



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS E DA TOXINA-1 DA
SÍNDROME DO CHOQUE TÓXICO DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADOS DE MASTITES NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO**

ELISANGELA ALINE PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2016



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS E DA TOXINA-1 DA
SÍNDROME DO CHOQUE TÓXICO DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADOS DE MASTITES NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO**

ELISANGELA ALINE PEREIRA
ORIENTADORA: SIMONE PERECMANIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL
PUBLICAÇÃO: 127/2016

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2016

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

PEREIRA, E. A. **Detecção de genes de enterotoxinas e da toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites no Distrito Federal e Entorno.** 2016. 50 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

Documento formal autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos. Foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

PP436d Pereira, Elisângela Aline
Detecção de genes de enterotoxinas e da toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites no Distrito Federal e Entorno / Elisângela Aline Pereira; orientador Simone Perecmanis. -- Brasília, 2.
47 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Saúde Animal) - Universidade de Brasília, 2.

1. Mastite. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Enterotoxinas. 4. TSST-1. 5. Saúde pública. I. Perecmanis, Simone, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS E DA TOXINA-1 DA
SÍNDROME DO CHOQUE TÓXICO DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADOS DE MASTITES NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO**

ELISANGELA ALINE PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL
COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADA POR

SIMONE PERECMANIS, Prof.^a Dr.^a (UnB)
(ORIENTADORA)

JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES, Dr. (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)

TANIA MARIA DE PAULA LYRA, Dr.^a (UnB)
(EXAMINADORA EXTERNA)

BRASÍLIA/DF, 29 DE FEVEREIRO DE 2016

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende”
Leonardo da Vinci*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela proteção, pelo sustento e pela presença constante em minha vida.

À minha família pelas orações, apoio, conforto e amor em todos os momentos.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Simone Perecmanis, por ter me acolhido em seu laboratório, pela confiança e seus valiosos ensinamentos.

Ao Hudson pelos ensinamentos e suporte técnico-científico mais que essencial, pela amizade e conselhos.

Ao meu irmão e amigo Alisson, que sempre me apoiou e me ajudou nas horas de dificuldades, peço aqui desculpas pelos meus momentos de estresse.

Aos queridos colegas Luciana, Marcela, Maurício, Diego, Bidiah, Samara e Cleia do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília, por todo o apoio.

À Marcela Scalon e Filipe pelas dicas preciosas na PCR.

Ao José Renato Junqueira Borges e Tania Maria de Paula Lyra pela participação na banca examinadora e contribuições para melhoria do trabalho.

À Universidade de Brasília pelo apoio financeiro, técnico e científico.

À todos que, de alguma maneira, contribuíram para a concretização de mais essa etapa em minha vida.

RESUMO

Staphylococcus aureus é o microrganismo mais isolado nos casos de mastites bovina e destaca-se por possuir resistência aos tratamentos com antimicrobianos convencionais e devido ao seu potencial em produzir toxinas causadoras de doenças. O objetivo desse trabalho foi detectar a presença dos genes de enterotoxinas e da toxina da Síndrome do Choque Tóxico dos *Staphylococcus aureus* isolados do leite de animais em mastite clínica. Foram analisadas 75 amostras de *S. aureus* do banco de germoplasma do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília. As amplificações obtidas apresentaram valores maiores que o esperado para os genes de enterotoxinas. Foram identificados entre os isolados de *S. aureus* um percentual de 10,68% de amplificações com utilização de primers isoladamente (uniplex) e não houve amplificações em combinação com diferentes primers (multiplex). Analisando a PCR-uniplex, houve maior número de amplificações da enterotoxina SEA, presente em 8% dos isolados. Os genes SEB e SEC, foram detectados em 1,34% das amostras e os genes SED e TSST-1 não apresentaram nenhuma amplificação nesse estudo. O tamanho do fragmento para SEA foi de 1.200 pb em 4 amostras amplificadas, 1 amostra com 800 pb e outra com 620 pb. Em relação a SEB e a SEC, houve apenas amplificação de uma de suas amostras, com tamanho da banda de 1.200 pb e 1100 pb respectivamente. O conhecimento do perfil molecular dos *S. aureus* auxilia em estudos epidemiológicos de infecções intramamárias de rebanhos leiteiros e conhecendo o potencial toxigênico das estirpes de *S. aureus*, corrobora para prevenir e controlar as infecções nos rebanhos para melhorar a qualidade dos produtos oferecidos à população.

