, C.R. Prevalence of intramammary infections in primigravid Brazilian dairy heifers. *Preventive Veterinary Medicine*, v.29, p.151-155, 1996.

COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. *Revista Educação Continuada*, v.1, n.1, p.3-9, 1998.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; MELVILLE, P.A. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *Journal of Veterinary Medicine B*, v.45, p.65-71, 1998.

COSTA, E. O. Uma contribuição da pesquisa para melhorar a produção de leite. *Notícias FAPESP*, n.40, p.14-16, 1999.

COSTA, E.O.; GARINO JR, F.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; WATANABE, E.T.; VALLE, C.R. Estudo da etiologia das mastites bovinas nas sete principais bacias leiteiras do Estado de São Paulo. *Revista Napgama*, v.3, n.4, p.6-13, 2000a.

COSTA, E. O.; BENITES, N. R.; GUERRA, J. L.; MELVILLE, P. A. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* spp. isolated from mammary parenchymas of slaughtered dairy cows. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, v. 47, p. 99-103, 2000b.

COSTA, E.O.; GARINO JR, F.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; BUENO, J.A. Resistência aos antimicrobianos de microrganismos do gênero

Staphylococcus isolados de mastite bovina no decênio de 1992 a 2001, *Revista Napgama*, São Paulo, V.7, n.2, p.-13-20, 2004

COSTA, E.O. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite (PNMQL). *Revista Napgama*, São Paulo, v.8, n.2, p.18-21, 2005.

COSTA, E. O.; GUIMARÃES, F. F.; FACCIOLI, P. Y.; SANTOS, F.; LANGONI, H.; ARCARO, J.; PERES, A.; CUNHA, M. L. Identification the coagulase-negative staphylococci isolates from bovine mastitis and evaluation of the inflammatory Proccess. In: XXV JUBILEE WORLD BUIATRICS CONGRESS, 2008, Budapeste. Oral and Poster Abstracts XXV Jubilee World Buiatrics Congress. Budapeste: Alapította, v.130. p.73-73, 2008.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos no tratamento de mastite. Cap. 42. In: Spinosa, H.S.; Górniak, S.L.; Bernardi, M.M. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2011. p.487-500

CUNHA, M.L.R.S., PERESI, E., CALSOLARI, R.A.O., ARAÚJO JÚNIOR, J.P. Detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin-1 genes in *Staphylococcus* with emphasis in coagulase-negative staphylococci. *Microbiology and Immunology*, v.51, n.4, p.381-390, 2007.

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

CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.60, n.1, p.19-24, 2008.

DE VLIEGHER, S.; BARKEMA, H. W.; STRYHN, H.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A. Impact of early lactation somatic cell count in heifers on milk yield over the first lactation. *Journal Dairy Science*, v.88, p.938–947, 2005.

DEVRIESE, L. A.; DE KEYSER, H. Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows. *Journal of Dairy Research*, v.47, p.155–158, 1980.

DINGES, M.M.; ORWIN, P.M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Review*, v.13, p.16-34, 2000.

DORDET-FRISONI, E.; DORCHIES, G.; DE ARAUJO, C.; TALON, R.; LEROY, S. Genomic diversity in *Staphylococcus xylosus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, p.7199–7209, 2007.

EMBRAPA. 2008. Produção Anual Leite por Estado no Brasil, 2007. Disponível em: <<http://www.cnpqi.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/>> Acesso em: 16 de maio de 2011

EUZÉBY, J. list of News names and new combinations previously effectively, but not validly, published. Validation list nº 132. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.60, p.469-472, 2010. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em 24 ago.2010.

FAGLIARI, J.J.; LUCAS, A.; FERREIRA NETO, J.M. Sensibilidade a drogas antimicrobianas de bactérias isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica. *Ciência Veterinária*, v.4, n.2, p.11-13, 1990.

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

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do Leite e Controle de Mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000.

FREDHEIM, E.G.A.; KLINGENBERG, C.; ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; GAUSTAD, P.; FLAEGSTAD, T.; SOLLID, J.E. Biofilm Formation by *Staphylococcus haemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.47, n.4 p.1172-1180, 2009.

FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the manual. In: Boone, DR, Castenholz, RW (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, New York: Berlim: Springer- Verlag, v.1, p.119-166, 2001.

GRÖHN, Y.T.; WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; HERTL, J.A.; SCHULTE, H.; BENNETT, G.; SCHUKKEN, Y. H. Effect of pathogen specific clinical mastitis on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.1619–1628. 2004

GUIMARÃES, F. F., SANTOS, F., G. B; ARCARO, J.; PERES, A. A.; LANGONI, H.; CUNHA, M. L.; COSTA, E. O.. CNS isolates from bovine mastitis antimicrobians susceptibility. *Proceddings Latin-American Buiatric Congress*, Lima, Perú. 2009.

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

GUIMARÃES, F.F.; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. *Revista Veterinária e Zootecnia*, v.16, n.1, p.38-5, 2009.

HARMON, R.J.; LANGLOIS, B.E. Mastitis due to coagulase negative *Staphylococcus* species. *Agri-Practice* v.10, p.29–32, 1989.

HONKANEN-BUZALSKI, T.; MYLLYS, V.; PYÖRÄ, S. Bovine clinical mastitis due to coagulase-negative staphylococci and their susceptibility to antimicrobials. *Journal of Veterinary Medicine B*. v.41, p.344–350, 1994.

IBGE. Produção leiteira brasileira, 2010. Disponível em : <http://www.milkpoint.com.br/estatisticas/producao_mundial.htm> Acesso em: 12 maio 2010

JARP, J. Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. *Veterinary Microbiology*, v.27, p.151–158, 1991.

JAY, J.M. Microbiologia moderna de los alimentos. Zaragoza: Acribia, p.804 1994.

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

KARLOWICZ, M.G.; BUESCHER, E.S.; SURKA, A.E. Fulminant late-onset sepsis in a neonatal intensive care unit, 1988-1997, and the impact of avoiding empiric vancomycin therapy. *Pediatrics*, v.106, p.1387-1390, 2000.

KARMATH, U.C.; SINGER, C.; ISENBERG, H.D. Clinical significance of *Staphylococcus warneri* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, p.261-264, 1992.

KLOOS, W.E. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. *Annual Review of Microbiology*, p.345-592, 1980.

KLOOS, W.E.; BANNERMAN, T.L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Journal Clinical Microbiology*, v.7, p.117-40, 1994.

KLOOS W.E.; SCHLEIFER K.H. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus simulans*. *International Journal System Bacteriology*, v.25, p.62-79, 1975.

KLUYTMANS, J.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. *Journal of Clinical Microbiology*, v.10, p.505–520, 1997.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W.C. Diagnóstico Microbiológico- Texto e Atlas colorido. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 2008. 1760p.

KREDIET, T.G.; JONES, M.E.; JANSSEN, K.; GERARDS, L.J.; FLEER, A. Prevalence of Molecular Types and *mecA* Gene Carriage of Coagulase-Negative Staphylococci in a Neonatal Intensive Care Unit: Relation to Nosocomial Septicemia. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, p.3376-3378, 2001.

LAMAITA, H.C. Frequência de espécies de Staphylococcus, de TSST-1 e de enterotoxinas estafilocócicas em leite cru refrigerado em propriedades de Minas Gerais. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, p. 74. 2003.

LANGE, C.; CARDOSO, M.; PIANTA, C. Epidemiological characterization of *S. aureus* isolated from bovine mastitis in Porto Alegre, Brasil. *Revista de Microbiologia*, v.28, p.215-219, 1997.

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

LANGONI, H.; SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.20, n.5, p.204-209, 1998.

LANGONI, H.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F.; PULGA, M.E.; MARINHO, M.; PRADO, R.B. Utilização da enrofloxacin (Baytril®) no tratamento da mastite bovina estafilocócica. *Revista Ciencia Rural*, v.30, n.1, 2000.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; FILHO, J.R.M.; BALDINI, S. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite subclínica em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Brasil. *ARS Veterinária*, v. 17, n. 3, p. 213-217, 2001.

LANGONI, H.; ARAÚJO, W. N.; VICTÓRIA, C. Contribuição ao estudo das mastites ovinas: aspectos microbiológicos. *Revista Napgama*, v. 7, n.1, p.3-6, 2004.

LEITE, R.L.; CARVALHO, E.P.; MOURA, C.J.; TEIXEIRA, M.L.; PEREIRA, M.L. Estudo das condições higiênicas-sanitárias de queijos “minas frescal” e “minas

padrão” elaborados a partir de leite de proveniente de vacas com mastite clínica. *Revista Instituto Lacticinos Cândido Tostes*, v.56, n.5, p.3-11, 2001.

LINDSAY, J.A.; RUZIN, A.; ROSS, H.F.; KUREPINA, N.; NOVICK, R.P. The Gene for Toxic Shock Toxin Is Carried by a Family of Mobile Pathogenicity Islands in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, v.29, p.527–543, 1998.

LOWRY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*. v.339, p.520-532, 1998.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRIÉS, G.A. Efeitos da contagem de células somáticas na qualidade do leite e a atual situação de rebanhos brasileiros. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.54, n.309, p.10-16, 1999.

MACOVEC, J. A.; RUEGG, P. L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.3466–3472, 2003.

MARTIN, S. E.; MYERS, E.R.; LANDOLO, J. J. *Staphylococcus aureus*. In: HUI, Y.H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J.R. (Ed.). *Foodborn disease handbook – bacterial pathogens*. 2ed. New York: Marcel Dekker. v.1, p.345-381, 2001.