Palavras-chave: Mastite, *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas, TSST-1.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is the most frequently isolated organism in cases of bovine mastitis and stands by having resistance to conventional antibiotic treatments and due to its potential to produce toxins that cause diseases. The aim of this study was to detect the presence of enterotoxin genes and the Toxic Shock Syndrome toxin gene of *Staphylococcus aureus* isolated from the milk of animals with clinical mastitis. Seventy-five samples of *S. aureus*, from the gene bank of the Medical Veterinary Microbiology Laboratory of the University of Brasilia, were analysed. The obtained amplifications showed higher values than expected for the enterotoxin genes. We identified 10.68% amplifications when using singly primers (uniplex), but there were no amplification when combining different primers (multiplex). Analyzing the uniplex PCR, there were more amplifications of the SEA enterotoxin gene (8% of the isolates). The SEB and SEC genes were detected in 1.34% of the samples and the SED and the TSST-1 genes showed no amplification in this study. The size of the SEA fragment was 1.200 pb in 4 amplified samples, 800 pb in 1 sample and 620 pb in another one. Regarding the SEB and the SEC genes, there was the amplification of only one of the samples, that had a band size of 1.200 pb and 1100 bp, respectively. Knowledge about the molecular profile of *S. aureus* assists in epidemiological studies about mammary infections of dairy herds. Moreover, knowledge about the toxigenic potential of *S. aureus* strains helps to prevent and control infections in herds in order to improve the quality of the products offered to the population.

Key words: Mastitis, *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, TSST-1.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Distribuição da produção das enterotoxinas isoladas e/ou combinadas das 75 linhagens de *Staphylococcus aureus*.....37
- Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de amplificação da enterotoxina SEA.....38
- Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de amplificação da enterotoxina SEB.....38
- Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de amplificação da enterotoxina SEC.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados para detecção de genes de enterotoxinas	36
--	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Mastite Bovina.....	13
2.2 Agentes etiológicos causadores da mastite infecciosa.....	15
2.3 Patogenia.....	15
2.4 Diagnóstico da mastite bovina.....	16
2.5 Importância econômica da mastite bovina.....	17
2.6 Importância de saúde pública da mastite.....	18
2.7 Importância dos <i>Staphylococcus aureus</i> na mastite.....	19
2.8 Caracterização dos <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.8.1 Habitat do microrganismo.....	20
2.8.2 Enterotoxinas estafilocócicas.....	20
2.8.3 Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1).....	23
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 Geral.....	23
3.2 Específico.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
CAPÍTULO II.....	32
1 INTRODUÇÃO.....	32
2 Material e Métodos.....	34
2.1 Obtenção das amostras.....	34
2.2 Cultivo.....	34
2.3 Extração do DNA.....	35
2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	35
2.5 Eletroforese.....	36
3 RESULTADOS.....	36
4 DISCUSSÃO.....	39
5 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o quinto lugar mundial em produção leiteira, produzindo em 2015 cerca de 26.300 toneladas de leite (USDA, 2015). A pecuária leiteira é no meio rural umas das atividades mais tradicionais, que contribui principalmente para movimentar a economia de pequenas e médias cidades brasileiras e, conseqüentemente, a economia nacional (BRASIL, 2014).

O leite é um alimento de alto valor nutricional, como importante fonte de proteína, energia, cálcio, fósforo e vitaminas. Contudo, a qualidade do leite pode ser prejudicada por vários fatores, tais como manejo alimentar, reprodutivo e sanitário inadequado, falhas na armazenagem e processamento do leite, e incidência de doenças no rebanho, que também exercem forte influência na baixa produtividade leiteira (NIELSEN, 2009). As principais razões para essa baixa produtividade incluem também o baixo nível de instrução dos produtores, dificultando a adequação aos padrões de qualidade, e por vezes, a falta de assistência técnica (IBGE, 2006).

A mastite bovina constitui uma doença infecciosa associada a problemas sanitários de grande interesse para produtores leiteiros. Sua incidência gera custos elevados que incluem custos veterinários, redução da produção e da qualidade de leite, rejeição do leite no curso de tratamento e risco de abate do animal. Esses aspectos geram um grande problema em toda cadeia produtiva do leite, diminuindo a rentabilidade do empreendimento (SEEGERS et al., 2003; PETROVSKI et al., 2006, COSTA, 2008).

A ocorrência desta enfermidade está vinculada à tríade epidemiológica: animal (hospedeiro), agente etiológico e meio ambiente, fazendo desta uma enfermidade multifatorial. Essa infecção pode apresentar fatores de riscos individuais ou ambientais. Nos fatores individuais, estão incluídos os mecanismos de defesa do animal e a anatomia do teto e do úbere. Os ambientais estão relacionados com o tipo de alimentação, limpeza das instalações, clima da região e a virulência dos agentes etiológicos (WHIST et al., 2006; CASSOL, 2010).

Além do impacto econômico da mastite, ela também tem reflexos na saúde pública, pois há diversos relatos do seu envolvimento em casos de intoxicações alimentares. O leite é um meio de cultura ideal para crescimento de microrganismos oriundos de infecções intramamárias, e esses patógenos liberam toxinas que frequentemente estão associadas às

patologias gastrointestinais humanas. O leite pode ainda conter resíduos de antibióticos que podem ser originários do tratamento da mastite ou de outros processos infecciosos (CUNHA; CUNHA, 2007).

A mastite altera a composição e as características físico-químicas do leite, principalmente no teor de lactose, gordura e proteína, acompanhada ainda por um aumento na contagem de células somáticas (CCS). Com o aumento na CCS, a composição do leite, a atividade enzimática, o tempo de coagulação, a produtividade e a qualidade dos derivados lácteos também são influenciados negativamente (BRITO et al., 1999; PETROVSKI et al., 2006; TOZZETTI; BATAIER; ALMEIDA, 2008).

Faz-se necessário o conhecimento das alternativas modernas de diagnóstico, bem como dos aspectos envolvidos na epidemiologia dos casos, para que medidas mais adequadas de controle para a doença possam ser adotadas nos rebanhos nacionais. É relevante também a necessidade de melhoria da qualidade do leite e derivados produzidos no Brasil, de modo a atender os requisitos de qualidade do mercado internacional (COSTA, 2008).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Mastite Bovina

A mastite é uma inflamação da glândula mamária mais comum em gado leiteiro, causada por trauma ou lesão no úbere e irritação química, verificando-se um aumento de proteínas plasmáticas e células leucocitárias sanguíneas mobilizadas do sangue para o tecido mamário. A reação inflamatória é um mecanismo de defesa para eliminar o agente agressor, neutralizar suas toxinas e auxiliar no reparo dos tecidos produtores de leite (WANG et al., 2009; GUIMARÃES, 2013). Vários microrganismos podem causar a mastite, porém as bactérias são as mais comuns (KERRO-DEGO et al., 2002; PELES et al., 2007). Segundo LeBlank et al. (2006), trata-se de uma doença de cunho multifatorial que tem nas inter-relações entre o hospedeiro, o ambiente e os agentes infecciosos os fatores determinantes para sua ocorrência.

Conforme sua forma de manifestação, a mastite pode ser dividida em dois grupos. A forma clínica apresenta visíveis mudanças no tecido mamário e alguns efeitos sistêmicos, como edema, hipertermia, endurecimento e dor da glândula mamária e/ou aparecimento de grumos, pus ou alterações das características do leite. A forma subclínica se caracteriza por alterações na composição do leite, porém não evidentes, as quais as principais alterações destacam-se o

aumento da contagem de células somáticas, proteínas séricas e diminuição do percentual de caseína, gordura sólido total e lactose do leite (SINGH; BANSAL, 2004; ISMAIL et al., 2010).

As mastites podem ser classificadas em ambientais e contagiosas, de acordo com os microrganismos causadores do processo inflamatório (SANTOS; FONSECA, 2007). Destas, as segundas são as mais importantes, por acometerem o maior número de matrizes produtivas, que provocam a forma subclínica de elevada incidência, de alta contagiosidade e de difícil controle com antimicrobianos. Segundo Aires (2010), a invasão e a lesão tecidual da glândula mamária por microrganismos inicia uma resposta inflamatória com três sinais clínicos evidentes, que incluem mudanças na aparência e composição do leite, além de elevadas contagens de células somáticas (CCS) e grande redução do volume produzido, provocando grande impacto econômico.