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

MATOS, J.S.; WHITE D.G.; HARMON, R.J.; LANGLOIS, B.E. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. *Journal of Dairy Science*, v.74, p.1544–1549, 1991.

MATTHEWS, K.R.; HARMON R.J.; LANGLOIS, B.E. Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. *Journal of Dairy Science*, v.75, p.1835–1839, 1992.

MEDEIROS, E.S.; MOTA, R.A.; SANTOS, M.V.; FREITAS, M.F.L; JUNIOR, J.W.P.; TELES, J.A.A. Sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus*

spp. isoladas do leite de vacas com mastite subclínica. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.7, p.569-574, 2009.

MELCHÍADES, L.E.A.; VEIGA, V.M.O.; RIBEIRO, M.T. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica bovina. *Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes*, v.48, p.80-81, 1993.

MORENO, G.; LOPES, C. A. M.; GOTTSCHALK, A. F.; MODOLO, J. R. Incidence and characterization of mastitic bovine milk antimicrobial multi-drug resistant bacteria in middle west region of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.34, n.3, p.207-210, 1997.

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

MURRAY, K.; O`ROURKE, A.L.; MCLAY, J.; SIMMONDS, R. Use of ground beef model to assess the effect of the lactoperoxidase system on the growth of *Escherichia coli* O 157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in red meat. *International Journal of Food Microbiology*. v.57, p.147-158, 2000.

MURRAY, P. R.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; BARON, E.J.; LANDRY, M.L. Manual of clinical microbiology. 9. ed. Washington D.C.: ASM Press, 2007, 1773 p.

NADER FILHO, A.; MANGERONA, A.C.S; MOURA, E.S. Eficácia da associação sinérgica de beta-lactâmicos em suspensão oleosa no tratamento intramamário de vacas em lactação. *Revista Napgama*, v.5, n.1, p.20-22, 2002.

NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ROSSI JUNIOR, O.D.; AMARAL, L.A. Sensibilidade dos *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.38, n.4, p.581-588, 1986.

NADER FILHO, A; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. *Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n. 5, p.1316-1318, 2007a.

NADER FILHO, A; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L.A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.74, n. 1, p.1-4, 2007b.

NAGASE, N.; SASAKI, A.; YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; WAKITA, Y.; KITAI S.; KAWANO, J. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.64, p.245-50, 2002.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS) System Report, Data Summary from January 1992-June 2001. *American Journal of Infection Control*, v.29, p.404-421, 2001.

NEVALA, M.; TAPONEN, S.; PYÖRÄ LÄ, S. Bacterial etiology of bovine clinical mastitis—Data from Saari Ambulatory Clinic in 2002–2003. *Suomen Eläinlääkäri-lehti* v.110, p.363–369, 2004.

NICKERSON, S.C. Preventing new *Staphylococcus aureus* mastitis infections. *Veterinary Medicine*, april, p.368-386, 1993.

NICKERSON, S.C.; OWENS, W. E.; BODDIE, R.L. Mastitis in dairy heifers: initial studies on prevalence and control. *Journal of Food Protection*, v.78, n.7, p.1607-1618, 1995.

OLIVEIRA, A.A.; MELO, C.B., AZEVEDO, H.C. Diagnóstico e Determinação Microbiológica da Mastite em Rebanhos Bovinos Leiteiros nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.1, p.226-230, 2009.

OMORI, G.; KATO, Y. A staphylococcal food-poisoning caused by a coagulase-negative strain. *Biken's Journal Berlin*, v.2, p. 92- 92, Jan. 1959.

PAAPE, M.J. The leucocytes as a defense mechanism. *Journal fo American Medical Association*, v.170, n.10, p.1214-1223, 1977.

PATEL, R.; PIPER, K.E.; ROUSE, M.S.; UHL, J.R.; COCKERILL, F.R.III; STECKELBERG, J.M. Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* among staphylococcal isolates causing endocarditis: a 20-year experience. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, p.4262-4263, 2000.

PEREIRA, R.O. Epidemiologia Molecular da Mastite causada por *Staphylococcus aureus*. 2001.52p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista –Jaboticabal, 2001.

PHILIPSSON, J.; RAL, G.; BERGLUND, B. Somatic cell count as a selection criterion for mastitis resistance in dairy cattle. *Livestock Production Science*, v.41, p.195-200, 1995.

PIEPERS, S.; DE MEULEMEESTER, K.; DE AART, L.; OPSOMER, G.; BARKEMA, H. W.; VLIEGHER, S.; Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *Journal Dairy Research*, v.74, p.478-483, 2007.

PIMENTEL, F.E.; DIAS, R.S.; CARMO, L.S. Presença de *Staphylococcus sp* enterotoxigênico e de enterotoxinas em queijo ralado. *Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes*, v.57, p.227-229, 2002.

PINCHUK, I.V.; BESWICK, E.J.; REYES, V.E. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins*, v.2, p.2177-2197, 2010.

PITKÄLÄ, A.; HAVERI, M.; PYÖRÄLÄ, S.; MYLLYS, V.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Bovine Mastitis in Finland 2001 –prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.2433-2441, 2004.

PITTET D.; TARARA, D.; WENZEL, R.P; Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable

mortality. *Journal of the American Medical Association*, v.271, p.1598-1601, 1994.

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

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 10ed. 2007.

RAIMUNDO, O.; DEIGHTON, M.; CAPSTIC, J.; GERRATY, N. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. *Veterinary microbiology*, v.66, n.4, p.275-84, 1999.

RAZONABLE, R. R.; LEWALLEN, D. G.; PATEL, R.; OSMON, D. R.. Vertebral Osteomyelitis and Prosthetic Joint Infection Due to *Staphylococcus simulans*. *Mayo Clinic Proceedings*., v.76, p.1067-1070, 2001.

RUHE, J.; MENON A.; MUSHATT, D.; DEJACE, P.; HASBUN, R.. Non-epidermidis coagulase-negative staphylococcal bacteremia: clinical predictors of true bacteremia. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease*, v.23, p.495-498, 2004.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.S.R.S.; E LIAS, A.O.; VICTORIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, v.41, n.5, p.321-326, 2004.

SABOUR, A.K.R.; GILL J.J.; LEPP, D.; PACAN, J.C.; AHMED, R.; DINGWELL, R.; LESLIE, K. Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in eastern Canadian dairy herds. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, p.3449-3455, 2004.

SANTOS, M.V. Efeito da mastite sobre a qualidade do leite e derivados lácteos. 2º CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, Ribeirão Preto, Anais, p.179-188, 2002

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

SCHALM, O. W., NOORLANDER, D. O. Experimental and observation leading to development of California mastitis test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.139, p. 199-204, 1957.

SCHOKEN-ITURRINO & NADER FILHO, A. Ação de antibióticos e quimioterápicos sobre alguns agentes bacterianos da mastite bovina. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.39, n.233, p.29-33, 1984.

SCHUKKEN, Y.H.; WILSON, D.J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R.N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Veterinary Research*, v.43, n.5, p.579-596, 2003.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Veterinary Research*, v.34, p.475-491, 2003.

SENA, M.J. Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife (PE). 1997 75 p. Tese de doutorado. Escola de Veterinária, UFMG, 2000.

SILVA, N.; CARDOSO, H.F.T.; SENA, M.J.; CARMO, L.S. Produção de toxina-1 da síndrome do choque tóxico por *Staphylococcus aureus* isolados do leite bovino em Minas Gerais. *Revista Napgama*, v.2, n.5, p.12-14, 1999.

SILVA, W.P.; GANDRA, E.A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. *Revista Higiene Alimentar*, v.18, n.122, p. 32-40, 2004.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS FOR PERSONAL COMPUTERS. 1990-1993. GRAPHPAD INSTAT software. 2003.

STÖHR, K.; WEGENER, H. C. Non-human antibiotic use and resistance. *Drugs Resistance Updates*, v.3, p.2007-2009, 2001.

STOLL, B.J.; HANSEN, N.; FANAROFF, A.A.; WRIGHT, L.L.; CARLO, W.A.; EHRENKRANZ, R.A.; LEMONS, J.A.; DONOVAN, E.F.; STARK, A.R.; TYSON, J.E.; OH W.; BAUER, C.R.; KORONES, S.B.; SHANKARAN, S.; LAPTOOK, A.R.; STEVENSON, D.K.; PAPILE, L.A.; POOLE, W.K. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, v.110, p.285-291, 2002.

SURIYASATHAPORN, W; SCHUKKEN, Y; NIELEM, M; BRAND, A. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis en dairy herd. *Journal of Dairy Science*, v.83, p.1248-1255, 2000.

TAN, T.Y.; NG, S.Y.; NG, W.X. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci recovered from nonsterile sites. *Journal of Clinical Microbiology*, v.44, p.3413-4, 2006.

TAPONEN, S.; SIMOJOKI, H.; HAVERI, M.; LARSEN, H. D.; PYÖRÄLÄ, S.. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Veterinary Microbiology*, v.115, p.199–207, 2006.

TAPONEN, S.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J.; SALONIEMI, H.; PYÖRÄLÄ, S. Bovine intramammary infections caused by Coagulase-Negative Staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment Length Polymorphism-Based Analysis. *Journal of Dairy Science*, v.90, p.3301–3307, 2007.

TAPONEN, S.; BJÖRKROTH, J.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *Journal of Dairy Research*, v.75, p.422-429, 2008.

TENHAGEN, B.-A.; KÖSTER, G.; WALLMANN, J.; HEUWIESER, W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial

agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.2542–2551. 2006.

THIERS, F.O.; BENITES, N.R.; COSTA, E.O. proporção de polimorfonucleares neutrófilos (PMN), mononucleares (MN) no leite comparados com os escores de CMT. *Revista Napgama*, São Paulo, v,4, n.3, p3-5, 2001.

THORBERG, B.M.; AARESTRUP, F.M; BRANDSTROM, B.; JONSSON, P.; DANIELSSON-THAM, M.L. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Veterinary Microbiology*, v.115, p.163–172, 2006.

TIMMS, L.L.; SCHULTZ, J.H. Dynamics and significance of coagulase-negative staphylococcal intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, v.70, p.2648–2657, 1987.

TODAR, K. Staphylococcus. Todar's online textbook of bacteriology. Disponível em <<http://www.textbookofbacteriology.net>> 23/05/2002. Acesso em: março 2008.

TODHUNTER, D.A.; CANTWELL, L.L.; SMITH K.L.; HOBLET K.H.; HOGAN, S. Characteristics of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Veterinary Microbiology*, v.34, p.373–380, 1993.

VARSHNEY, A.K.; MEDIAVILLA, J.R.; ROBIOU, N.; GUH, A.; WANG, X.; GIALANELLA, P.; LEVI, M.H.; KREISWIRTH, B.N.; FRIES, B.C. Diverse Enterotoxin Gene Profiles Among Clonal Complexes of *Staphylococcus aureus* Isolates From the Bronx, New York. *Applied Environmental Microbiology*, v.75, p.6839–6849, 2009.

VASCONCELOS, N.G.; CUNHA, M.L.R.S. Staphylococcal enterotoxins: molecular aspects and detection methods. *Journal of Public Health and Epidemiology*, v. 2, n.3, p. 29-42, 2010.

VENKATESH, M.; PLACENCIA, F.; WEISMAN, L. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections in the Neonate and Child: An Update- *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, v.17, n.3, p. 120-127, 2006.

VERAS, J.F.; SANTOS, D.A.; CARMO, L.S. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. *Higiene Alimentar*, v.17, p.218, 2003.

VON EIFF, E.C.; BECKER, K.; MACHKA, K.; STAMMER, H.; PETERS, G. Nasal Carriage As a Source of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. Study Group. *New England Journal of Medicine*, v.344, p.11–16. 2001

WAAGE, S.; MØRK, T.; RØROS, A.; AASLAND, D.; HUNSHAMAR, A.; ØDEGAARD, S. A. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*, v.82, p.712–719, 1999.

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

ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, J.V.; RESENDE, F.D.. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus* custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, p.577-585, 2007.

ZHANG S.; IANDOLO, J.J.; STEWART, G.C. The Enterotoxin D Plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiology Letters*, v.168, p. 227–233, 1998.

Trabalho Científico

9. Trabalho Científico

Artigo redigido de acordo com as normas do periódico científico "Veterinary Microbiology"

ENTEROTOXINS GENES IN COAGULASE NEGATIVE AND COAGULASE POSITIVE *STAPHYLOCOCCI* ISOLATED FROM BOVINE MILK

Felipe de F. Guimarães¹, Diego B. Nóbrega¹, Virginia Bodelão Richine-Pereira¹,
Pâmela Marson¹, Helio Langoni^{1*}

1- Department of Veterinary Hygiene and Public Health, *School of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ)*, São Paulo State University- Botucatu-SP- Brazil

* *Corresponding author:*

Phone: (+55) 14 3811-6270; Fax: (+55) 3811-6273

Adress: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu – Distrito de Rubião Jr., s/n – Botucatu – SP – Brazil- Zip code: 18618-970

E-mail address: felipefreitasguimaraes@hotmail.com

ABSTRACT

38 The purpose of this study was to isolate staphylococci agents of bovine mastitis cases in
 39 ten Brazilian dairy herds, to proceed their identification to the species level, to evaluate
 40 their potential capability in producing enterotoxins. A total 4.592 mammary glands of
 41 1,148 dairy cows were examined by strip cup and CMT. A total of 263 staphylococci
 42 isolates from mastitis cases were, respectively: 48.7% were CNS, 34.2% *S. aureus* and
 43 15.9% other CPS. PCR assay was used to determine the presence of classical
 44 enterotoxin codifying. Among the 128 CNS isolates 17 species causing mastitis were
 45 identified: *S.warneri* (31.3%), *S. epidermidis*(14.8%) and *S.hyicus* (12.5%) were the
 46 more frequently isolated. Among 132 CPS were: *S.aureus* (68.2 %), *S.intermedius*
 47 (15.2%), coagulase positive *S.hyicus* (12.9%) and *S. scheleferi* subsp *coagulans* (3.8%).
 48 Among CNS enterotoxin genes were determined as: 35.1% *sea*, 7.1% *seb*, 6.5% *sec*,
 49 1.8% *sed*) 5.3% both *sea* and *seb*, 3.6% both *sea*, *sec* and *sed*, 1.8% both *sec* and *sed*.
 50 Whereas among CPS isolates the enterotoxin genes were: 9.5% *sea*, 4.4% *seb*, 5.0%
 51 *sec*, 1.9% *sed*; both *sea* and *seb* 1.3%, 1.3% both *sea*, *sec* and *sed*, 4.4 % both *sec* and
 52 *sed*,, 0.6% both *sea* and *seb*. The highest enterotoxigenic potential were found in: *S.*
 53 *hyicus*, 81.3% were positive for enterotoxin genes, 70% *S. warneri* and, 63.1% *S.*
 54 *epidermidis*. In parallel, only 32.2% of *S. aureus* isolates were positive for enterotoxin
 55 genes. These results demonstrated that besides *S. aureus* other staphylococci from
 56 bovine mastitis have a high enterotoxigenic potential, and, represent hazard to
 57 consumer's health.

58 Key words: *S.aureus*, *S.warneri*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S.hyicus*, , CNS and
 59 CPS identification, bovine mastitis, PCR enterotoxin genes

60 INTRODUCTION

61 Food-borne diseases are of major concern worldwide. Food poisoning is a term
 62 used to express any type of disease, illness after consuming food.

63 Recent outbreaks of food-borne diseases highlight the need for reducing
 64 bacterial pathogens in foods of animal origin. Zoonotic bacteria can cause clinical
 65 disease, morbidity and mortality in animals and are a major source of economic loss to
 66 the livestock industry worldwide. Moreover these pathogens could be carried
 67 asymptotically and can be transmitted through the food chain to humans becoming a
 68 risk for the health as food-borne disease (Gaggia et al., 2010).

69 More than 250 different food-borne diseases have been described and bacteria
70 are the causative agents of two thirds of food-borne disease outbreaks (Le Loir et al.,
71 2003). Besides being the more frequent cause, bacterial food poisoning is the most
72 serious type of food poisoning, which may be due to bacterial infection or food
73 intoxication.

74 Among bacteria involved in these diseases, *Staphylococcus aureus* is a leading
75 cause of gastroenteritis resulting from the consumption of a food in which
76 enterotoxigenic staphylococci have grown and produced toxins. They are highly stable,
77 resist most proteolytic enzymes, such as pepsin or trypsin, and thus keep their activity in
78 the digestive tract after ingestion. They also resist chymotrypsine, rennin and papain.
79 Staphylococcal enterotoxins are highly heat resistant. Genes encoding SEs have
80 different genetic supports, most of which are mobile genetic elements, while some of
81 them are chromosomally located, others are carried by phages, whereas others have been
82 found in plasmids. Normally, they exert their effects on the gastrointestinal tract and
83 therefore are called enterotoxins (Bergdoll, 1983).

84 Staphylococcal food poisoning is due to the absorption of staphylococcal
85 enterotoxins preformed in the food. Symptoms are of rapid onset and include nausea
86 and violent vomiting, with or without diarrhea (Bhatia and Zahoor, 2007).

87 While not considered a highly lethal agent due to the low mortality associated
88 with the illness, staphylococcal enterotoxins are considered a potential biological threat
89 because of their stability at high temperatures (100°C for 1 h) and ability to incapacitate
90 individuals for several days to two weeks (Bhatia and Zahoor, 2007).

91 The illness is usually self-limiting and only occasionally it is severe enough to
92 warrant hospitalization. SEA is the most common cause of staphylococcal food
93 poisoning worldwide, but the involvement of other classical SEs has been also
94 demonstrated (Argudín et al., 2010).

95 Forty species of the genus *Staphylococcus* have been identified thus far
96 (Bannerman, 2003). *S. aureus*, a coagulase-positive species which produces several
97 other enzymes and toxins, is the best known and has been frequently implicated in the
98 etiology of a series of infections and intoxications in animals and humans, whereas
99 coagulase-negative staphylococci (CNS), representing the majority of species, have
100 been considered to be saprophytic or rarely pathogenic (Kloos and Schleifer, 1975).

101 Over the last decades, however, CNS have been recognized as the etiological
102 agents of a series of infectious processes, representing the microorganisms most

commonly isolated from human blood cultures and nosocomial infections (Huebner and Goldmann, 1999).

Some studies have suggested an association between CNS, *S. epidermidis*, and nosocomial infections (Vuong and Otto, 2002) with this species being identified in 74 to 92% of patients with bacteremias (Martin et al. 1989). Several studies have reported a series of infections caused by other CNS species (Herwaldt et al. 1996), mainly *S. haemolyticus* which is the second most frequently detected species (Bannerman, 2003).

Safety hazards associated with CNS were mostly limited to the presence of antibiotic resistance and researches have demonstrated that seventy-one percent of the strains possessed at least one gene encoding antibiotic resistance (Even et al., 2010).