De acordo com a sua gravidade, a mastite pode ser classificada ainda em clínica subaguda, aguda ou superaguda, mastite crônica e não específica. Na subaguda, a inflamação é ligeiramente clínica, pois os sintomas incluem apenas pequenas alterações no leite, porém o quarto afetado pode apresentar um pequeno edema e sensibilidade ao toque e a vaca apresenta sinais sistêmicos. Já na forma aguda, o aparecimento dos sintomas é muito súbito e o leite aparece grosseiramente anormal. Dentre os sintomas temos o aumento da temperatura retal, apatia, perda de apetite, aumento da frequência de pulso, redução da função ruminal, tremores, fraqueza, desidratação, diarreia e depressão. A mastite clínica superaguda é rara, mas é caracterizada por um início muito rápido e seus sintomas incluem os da forma aguda, sendo aqui muito mais graves, pois incluem ainda fibrose no úbere, perda da coordenação muscular, septicemia, extremidades frias e redução de reflexo na pupila (PHILPOT; NICKERSON, 2000; RADOSTITS et al., 2007).

Quando as formas clínicas ocorrem em longa duração, a mastite pode se tornar crônica ou pode começar como uma infecção subclínica com intermitentes crises de episódios clínicos. Os sintomas incluem o desenvolvimento progressivo de tecido cicatricial, alterações na forma e tamanhos do quarto afetado e redução na produção de leite. As formas não específicas também são referidas como mastites não bacterianas e é caracterizada por um aumento na CCS, mas o microrganismo casual não pode ser cultivado a partir de amostras de leite. Elas podem resultar de trauma físico na glândula mamária, irritação química após a infusão de produtos de tratamento ou problemas no maquinário de ordenha (PHILPOT; NICKERSON, 2000; RADOSTITS et al., 2007; DOHOO et al., 2011)

2.2 Agentes etiológicos causadores da mastite infecciosa

A literatura relaciona o envolvimento de diversos grupos de microrganismos na etiologia das infecções intramamárias de bovinos, representados por vírus, algas, fungos, e, principalmente, as bactérias. A gravidade da mastite varia dependendo da espécie bacteriana, da dose infectante e também da patogenicidade do agente envolvido. Os microrganismos que comumente causam mastite podem ser divididos em dois grupos, baseados na sua origem: patógenos contagiosos e patógenos ambientais (AIRES, 2010; LANGONI et al. 2011).

O grupo dos patógenos contagiosos de maior importância compreende *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e ainda vários patógenos “menores”. Estes patógenos denominados menores, geralmente estão envolvidos em infecções subclínicas de menor severidade. Já *S. aureus* frequentemente causa mastite severa e destaca-se como o microrganismo causador de mastite contagiosa de maior ocorrência nos rebanhos mundiais (ZECCONI; HAHN, 2000; BUITENHUIS et al., 2011; MOTA et al., 2011).

Já no grupo de bactérias causadoras de mastites ambientais, destacam-se *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp. Entre os coliformes, a *E. coli* é a mais prevalente e grave, porque geralmente resulta em casos agudos decorrentes de um quadro causado por toxinas, causando mais frequentemente, casos de mastite clínica (BUITENHUIS et al., 2011; LANGONI et al. 2011).

Os fungos e leveduras também são capazes de causar a mastite bovina, onde há registro de casos esporádicos de microrganismos de origem ambiental com sua presença. Em relação à mastite micótica, as leveduras são frequentemente causas de infecções da glândula mamária. A maioria dos casos ocorre sob a forma de surtos localizados e/ou após tratamento com antimicrobianos. Os principais gêneros envolvidos são *Candida* e *Cryptococcus*, além de outros como *Geotrichum*, *Pichia* e *Trychosporon*, que vivem no ambiente dos animais leiteiros, tais como na pele do teto, nas mãos dos ordenhadores e em vários substratos orgânicos (SPANAMBERG et al., 2009).

2.3 Patogenia

Os agentes etiológicos penetram no úbere através do canal do teto, multiplicam-se ali e progridem em direção aos seios lactíferos, ductos coletores e alvéolos. Os microrganismos invasores causam uma resposta inflamatória, seguida de migração leucocitária para o úbere e

edema. A resolução da infecção pode resultar em fibrose, formação de abscessos ou atrofia glandular (OGILVIE, 2000, AIRES, 2010).