Nowadays, CNS had been recognized as important emergent pathogens of bovine mastitis (Macovec and Ruegg, 2003; Nevala et al., 2004; Piepers et al. 2007; Costa et al., 2008) sometimes just as mild mammary gland inflammation but mostly as subclinical and even clinical mastitis reducing milk production (Gröhn et al., 2004; De Vlieghe et al., 2005; Taponem et al., 2006).

Bovine mastitis caused by staphylococci determines relevant economical losses and in milk quality. Considering that milk and dairies have great nutritional relevance and, staphylococcal food poisoning is of major concern in public health programs worldwide, research is also needed for the identification of new potentially enterotoxigenic staphylococci.

Therefore, the purpose of this study was to isolate and identified the main staphylococci species causing bovine mastitis in 10 (ten) Brazilian dairy herds and study their capability in producing the classical enterotoxins, by the detection of the classical enterotoxin codifying genes.

MATERIAL AND METHODS

A total 4.592 mammary glands of 1.148 dairy cows from ten dairy herds, located in five different regions in the state of São Paulo, Brazil, were examined by strip cup and CMT (Schalm & Norlander, 1957), from these 1.318 milk samples were collected for microbiological exams.

The isolates obtained from milk samples were plated onto blood agar and Gram stained in order to guarantee their purity and the preservation of their morphology and specific staining. After confirmation of these characteristics, the isolates were submitted to the catalase and coagulase tests. Bacterial suspensions were inoculated as described

by Kloos and Schleifer, (1975). Readings for the two steps were obtained after 24, 48, and 72 h of incubation at 37°C, and CNS species were identified according to the identification scheme. *Staphylococcus* was differentiated from *Micrococcus* species on the basis of the oxidation and fermentation of glucose, resistance to bacitracin (0.04 U) indicated by absence of an inhibition halo or presence of an inhibition halo measuring up to 9 mm in diameter, and susceptibility to furazolidone (100 µg) characterized by inhibition zones measuring 15 to 35 mm in diameter (Baker 1984). The following international reference CNS strains were used as controls: *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. warneri* (ATCC 10209), *S. xylosus* (ATCC 29979), and *S. saprophyticus* (ATCC 15305) and *S. aureus* (ATCC 33591 and ATCC 25923).

The *Staphylococcus* spp identification reference method of proposed by Kloos and Schleifer (1975) modified by Cunha et al., (2006) were adopted. This method consists of a set of biochemical tests that determine the utilization of the sugars xylose, arabinose, sucrose, trehalose, maltose, mannitol, lactose, xylitol, ribose, fructose, and mannose, production of hemolysin, nitrate reduction, presence of urease and ornithine decarboxylase, and resistance to novobiocin characterized by an inhibition halo of up to 16 mm. Readings of the tests were obtained after 24, 48, and 72 h of incubation at 37°C in an air incubator.

PCR assay was used to determine the presence of enterotoxin genes (*sea*, *seb*, *sec* and *sed*). A total of 263 isolates were evaluated by Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA extraction was carried out by using Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin® Kit (GE Healthcare), PCR reactions were performed by employing the primers previously described by Johnson et al. (1991). The amplification was performed in a DNA thermal cycler (Mastercycler® ep eppendorf, Hamburg, Germany), and the amplicons were visualized by electrophoresis in 2% agarose gel with SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen), in concentration of 1 µL in 10 mL of gel. PCR assay was used to determine the presence of enterotoxin codifying genes (*sea*, *seb*, *sec* and *sed*). The following international reference strains were used as controls: *S. aureus* (ATCC 33591 and ATCC 25923). Thermocycler parameters were: *sea*: initial denaturation at 94°C for 4 minutes, denaturation at 94°C for 2 minutes, annealing at 51°C for 2 minutes and extension at 72°C for 1 minutes 30 seconds, denaturation at 94°C for 2 minutes, annealing at 53°C for 2 minutes and extension at 72°C for 1 minutes 30 seconds for 35

171 cycles. A final extension was realized at 72°C for 7 minutes; *seb*: initial denaturation at
 172 94°C for 4 minutes, denaturation at 94°C for 2 minutes, annealing at 55.5°C for 2
 173 minutes and extension at 72°C for 1 minutes 30 seconds for 38 cycles. A final extension
 174 was realized at 72°C for 7 minutes; *sec*: initial denaturation at 94°C for 4 minutes,
 175 denaturation at 94°C for 2 minutes, annealing at 52.4 °C for 2 minutes and extension at
 176 72 °C for 1 minutes 30 seconds for 38 cycles. A final extension was realized at 72 °C for
 177 7 minutes; *sed*: initial denaturation at 94 °C for 4 minutes, denaturation at 94 °C for 2
 178 minutes, annealing at 55 °C for 2 minutes and extension at 72 °C for 1 minutes 30
 179 seconds, denaturation at 94 °C for 2 minutes, annealing at 53 °C for 2 minutes and
 180 extension at 72 °C for 1 minutes 30 seconds, denaturation at 94 °C for 2 minutes,
 181 annealing at 51 °C for 2 minutes and extension at 72 °C for 1 minutes 30 seconds for 38
 182 cycles. A final extension was realized at 72 °C for 7 minutes;

183 The statistical analysis was performed using the Statistical Analysis Systems For
 184 Personal Computers software (Kruskal-Wallis -ANOVA non parametric test, Mann-
 185 Whitney test and Fisher's exact test).

186

187 RESULTS

188 A total of 260 (19.9%) *Staphylococcus* spp were isolated from 1318 bovine
 189 mastitis cases, from these: 34.5% were *S. aureus*, CPS others than *S.aureus* were 42
 190 (16.1%) and 128 (49.3%) were CNS (Table 1).

191 The CNS were isolated in higher number than *S. aureus* (P=0.0372) and also
 192 than CPS other than *S .aureus*(P=0.0002). And *S. aureus* was isolated in higher number
 193 than other CPS (P=0.0403). *S. aureus* a classical etiological mastitis agent and
 194 important pathogen to human being due to its capability to produce several virulence
 195 factors, was isolated in a high percentage. However, was interesting observed the
 196 increase percentage of CNS isolates (Table 1).

197 Considering the total of the 1318 cases of mastitis the percentage of isolation
 198 were the following: 9.7 % CNS, 6.8% *S. aureus* and 3.2% CPS others than *S.aureus*,
 199 among those three species were isolated: coagulase positive *S. hyicus*, *S. intermedius*
 200 and *S. schleiferi subsp coagulans* (Table 2).

201 Seventeen different species of CNS were isolated, respectively: *S. auriculares*,
 202 *S. capitis*, *S. chromogenes*, *S. cohnii subsp cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S.*
 203 *hominis*, *S. hyicus*, *S. lugdunensis*, *S. pasteurii*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus*

204 *subsp bovis*, *S. saprophyticus subsp saprophyticus*, *S. schleiferi subsp schleiferi*, *S.*
 205 *sciuri subsp sciuri*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosus* (Table 3).

206

207 Table 1. *Staphylococcus* spp. isolated from a total of 1318 bovine mastitis cases in ten

208 Table 2. Coagulase Positive Staphylococci (CNS) isolated from bovine mastitis cases of

209 Table 3. Coagulase Negative Staphylococci (CNS) isolated from bovine mastitis cases

210

211 In the table 3, it can be observed that *S. warneri* (31. 3%), *S. epidermidis*(14.8%)
 212 and *S. hyicus* (12.5%) were isolated in high percentage among the CNS isolates. The
 213 same species have been referred in other studies by its high occurrence among the
 214 bovine mastitis isolates staphylococci. The isolation of *S. warneri* was significantly
 215 higher than *S. epidermitidis* ($P = 0.0028$), the second CNS highest isolated. Therefore it
 216 can be inferred that isolation of *S. warneri* was higher than other CNS species isolated
 217 from bovine mastitis cases in the studied dairy herds.

218 The dispersion of the *Staphylococcus* species among the ten dairy herds can be
 219 verified in table 4 and table 5. It must be pointed out that not even *S. aureus* was
 220 isolated from mastitis cases in all the studied dairy herds. Among the CPS, *S. aureus*
 221 occurred in nine out the ten farms, *S. hyicus* in 7 farms, *S. intermedius* in 6 farms, *S.*
 222 *schleiferi subsp coagulans* in only three of them (Table 4). Among the CNS it was
 223 verified that: *S. epidermidis* was detected in 8 of the ten studied dairy herds, *S. warneri*
 224 in 7 farms and *S. hyicus* in 6 farms. Some of the CNS species were isolated only in one
 225 of the farms: *S. saprophyticus subsp saprophyticus*, *S. auriculares*, *S. capitis*, *S.*
 226 *chromogenes* (Table 5).

227

228 Table 4. Dispersion of Coagulase Positive Staphylococci (CPS) isolates from bovine

229 Table 5. Dispersion of Coagulase Negative Staphylococci (CNS) isolates from bovine

230

231 Among the CNS isolates the occurrence of enterotoxin genes was determined as
 232 35.1% for *sea*, 7.1% for *seb*, 6.5% for *sec*, 1.8% for *sed*) 5.3% for both *sea* and *seb*,
 233 3.6% for both *sea*, *sec* and *sed*, 1.8% for both *sec* and *sed*., respectively (Table 6)

234 Among the CPS isolates the occurrence of enterotoxin genes was determined as
 235 9.5% for *sea*, 4.4% for *seb*, 5.0% for *sec*, 1.9% for *sed*; for both *sea* and *seb* 1.3%, 1.3%
 236 for both *sea*, *sec* and *sed*, 4.4 % for both *sec* and *sed*., 0.6% for both *sea* and *seb*
 237 respectively

238

239 Table 6 Classical staphylococcal enterotoxin codifying genes detected by PCR in the

240 Table 7 Classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in the *S.*

241

242 The present study verified that 66.4% of CNS isolates showed the classical
 243 enterotoxin code genes, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*. In table 6, it can be also verified that 34.8%
 244 CPS isolates showed the classical enterotoxin code genes, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*. When
 245 compared it was observed that the difference was significant ($P < 0.0001$), a higher
 246 number of CNS showed classical enterotoxin code genes than CPS isolates.

247 The *sea* enterotoxin code genes (9.5%) detected by PCR in CPS differ
 248 significantly ($P < 0.0001$) when compared with CNS (35.1%) *sea* enterotoxin code
 249 genes (Table 6). And *sea* enterotoxin code genes (35.1%) among CNS was significantly
 250 higher ($P < 0.0001$) than *seb* code genes (7.1%), therefore, it can be inferred that among
 251 the CNS isolates from bovine cases in studied dairy herds *sea* enterotoxin code genes
 252 was significantly higher than all the classical enterotoxin code genes (Table 6).

253

254 Table 8 Classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in the *S.*

255

256 The classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in the *S.*
 257 *warneri*, *S. epidermidis* and *S. hyicus* isolated from bovine mastitis were presented in
 258 table 7. *S. warneri* isolates showed a higher percentage of *sea* when compared with *seb* ($P < 0.001$) and, *sea* was higher than *sec* ($P < 0.01$) and, *sea* was also higher than *sed*
 259 ($P < 0.001$), whereas *S. hyicus* isolates showed a higher percentage of *sea* than. *sec*
 260 ($P < 0.01$) (Table 7). In table 8 the classical staphylococcal enterotoxin code genes detected
 261 by PCR in the main SPC species isolated from bovine mastitis were presented: *S.*
 262 *aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus*.

264 When it was compared the potential capability of enterotoxin production based
 265 in the detection of code genes by PCR, among the isolates, it was verified that the
 266 presence of enterotoxin code genes in some of the isolated species of CNS, *S.*
 267 *epidermidis*, *S. warneri* and *S. hyicus* were higher than in *S. aureus* isolates and the
 268 differences were statistically significant (Tables 9, 10 and 11). On the other hand, it was
 269 not detected any difference when it was compared the potential capability of enterotoxin
 270 production based in the detection of code genes by PCR, among the main CNS isolates

(Table 12 and 13). The same was verified when the main CPS isolated species were compared (Tables 14, 15 and 16)

273

274 Table 9. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by
 275 Table 10. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by
 276 Table 11. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by
 277 Table 12. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by
 278 Table 13. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by
 279 Table 14. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by
 280 Table 15. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by
 281 Table 16. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by
 282

283 DISCUSSION

284 Food-borne diseases are of major concern worldwide, and *Staphylococcus*
 285 *aureus* is considered one of the predominant bacteria involved in these diseases, is a
 286 leading cause of gastroenteritis resulting from the consumption of a food in which
 287 enterotoxigenic staphylococci have grown and produced toxins (Le Loir et al., 2003).

288 *S. aureus* was also considered a major pathogen in bovine mastitis etiology.
 289 Nevertheless, nowadays other staphylococci have been implicated in an increasing
 290 number of animal as well human pathologies (Santos et al., 2008). Previous Brazilian
 291 studies in bovine mastitis referred enterotoxin (SEs) production in *Staphylococcus*
 292 *aureus* isolates. Silva et al., (1999) observed that 30% from 127 *S. aureus* isolates
 293 produced enterotoxins (19% *sed*, 8% *seb*, 8% *sec* e 3% *sea*).

294 CNS species have assuming an important role in mastitis etiology, as was well
 295 demonstrated by several researchers throughout the (Macovec and Ruegg, 2003; Nevala
 296 et al., 2004; Piepers et al. 2007; Costa et al., 2008). The main SCN species in mastitis
 297 varied with the study region as well as from country to country, however *S. warneri* and
 298 *S. epidermidis* have been the most frequently SCN isolated (Costa et al.,2008).

299 The results of the present study showed that *S.aureus*, a classical etiological
 300 mastitis agent and important pathogen to human beings, due to its capability to produce
 301 several virulence factors, was isolated in a high percentage. Yet, it was interesting
 302 observed the increase percentage of CNS isolates. A total of 263 (19.9%)
 303 *Staphylococcus* spp. were isolated from 1318 bovine mastitis cases, from these 34.5%

304 were *S. aureus*, non-*S.aureus* CPS were 43 (16.3%) respectively, *S. intermedius*, *S.*
 305 *hyicus* and, *S. schleiferi* subsp *coagulans* and 128 (49.3%) were CNS. Seventeen
 306 species of CNS were isolated, respectively: *S. auriculares*, *S. capitis*, *S. chromogenes*,
 307 *S. cohnii* subsp *cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S.*
 308 *lugdunensis*, *S. pasteurii*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus* subsp *bovis*, *S.*
 309 *saprophyticus* subsp *saprophyticus*, *S. schleiferi* subsp *schleiferi*, *S. sciuri* subsp *sciuri*,
 310 *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosus*. Among the CNS isolated species the predominant
 311 were: *S. warneri* (31.3%), *S. hyicus* (12.5%) and *S. epidermidis* (14.8%).

312 The same species have been referred in other studies by its high occurrence
 313 among the bovine mastitis isolates staphylococci. Costa et al.(2008) studied bovine
 314 cases by CNS, in dairy herds located in the states of São Paulo and Pernambuco and it,
 315 was verified the following results: *S. warneri* (45.5%); *S. hyicus* (18.2%); *S.*
 316 *chromogenes* (14.3%), *S. epidermidis* (5.2%); *S. saprophyticus* (5.2%); *S.haemolyticus*
 317 (5.2%); *S. capitis* (2.6%); *S. simulans* (1.3%); *S. xylosus* (1.3%); *S. hominis* (1.3%).

318 Though, not only the frequency of isolation but also their capability of
 319 dispersion reflecting their infectivity are important and must be considered in a study. In
 320 respect to *Staphylococcus* species dispersion among the ten dairy herds, it must be
 321 pointed out that, not even *S. aureus* was isolated in all the studied dairy herds from
 322 mastitis cases. Among the CPS, *S. aureus* occurred in nine out the ten farms, *S. hyicus*
 323 in 7 farms, *S. intermedius* in 6 farms and, *S. schleiferi* subsp *coagulans* in only three of
 324 them. Among the CNS it was verified that: *S. epidermidis* was detected in 8 of the ten
 325 studied dairy herds, *S. warneri* in 7 farms and *S. hyicus* in 6 farms. Some of the CNS
 326 species were isolated only in one farm: *S. saprophyticus* subsp *saprophyticus*, *S.*
 327 *auriculares*, *S. capitis*, *S. chromogenes*, and, not necessarily in the same farm. It was
 328 verified the same in relation to *S. aureus* isolated from carriers and bovine mastitis
 329 cases, when were studied 10 dairy herds from São Paulo and Pernambuco Brazilian
 330 states (Santos et al. 2009).

331 *S. epidermidis* has been often described as cause of bacteremia, osteomyelitis,
 332 endophthalmitis infections due to implanted medical devices such as prostheses and
 333 catheters, infection of surgical wounds, peritonitis in patients on continuous peritoneal
 334 dialysis,. *S. haemolyticus* commonly determines: endocarditis, peritonitis, septicemia,
 335 and infections of the urinary tract, wounds, bone, and joints, and *S. saprophyticus*
 336 frequently associated with urinary infections and septicemic processes. Other significant
 337 pathogens associated with nosocomial infections include: *S. hominis*, *S. warneri*, *S.*

338 *capitis*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, and *S. saccharolyticus* (Bannerman, 2003). *S.*
 339 *lugdunensis* was associated with endocarditis after implantation of prosthetic valves,
 340 with peritonitis, with soft tissue infection, and with vertebral osteomyelitis (Osmon et
 341 al. 2000).

342 It must be pointed out that in the present study were isolated in high level the
 343 CNS species most frequently found as cause of diseases in humans and can be
 344 transmitted through milk. Safety hazards associated with CNS were mostly limited to
 345 the presence of antibiotic resistance (Even et al., 2010).

346 According to Even et al. (2010) seventy-one percent of the strains possessed at
 347 least one gene encoding antibiotic resistance, while only one strain carried an
 348 enterotoxin gene and, most strains did not carry any genes encoding staphylococcal
 349 toxins (68%). Though, several coagulase negative staphylococcal food poisoning
 350 outbreaks have been described (Veras et al., 2003; Carmo et al., 2002; Carmo et al.,
 351 2004). And, in France, among 61 strains isolated from raw milk cheeses, 15.9% were
 352 enterotoxigenic (Rosec et al., 1997). In Brazil, a study performed in Minas Gerais, 43%
 353 of 127 *S. aureus* isolates from bovine mastitis were found to be SE producers (Cardoso
 354 et al., 1999). In Germany, on strains isolated from the milk of cows with mastitis
 355 showed around 72.8% of the strains were enterotoxigenic when *sea* to *sej* were
 356 considered (Akineden et al., 2001).