2.4 Diagnóstico da mastite bovina

O diagnóstico para a mastite clínica é através de teste direto que se inicia com a inspeção visual da glândula mamária, observando se há inflamação do úbere, coloração e diferenças de tamanho entre os quartos mamários. O exame do leite pode ser feito através da prova da caneca telada de fundo escuro (Teste Tamis), utilizando-se os primeiros jatos de leite da ordenha, onde se deve observar as características macroscópicas do leite para detecção de anormalidades como a presença de grumos, coágulos, pus, sangue e alterações na coloração normal do leite. Esse teste, se precocemente empregado, poderá aumentar as chances de cura e menor descarte de leite (COSTA, 2008; ROSA et al., 2009).

Para o diagnóstico da mastite subclínica é necessário realizar exames microbiológicos e a utilização de testes complementares baseados no conteúdo celular do leite. Dessa maneira, a forma subclínica pode ser detectada indiretamente através do *California Mastitis Test* (CMT) e diretamente pela contagem de células somáticas no leite. Estas são compostas basicamente por dois tipos de células: células de descamação do epitélio secretor e leucócitos de origem do sangue. As células epiteliais são oriundas da descamação normal do tecido de revestimento e secretor interno da glândula mamária, e correspondem a cerca de 2 a 25% do total de CCS da amostra (SANTOS; FONSECA, 2007; COSTA, 2008).

O teste CMT é bastante prático e um indicador sensível da presença de inflamação no úbere, mas não é capaz de distinguir as possíveis causas da inflamação. Esse método envolve a reação de um detergente aniônico capaz de emulsificar os lipídios das membranas dos leucócitos presentes no leite e libera o DNA, ocasionando uma gelificação que será proporcional à quantidade de DNA na amostra e classificada em distintos escores, conforme as intensidades do processo inflamatório (PARDO, 2007; COSTA, 2008). Schalm e Noorlander (1957) descreveram faixas de contagens de células somáticas de acordo com o grau de gelatinização da solução de leite com o reagente específico. Essas faixas de contagem de acordo com cada graduação de CMT, são classificadas em cinco escores: a) negativo (de 0 a 200.000 células/ml); b) traços ou suspeito (150.000 a 500.000 células/ml); 1+ (400.000 a 1.500.000 células/ml); 2+ (800.000 a 5.000.000 células/ml); e 3+ (com mais de 5.000.000 células/ml).

A contagem eletrônica de células somáticas no leite é considerada a mais confiável e a forma moderna de diagnóstico de mastite aceita internacionalmente, como critério de

avaliação da sanidade da glândula mamária da vaca e, conseqüentemente, qualidade do leite. A contagem de células somáticas individual (CCSI) é um recurso laboratorial comumente empregado para o diagnóstico da mastite subclínica, enquanto a contagem de células somáticas do leite do tanque (CCSLT) é um parâmetro utilizado para se estimar o índice de mastite subclínica presente no rebanho e as perdas de produção (RUEGG, 2006; COSTA, 2008).

A CCS pode ser determinada utilizando-se o contador eletrônico de células somáticas em que as amostras de leite têm os núcleos das células coradas e expostas a um raio laser, refletindo luz vermelha (fluorescência) e os sinais são transformados em impulsos elétricos detectados por um fotomultiplicador e transformados em número de células/mL (ZAFALON et al., 2008). De acordo com Cassoli e Machado (2007), CCSIs entre 100.000 e 200.000 são consideradas normais, enquanto que escores superiores a 200.000 constituem um forte indício da mastite subclínica.

Além desses métodos, é recomendado utilizar exames microbiológicos do leite para a identificação dos agentes etiológicos envolvidos, para a implantação de procedimentos terapêuticos e estratégias de controle e profilaxia adequados (FONSECA; SANTOS, 2000). Essa técnica é considerada padrão para estabelecer o estado sanitário da glândula mamária em relação à ocorrência das infecções. Segundo Brito et al. (1999), as amostras de leite devem ser consideradas microbiologicamente negativas somente após duas ou três análises, pois os resultados podem gerar falso-positivos ou falso-negativos devido à eliminação intermitente do agente microbiano, a presença de resíduos de sanitizantes ou antibióticos. Após a identificação dos microrganismos através de testes bioquímicos, é necessário realizar o perfil de resistência aos antimicrobianos, pois além de mostrar a sensibilidade antibiótica, auxilia no estabelecimento de clones bacterianos no rebanho (REBHUN, 2002; COSTA, 2008).