357 The presence of enterotoxin code genes in CNS isolated from bovine mastitis
 358 has been referred in international researches, and, also enterotoxins (SEs) production
 359 was verified by some species of coagulase-negative staphylococci, e.g. *S. cohnii*, *S.*
 360 *epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus* (Bautista et al, 1988). *S. chromogenes*, *S.*
 361 *warneri*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus*, *S. lentus* are also determined as enterotoxigenic
 362 (Valle et al., 1990; Becker et al., 2001). *S. cohnii*, *S. epidermis*, *S. xylosus* and *S.*
 363 *haemolyticus* isolated from ewe's milk were found to produce one or several SEs
 364 (Bautista et al., 1988). A previous Brazilian study (Brabes et al., 1999) referred the
 365 isolation of *S. sciuri*, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *hominis*, *S. warneri*, *S.*
 366 *caprae*, from bovine mastitis milk samples and, also verified SEs production in
 367 *Staphylococcus sciuri* isolates and one *Staphylococcus chromogenes*.

368 Food safety hazards were more pronounced in *S. epidermidis* than in other
 369 species regardless the food or clinical origin of the strains, according to Even et al.,
 370 (2010) seventy six percent of the strains carrying genes encoding staphylococcal toxin
 371 belonged to *S. epidermidis* species. The present results corroborate with the verified by

372 Even et al.(2010), 63.2% of *S. epidermidis* strains isolated from milk samples of bovine
 373 mastitis cases showed enterotoxin encoded genes, predominantly *sea* (42.%), but also
 374 *seb*, *sed*, and also genes for more than one type. Nevertheless, other CNS species
 375 presented enterotoxin genes in high percentages as: *S. warneri* (77.5%) and *S. hyicus*
 376 (81.3%)

377 Some studies have already demonstrated that other staphylococci coagulase
 378 positive non-*S. aureus* have been associated to food borne disease. Bergdoll (1989)
 379 confirmed the capability of producing enterotoxins also in *S. intermedius* and *S. hyicus*.

380 The coagulase positive *S. intermedius* is the predominant non-*S. aureus* species
 381 isolated from food; some strains have been shown to produce SEs (Becker et al., 2001).
 382 *Staphylococcus intermedius* is the only non-*S. aureus* species that has been clearly
 383 involved in staphylococcal food poisoning outbreaks (Khambaty et al., 1994). However,
 384 in this study a relatively low percentage of *S. intermedius* isolates from bovine mastitis
 385 cases showed relatively low enterotoxin codifying genes (30%)

386 The present study verified that 64.4% of CNS isolates showed the classical
 387 enterotoxin code genes, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*. It was also verified that 34.8% of CPS
 388 isolates showed the classical enterotoxin code genes, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*. When
 389 compared, it was observed higher number of CNS showing classical enterotoxin code
 390 genes than CPS isolates ($P < 0.0001$),

391 It was also verified in the present study that, when it was compared the potential
 392 capability of enterotoxin production based in the detection of code genes by PCR,
 393 among the isolates, in some of the isolated CNS species, as: *S. epidermidis*, *S. warneri*
 394 and *S. hyicus*, the codifying genes occurrence were significantly higher than in *S. aureus*
 395 isolates. On the other hand, it was not detected any difference when it was compared the
 396 potential capability of enterotoxin production based in the detection of code genes by
 397 PCR, among the main CNS isolates.

398 In this study, it was detected among the CNS isolates the occurrence of
 399 enterotoxin genes in the following proportion: 35.1% for *sea*, 7.1% for *seb*, 6.5% for
 400 *sec*, 1.8% for *sed*) 5.3% for both *sea* and *seb*, 3.6% for both *sea*, *sec* and *sed*, 1.8% for
 401 both *sec* and *sed*,, respectively. And, among the CPS isolates the occurrence of
 402 enterotoxin genes was determined as: 9.5% for *sea*, 4.4% for *seb*, 5.0% for *sec*, 1.9%
 403 for *sed*; for both *sea* and *seb* 1.3%, 1.3% for both *sea*, *sec* and *sed*, 4.4 % for both *sec*
 404 and *sed*,, 0.6% for both *sea* and *seb*, respectively

405 The gene *sea* is the most common cause of staphylococcal food poisoning
 406 worldwide, but the involvement of other classical SEs has been also demonstrated
 407 (Argudín et al.2010).

408 In the present study, it was verified in both CNS, as well as, in CPS the
 409 predominance of *sea* codifying gene and the difference was significant among the
 410 isolates of some species. However, it was not found any *sea* codifying gene among *S.*
 411 *intermedius* isolates. When analyzed *S. warneri* isolates showed a higher percentage of
 412 *sea* when compared with *seb*, *sec* and, *sea* was also higher than *sed* ($P<0.001$), whereas
 413 SCN *S. hyicus* isolates showed a higher percentage of *sea* than. *sec* $P<0.01$.

414 It seems to be more often than it was thought, the occurrence of enterotoxin
 415 codifying genes, therefore it must be pointed out the risk, not only represented by
 416 consume of milk, but also by consume of dairy products, as cheese, for instance.

417 In spite of, not be considered a highly lethal agent due to the low mortality
 418 associated with the illness, staphylococcal enterotoxins are considered a potential
 419 biological threat because of their stability at high temperatures (100°C for 1 h) and
 420 ability to incapacitate individuals for several days to two weeks. (Bhatia and Zahoor,
 421 2007). Symptoms are usually of rapid onset and include nausea and violent vomiting,
 422 with or without diarrhea. The illness is usually self-limiting and only occasionally it is
 423 severe enough to warrant hospitalization.

424

425

426 CONCLUSION

427

428 As a conclusion, the staphylococci isolated from bovine mastitis cases have been
 429 found to have high enterotoxigenic potential due the detection of enterotoxin codifying
 430 genes in a high percentage of *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis cases.
 431 Besides that the elevate number of species, other than *S. aureus* showing enterotoxin
 432 code genes called attention. Moreover, as were observed in some CNS species, such as:
 433 *S. warneri*, *S. epidermidis* and *S. hyicus*, some of them had showed enterotoxin genes in
 434 higher percentage than *S. aureus* isolates. Milk from mastitis cases, particularly in the
 435 subclinical form which not usually shows any noticeable alteration and is accepts as
 436 normal, represents hazard to consumer's health. Hazard is not only, by the low
 437 nutritional quality and the risk of pathogen transmission, but mostly, the threat is
 438 represented by preformed enterotoxins, mainly in reason of their high heat stability,

they are resistant not only to pasteurization but also to boil temperature for many minutes. As a consequence, it can be concluded that milk and dairies produced from mastitis case, may be discarded to prevent outbreaks of staphylococcal food poisoning. On the other hand, as was well demonstrated that Staphylococcal species other than *S. aureus* are not only are capable of SE production but, potentially are higher producers however, they are not usually considered in routine tests. In many countries the microbial risk assessment for *S. aureus* relies only on the identification and the quantification of coagulase positive isolates in end products therefore, it would be worthwhile a revision on these regulation norms in order to adequate them to the currently knowledge.

449

450 Acknowledgements

451 This study was funded by FAPESP (The São Paulo State Official Foundation to Support
452 Research) (Grant number 2008/11614-1) F.F. Guimarães (Grant number 2008/08780-7)
453 for the grant and the financial support received for this research.

454 To Miss Silvana Ariolfo for the English review.

455 To Prof^a Maria de Lourdes R. de Souza da Cunha to provide the reference samples

456

457 REFERENCES

458

459 Akineden, O., Annemüller, C., Hassan, A.A., Lämmle, C., Wolter, W. and Zschöck, M.
460 2001. Toxin genes and other characteristics of Staphylococcus aureus isolates from milk
461 of cows with mastitis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 959-964.

462 Argudín, M.Á., Mendoza, M.C., Rodicio, M.R., 2010. Food Poisoning and
463 *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. Toxins, 2(7), 1751-1773.

464 Bautista, L.; Gaya, P.; Medina, M.; Nuñez, M. 1988. A quantitative study of enterotoxin
465 production by sheep milk staphylococci. Appl. Environ. Microbiol. 59(2), p.566-569.

466 Becker, K., Keller, B., Von Eiff, C., Brück, M., Lubritz, G., Etienne, J. and Peters, G.
467 2001. Enterotoxigenic potential of Staphylococcus intermedius. Appl. Environ.
468 Microbiol. 67, 5551-5557.

469 Bergdoll, M.S. 1983. Enterotoxins. In: Staphylococci and Staphylococcal Infections
470 (Easman, C.S.F. and Adlam, C., eds.). Academic Press, London, UK, pp. 559-598.

471 Bergdoll, M.S. 1989. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne Bacterial Pathogens
472 (Doyle, M.P., ed.). Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, pp. 463-523.

- 473 Bhatia, A., Zahoor, S. 2007. *Staphylococcus Aureus* Enterotoxins: A Review. J. Clin
474 Diag. Research, 3, 188-197.
- 475 Brabes, K.C.S.; Carvalho, E.P.; Dionisio, F.L.; Pereira, M.L.; Garino Jr, F.; Costa, E.O.
476 1999. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de
477 enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em
478 propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Rev.
479 NAPGAMA, 2, 4-11.
- 480 Cardoso, H.F., Silva, N., Sena, M.J. and Carmo, L.S. (1999). Production of enterotoxins
481 and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis
482 in Brazil. Lett. Appl. Microbiol. 29: 347-349
- 483 Carmo, L.S.; Cummings, C.; Linardi, V.R.; Dias, R.S.; Souza, J.M.; Sena, M.J.; Santos,
484 D.A.; Shupp, J.W.; Pereira, R.K.P.; Jett, M.. A case study of a massive staphylococcal
485 food poisoning incidente. Foodborne Pathogens and Disease, v.1, n.4, p.241-246, 2004.
- 486 Carmo, L.S.; Dias, R.S.; Linardi, V.R. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic
487 strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw milk in Brasil. Food
488 Microbiol., 2002, v.19, p.9-14.
- 489 Costa, E.O.; Guimarães, F.F.; Faccioli, P.Y.; Santos, F.; Langoni, H.; Arcaro, J.; Peres,
490 A.; Cunha, M.L. Identification the Coagulase-negative *Staphylococci* Isolates from
491 Bovine Mastitis and Evaluation of the Inflammatory Process. In: XXV Jubilee World
492 Buiatrics Congress, 2008, Budapeste. Oral and Poster Abstracts XXV Jubilee World
493 Buiatrics Congress. Budapeste: Alapította, v.130. p.73-73, 2008.
- 494 De Vliether, S.; Barkema, H.W.; Stryhn, H.; Opsomer, G.; De Kruif, A. 2005. Impact
495 of early lactation somatic cell count in heifers on milk yield over the first lactation. J.
496 Dairy Sci. 88, 938–947.
- 497 Even, S., Leroy, S.; Chalier, C.; Zakour, N.B.; Chacornac, J.; Lebert, I.; Jamet, E.;
498 Desmonts, M; Coton, E. ; Pochets, S.; Donnio, P.; Gautier, M.; Talon, R. ; Le Loir, Y.
499 2010. Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated
500 from fermented foodstuffs. Int. J. Food Microbiol., 139, 87–95.
- 501 Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding
502 for safe food production International Journal of Food Microbiology. Int. J. Food
503 Microbiol, 141, S15–S28.
- 504 GRAPHPAD INSTAT software. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS FOR
505 PERSONAL COMPUTERS.1990-1993.

- 506 Gröhn, Y.T.; Wilson, D.J.; González, R.N.; Hertel, J.A.; Schulte, H.; Bennett, G.;
 507 Schukken, Y.H. 2004. Effect of pathogen-specific clinical mastitis on milk yield in
 508 dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3358–3374.
- 509 Herwaldt, L.A., Geiss, M., Kao, C., Pfaller, M. 1996. The positive value of isolating
 510 coagulase-negative staphylococci from blood cultures. *Clin Infect Dis* 22, 14-20.
- 511 Huebner, J., Goldmann, D.A. 1999. Coagulase-negative staphylococci: role as
 512 pathogens. *Annu Rev Med* 50, 223-236.
- 513 Johnson, W.M., Tyler, S.D., Ewan, E.P., Ashton, F.E., Pollard, D.R., Rozee, K.R. 1991.
 514 Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin
 515 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 29(3),
 516 426-430.
- 517 Kloos, W.E., Schleifer, K.H. 1975. Simplified scheme for routine identification of
 518 human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol* 1, 82-88.
- 519 Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning .
 520 *Genet. Mol. Res.*, 2(1), 63-76.
- 521 Macovec, J.A., RUEGG, P. L. 2003. Results of milk samples submitted for
 522 microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J. Dairy Sci.* 86, 3466–
 523 3472.
- 524 Martin, M.A., Pfaller, M.A., Wenzel, R.P. 1989. Coagulase-negative staphylococcal
 525 bacteremia. *Ann Intern Med* 110, 9-16.
- 526 Nevala, M., Taponen, S., Pyörälä, S. 2004. Bacterial etiology of bovine clinical
 527 mastitis–Data from Saari Ambulatory Clinic in 2002–2003. *Suomen Eläinlääkäri-
 528 lehti* 110, 363–369.
- 529 Piepers, S., De Meulemeester, K., De Aart, L., Opsomer, G., Barkema, H.W.,
 530 Vlieghe, S., 2007. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically
 531 infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J. Dairy Res.*, 74, 478-483.
- 532 Schalm, O.W., Noorlander, D.O. 1957. Experimental and observation leading to
 533 development of California mastitis test. *J. Am. Vet. Medical Assoc.*, 139, 199-204.
- 534 Taponen, S., Simojoki, H., Haveri, M., Larsen, H.D., Pyörälä, S. 2006. Clinical
 535 characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of
 536 coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet. Microbiol.* 115,
 537 199–207.
- 538 Vuong, C., Otto, M. 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb. Infect.* 4,
 539 481-489.

Tables

Table 1. *Staphylococcus* spp. isolated from a total of 1318 bovine mastitis cases in ten Brazilian dairy herds of five different regions on State of S. Paulo. Brazil. 2011.

	<i>Staphylococcus</i> spp.	in relation to <i>Staphylococcus</i> spp.	In relation to total of mastitis cases
	n ^o	%	%
<i>S. aureus</i>	90 ^{b,c}	34.4	6.8
CPS	42 ^{a,c}	16.2	3.2
CNS	128 ^{a, b}	49.2	9.7
<i>Staphylococcus</i> spp.	260	38.4	19.9

CPS= coagulase negative staphylococci CNS= coagulase negative staphylococci

^aP < 0.0001, considered significant, i.e. CNS was higher than CPS, 95% C. I. (Fisher's Exact Test)

^bP = 0.0010, considered significant, i.e. CNS was higher than *S. aureus*, 95% C. I. (Fisher's Exact Test)

^cP < 0.0001, considered significant, i.e. *S. aureus* was higher than CPS, 95% C. I. (Fisher's Exact Test)

Table 2. Coagulase Positive Staphylococci (CNS) isolated from bovine mastitis cases of ten dairy herds of five different regions on state of São Paulo, Brazil. 2011.

CPS isolates	N ^o	%
<i>S. hyicus</i>	17 ^{a,d}	12.9
<i>S. intermedius</i>	20 ^{b,e}	15.2
<i>S. schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>	5 ^{c,d,e}	3.8
<i>S. aureus</i>	90 ^{a,b,c}	68.2
SCP	132	100

Fisher's Exact Test

^aP < 0.0001, significant, (*S. aureus* X *S. hyicus*)

^bP < 0.0001, significant, (*S. aureus* X *S. intermedius*)

^cP < 0.0001, significant, (*S. aureus* X *S. schleiferi* subsp *coagulans*)

^dP = 0.0127, significant (*S. hyicus* X *S. schleiferi* subsp *coagulans*)

^eP = 0.0026, significant (*S. intermedius* X *S. schleiferi* subsp *coagulans*)

Table 3. Coagulase Negative Staphylococci (CNS) isolated from bovine mastitis cases of ten dairy herds of five different regions on State of São Paulo, Brazil 2011.

	N ^o	%
SCN		
<i>S. auricularis</i>	1	0.8
<i>S. capitis</i>	1	0.8

<i>S. chromogenes</i>	1	0.8
<i>S. cohnii subsp cohnii</i>	4	3.1
<i>S. epidermidis</i> ^a	19	14.8
<i>S. haemolyticus</i>	6	4.7
<i>S. hominis</i>	6	4.7
<i>S. hyicus</i>	16	12.5
<i>S. lugdunensis</i>	2	1.6
<i>S. pasteurii</i>	5	3.9
<i>S. saccharolyticus</i>	2	1.6
<i>S. saprophyticus subsp bovis</i>	1	0.8
<i>S. saprophyticus subsp saprophyticus</i>	3	2.3
<i>S. schleiferi subsp schleiferi</i>	6	4.7
<i>S. sciuri subsp sciuri</i>	3	2.3
<i>S. simulans</i>	4	3.1
<i>S. warneri</i> ^a	40	31.3
<i>S. xylosum</i>	8	6.3
SCN	128	100

^a P = 0.0028, considered significant (*S. warneri* x *S. epidermidis*)

Table 4. Dispersion of Coagulase Positive Staphylococci (CPS) isolates from bovine mastitis cases among the ten dairy herds of five different regions on State of São Paulo, Brazil 2011.

CPS species	herd 1	herd 2	herd 3	herd 4	herd 5	herd 6	herd 7	herd 8	herd 9	herd 10
<i>S. hyicus</i>	4	3	2	3	2	1	0	0	2	0
<i>S. intermedius</i>	9	2	3	2	3	0	0	0	1	0
<i>S. schleiferi subsp coagulans</i>	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	2	0	4	2	1	1	1	11	8	60
SCP	18 ^a	5	10	8	6	2	1	11 ^b	11 ^b	60 ^{a,b}
%	13.6	3.8	7.6	6.1	4.5	1.5	0.8	8.8	8.3	45.5

(Fisher's Exact Test)

^a P < 0.0001, significant the difference between CPS isolates in herd 1 compared with herd 10.

^b P < 0.0001, significant the difference between CPS isolates in herd 8 compared with herd 10

P < 0.0001, significant the difference between CPS isolates in herd 9 compared with herd 10

Table 5. Dispersion of Coagulase Negative Staphylococci (CNS) isolates from bovine mastitis cases among the ten dairy herds of five different regions on state of São Paulo, Brazil 2011.