2.5 Importância econômica da mastite bovina

A mastite bovina permanece como a doença infecciosa de maior prevalência e relevância econômica em bovinos leiteiros em todos os continentes, e apesar de tantos avanços para sua prevenção, seus agentes causadores ainda possuem a vantagem de sofrer mudanças rápidas na resposta infecciosa intramamária que facilita sua disseminação (KREWER et al., 2013).

Os impactos negativos dessa patologia afetam todo o rebanho leiteiro, onde seus custos diretos são justificados pela redução da produção e qualidade do leite, descarte de leite, gastos com veterinários e medicamentos. Os indiretos nem sempre são perceptíveis pelo criador, que incluem a redução da fertilidade, possível risco de abate e ocasionalmente a mortalidade (COSTA, 2008; NIELSEN, 2009; SIMÕES; OLIVEIRA, 2012). Além desses aspectos, também ocorre baixo rendimento industrial, pois verificam-se alterações nas características físico-químicas do leite, tais como a redução dos teores de caseína, gordura e o aumento da contagem de células somáticas, ocasionando depreciação no valor nutricional e das características sensoriais do produto (SANTOS; FONSECA, 2007; COSTA, 2008; AIRES, 2010).

2.6 Importância de saúde pública da mastite

O leite é um alimento de grande valor nutricional, se tornando um meio de cultura propício para o crescimento de diversos microrganismos, em decorrência de processos infecciosos instalados na glândula mamária ou de contaminação oriundas da ordenha, em virtude de falhas na coleta, estocagem ou processamento. Portanto, são frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite cru ou de derivados contaminados com microrganismos patogênicos (COSTA, 2008; SOUZA, 2010).

Dentre os diversos tipos de agentes patogênicos envolvidos em doenças e surtos de intoxicação alimentar por leite e derivados, *Staphylococcus aureus* destaca-se devido a sua grande prevalência e por suas toxinas causadoras de gastroenterites alimentares (FUSCO, 2011). O *S. aureus* também possui resistência aos tratamentos com antimicrobianos convencionais, o que facilita sua aderência aos tecidos mais profundos da glândula mamária, dificultando a ação de antibióticos e, conseqüentemente, permite a manifestação da doença de forma crônica (ARAGON-ALEGRO et al., 2007; PELISSER et al., 2009).

A intoxicação causada por *S. aureus* manifesta-se logo após a ingestão do alimento contaminado com enterotoxinas pré-formadas (BASTOS, 2013). Geralmente, os surtos têm início abrupto e com sintomatologia intensa caracterizada por náuseas, vômitos, cólicas, prostração, pressão baixa e temperatura subnormal (DUQUENNE et al., 2016). O período de incubação e a severidade dos sintomas dependem da quantidade de enterotoxina ingerida e da susceptibilidade do indivíduo (SANTOS, 2014). *Staphylococcus aureus* também produz outras toxinas como a toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), caracterizada por febre, hipotensão, lesões cutâneas e envolvimento multiorgânico (LUZ, 2008).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, foram registrados 209.240 casos de intoxicação alimentar entre 2000 e 2015, dos quais 3,4% dos casos eram de intoxicação por leite e derivados e 7,7% o *S. aureus* era o agente etiológico (BRASIL, 2015b). Estes dados, possivelmente subestimados devido à falta de notificação dos surtos, demonstram a relevância das medidas de controle sanitário dos alimentos destinados ao consumo humano, particularmente das matérias primas de origem animal.

2.7 Importância dos *Staphylococcus aureus* na mastite

Staphylococcus aureus é o agente etiológico da mastite contagiosa de maior ocorrência nos rebanhos mundiais e de difícil tratamento, devido à sua elevada resistência aos antimicrobianos (ZECCONI; HAHN, 2000; TAPONEN; PYÖRÄLÄ 2009; MOTA et al. 2012).