SCN Species	Faz I	Faz II	Faz III	Faz IV	Faz V	Faz VI	Faz VII	Faz VIII	Faz IX	Faz X
<i>S. auricularis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. capitis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. chromogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>S. cohnii subsp cohnii</i>	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	4	5	4	1	2	0	1	1	0	1

<i>S. haemolyticus</i>	1	2	0	0	0	2	1	0	0	0
<i>S. hominis</i>	0	0	2	3	0	0	0	0	1	0
<i>S. hyicus</i>	2	7	3	2	1	0	0	0	1	0
<i>S. lugdunensis</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>S. pasteurii</i>	0	0	1	1	0	2	0	0	1	0
<i>S. saccharolyticus</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus subsp bovis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>S. saprophyticus subsp saprophyticus</i>	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. schleiferi subsp schleiferi</i>	1	1	1	3	0	0	0	0	0	0
<i>S. sciuri subsp sciuri</i>	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>S. simulans</i>	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0
<i>S. warneri</i>	2	12	14	6	4	1	1	0	0	0
<i>S. xylosus</i>	0	2	2	2	0	1	1	0	0	0
Total	14	35 ^{ab}	32 ^{c,d}	19	8	9	5	2 ^{a,c}	3	1 ^{b,d}
% SCN	10.9	27.3	26.7	14.8	6.3	7	3.9	1.6	2.3	0.8

P = 0.0001, significant Kruskal-Wallis Test (non parametric ANOVA)

^aP<0.05 significant CNS isolation level in herd 2 when compared with herd 8

^bP<0.01 significant CNS isolation level in herd 2 when compared with herd 10

^cP<0.05 significant CNS isolation level in herd 3 when compared with herd 8

^dP<0.01 significant CNS isolation level in herd 3 when compared with herd 10

Table 6 Classical staphylococcal enterotoxin codifying genes detected by PCR in the CPS and CNS isolated from bovine mastitis of ten dairy herds of five different regions on State of São Paulo, Brazil 2011.

Enterotoxin	SCP		SCN	
	No.	%	No.	%
<i>Sea</i>	15 ^a	9.5	59 ^{a,b}	35.1
<i>Seb</i>	7	4.4	12 ^b	7.1
<i>Sec</i>	8	5.0	11	6.5
<i>Sed</i>	3	1.9	3	1.8
<i>sea + seb + sec</i>	2	1.3	0	0
<i>sec + sed</i>	7	4.4	3	1.8
<i>sea + sec</i>	1	0.6	6	3.6
<i>sea + sec + sed</i>	2	1.3	6	3.6
<i>seb + sec</i>	0	0	1	0.6
<i>sea + sed</i>	0	0	1	0.6
<i>sea + seb</i>	2	1.3	9	5.3
Positive	47 ^c	34.8	85 ^b	66.4
Negative	85	66.2	43	33.6
Total	132		128	

^aP < 0.0001, *sea* enterotoxin code genes detected by PCR in CPS differ significantly when compared with *sea* enterotoxin code genes in CNS

^bP < 0.0001, *sea* enterotoxin code genes among CNS was significantly higher than *seb* code genes

^cP < 0.0001, the classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR were higher in CNS than in CPS isolates from bovine mastitis cases. (Fisher's Exact Test)

Table 7 Classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in the *S. warneri*, *S. epidermidis* and *S. hyicus* isolated from bovine mastitis of ten dairy herds of five different regions on State of São Paulo, Brazil 2011.

Enterotoxin	<i>S. warneri</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. hyicus</i>	
	No.	%	No	%.	No.	%
Sea	25 ^{a,b,c}	62.5	8	42.1	10	62.5 ^d
Seb	4 ^a	10.0	1	5.3	4	25.0
Sec	10 ^b	25.0	3	15.8	1	6.3 ^d
Sed	5 ^c	12.5	4	21.1	0	0
sea + seb + sec	0	0	0	0	0	0
sec + sed	3	7.5	1	5.3	0	0
sea + sec	3	7.5	0	0	0	0
sea + sec + sed	2	5.0	2	10.2	0	0
seb + sec	1	2.5	0	0	0	0
sea + sed	0	0	0	0	0	0
sea + seb	2	5.0	0	0	2	12.5
Positive	31	77.5	12	62.2	13	81.3
Negative	9	22.5	7	36.8	3	18.7
Total	40	100	19	100	16	100

P = 0.0001, *S. warneri*: ^aP<0.001sea vs. seb ; ^bP<0.01sea vs. sec , ^cP<0.001sea vs. sed (Kruskal-Wallis Test ,Nonparametric ANOVA)

P = 0.0001, *S. hyicus* P<0.01sea vs. sec;(Kruskal-Wallis Test ,Nonparametric ANOVA)

Table 8 Classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in the *S. aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* isolated from bovine mastitis of ten dairy herds of five different regions on State of São Paulo, Brazil 2011.

Enterotoxin	<i>S. aureus</i>		<i>S. intermedius</i>		<i>S. hyicus</i>	
	No.	%	No	%.	No.	%
Sea	12	13.8	0	0	5	29.4
Seb	10	11.5	1	5.0	0	0
Sec	9	10.3	5	25.0	5	29.4
Sed	5	5.7	4	20.0	2	11.8
sea + seb + sec	3	3.4	0	0	0	0
sec + sed	2	2.3	4	0	1	5.9
sea + sec	0		0	0	0	0
sea + sec + sed	0		0	0	1	5.9
seb + sec	0		0	0	0	0
sea + sed	0		0	0	0	0
sea + seb	1	1.2	0	0	0	0
Positive	36	40.0	6	30.0	9	52.9
Negative	54	60.0	14	70.0	8	47.1
Total	90		20	100	17	100

Table 9. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in *S. warneri* and *S. aureus* isolated from bovine mastitis of ten dairy herds of five different regions on State of São Paulo, Brazil 2011.

Enterotoxin code genes*	Positive	Negative	Nº of the isolates Total
<i>S. warneri</i>	28 ^a (70%)	12(30%)	40
<i>S. aureus</i>	29 ^a (32.2%)	61(58.8%)	90

* classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in *S. warneri* and *S. aureus* isolated from bovine mastitis
P = 0.0001, significant (Fisher's Exact Test)

Table 10. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in *S. epidermidis* and *S. aureus* isolated from bovine mastitis of ten dairy herds of five different regions on State of São Paulo, Brazil 2011.

Enterotoxin code genes *	Positive	Negative	Nº of the isolates Total
<i>S. epidermidis</i>	12 ^a (63.2%)	7(36.8%)	19
<i>S. aureus</i>	29 ^a (32.2%)	61(58.8%)	90

* classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in *S. epidermidis* and *S. aureus* isolated from bovine mastitis
^aP = 0.0178, significant (Fisher's Exact Test)

Table 11. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in CNS *S. hyicus* and *S. aureus* isolated from bovine mastitis of ten dairy herds of five different regions on State of São Paulo, Brazil 2011.

Enterotoxin code genes*	Positive	Negative	Nº of the isolates Total
<i>S. hyicus</i>	13 ^a (61.9%)	8(29.1%)	21
<i>S. aureus</i>	29 ^a (32.2%)	61(58.8%)	90

*classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in *S. hyicus* and *S. aureus* isolated from bovine mastitis
^aP =0.0227,significant (Fisher's Exact Test)

Table 12. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in *S. warneri* and *S. epidermidis* isolated from bovine mastitis of ten dairy herds of five different regions on State of São Paulo, Brazil 2011.

Enterotoxin code genes*	Positive	Negative	Nº of the isolates Total
<i>S. warneri</i>	28(70%)	12(30%)	40
<i>S. epidermidis</i>	12(63.2%)	7(36.8%)	19

*classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in *S. warneri* and *S. epidermidis* isolated from bovine mastitis
P = 0.7663, non significant (Fisher's Exact Test)

Table 13. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in *S. warneri* and CNS *S. hyicus* isolated from bovine mastitis of ten dairy herds of five different regions on State of São Paulo, Brazil 2011.

Enterotoxin code genes*	Positive	Negative	N ^o of the isolates Total
<i>S. warneri</i>	28(70%)	12(30%)	40
<i>S. hyicus</i>	13(81,3%)	3(19,7%)	16

656 *classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in *S. warneri* and *S. hyicus* isolated
657 from bovine mastitis

658 P = 0.5133, non significant (Fisher's Exact Test)

659

660 Table 14. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by
661 PCR in *S. intermedius* and *S. aureus* isolated from bovine mastitis of ten dairy herds of
662 five different regions on State of São Paulo, Brazil 2011.

Enterotoxin code genes*	Positive	Negative	N ^o of the isolates Total
<i>S. intermedius</i>	6(30%)	14(70%)	20
<i>S. aureus</i>	29(32.2%)	61(58.8%)	90

663 *classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in *S. intermedius* and *S. aureus*
664 isolated from bovine mastitis

665 P = 1.0000, considered not significant, non significant (Fisher's Exact Test)

666

667 Table 15. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by
668 PCR in CPS *S. hyicus* and *S. aureus* isolated from bovine mastitis of ten dairy herds of
669 five different regions on State of São Paulo, Brazil 2011.

Enterotoxin code genes*	Positive	Negative	N ^o of the isolates Total
<i>S. hyicus</i>	9 (52.9%)	8 (47.1%)	17
<i>S. aureus</i>	29(32.2%)	61(58.8%)	90

670 *classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in *S. intermedius* and *S. aureus*
671 isolated from bovine mastitis

672 P=0.1652, considered not significant., (Fisher's Exact Test)

673

674

675 Table 16. Comparison of classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by
676 PCR in CPS *S. hyicus* and *S. intermedius* isolated from bovine mastitis of ten dairy
677 herds of five different regions on State of São Paulo, Brazil 2011.

Enterotoxin code genes*	Positive	Negative	N ^o of the isolates Total
<i>S. hyicus</i>	9 (70%)	8 (30%)	17
<i>S. intermedius</i>	6(30%)	14(70%)	20

678 *classical staphylococcal enterotoxin code genes detected by PCR in *S. intermedius* and *S. aureus*
679 isolated from bovine mastitis

680 P = 0.1931, considered not significant., (Fisher's Exact Test)

681

682

683

684

685

686

687

688

689

690

691