O *S. aureus* coloniza o epitélio do teto, fixa-se nas células epiteliais da glândula mamária, e internaliza-se, tornando mais difícil a atuação dos antimicrobianos. As glândulas infectadas diminuem a produção de leite por destruição permanente do parênquima celular, surgindo zonas de fibrose e abscessos na glândula mamária (REBHUN, 1995). O sistema de defesa tenta manter as bactérias em um compartimento único onde terá a ação dos leucócitos, porém esses microrganismos são lançados para outros tecidos gerando novas infecções (PHILPOT; NICKERSON, 2000).

2.8 Histórico dos *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus foram descritos pela primeira vez em 1880 pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, em pus de abscessos cirúrgicos, e atualmente é um dos microrganismos mais comuns nas infecções piogênicas em todo o mundo. O nome da espécie foi descrito por Rosembach em 1884, onde propôs a nomenclatura dos *S. aureus* de acordo com a coloração amarela de suas colônias, que as denominou como “aureus” que significa “dourado” (SILVEIRA-FILHO, 2007; TORTORA et al., 2008).

2.8.1 Caracterização dos *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos são bactérias Gram-positivas, com diâmetro de cerca de 1µm, imóveis, dispostos em cachos irregulares, mas observa-se também a presença de cocos isolados e aos pares. São anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose e maltose, catalase positiva, oxidase negativas, não formam esporos e produzem pigmentação e α -hemólise (HOLT et al., 1994; QUINN et al., 1994; JAY, 1996).

O *S. aureus* possui bom crescimento em ágar sangue de carneiro 5% por 24 horas, são tolerantes a concentração de 10% de NaCl, são mesófilas apresentando temperatura com limite de crescimento entre 7,0 a 48,0 °C e uma temperatura ótima de 35 a 37 °C. O pH para crescimento ótimo é de 6,0 a 7,0, com limites de mínimo e máximo de 4,0 a 9,8 respectivamente (ADAMS; MOSS, 1997; SANTOS; FONSECA, 2007; LUZ, 2008).

2.8.2 Habitat do microrganismo

Os *Staphylococcus aureus* estão amplamente distribuídos na natureza, normalmente associados à colonização assintomática da pele, cavidade nasal, glândulas mamárias, membranas e mucosas e pode ser transitório no trato intestinal. No entanto, vários fatores do hospedeiro podem predispor indivíduos à infecção, como o rompimento das barreiras das mucosas ou deficiência no sistema imunológico (GORWITZ, 2008; MILLER; DIEP, 2008; CHAMBERS; DELEO, 2009), originando desde lesões superficiais na pele como bolhas, abscessos, acne e furúnculos ou até doenças de maior gravidade como pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, meningite e infecções do trato urinário. Várias das infecções são endógenas, mas a sua sobrevivência prolongada em ambientes permite a transmissão indireta (QUINN et al., 2005; CHAMBERS; DELEO, 2009).

2.8.3 Enterotoxinas estafilocócicas

Staphylococcus aureus pode apresentar múltiplas enterotoxinas com pesos moleculares semelhantes, como também propriedades biológicas e físico-químicas distintas. São secretadas no meio onde a bactéria se encontra, sendo solúveis em água e soluções salinas. Sua estrutura é rica em lisina, ácido aspártico e tirosina. A maioria delas possui uma alça de cistina requerida para sua conformação apropriada e que está provavelmente envolvida em sua atividade emética. Há presença de epítomos específicos que distinguem umas das outras, assim

diferentes cepas enterotoxigênicas podem expressar toxinas antígenicamente distintas com atividades biológicas similares (PINCHUK et al., 2010; SANTILIANO et al., 2011).

As enterotoxinas são proteínas de baixo peso molecular, variando de 26.900 a 29.600 daltons (Da), também conhecidas como toxinas pirogênicas, resistem a muitas enzimas proteolíticas como pepsina e tripsina, explicando sua atividade no sistema digestivo (LE LOIR et al., 2003; PELES et al., 2007). São altamente estáveis ao aquecimento a 100°C durante 30 minutos, não sendo inativadas pela pasteurização e outros tratamentos térmicos usuais (HOLECKOVÁ et al., 2002; SENGER e BIZANI, 2011).

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) funcionam não só como potentes toxinas gastrintestinais, mas também são consideradas superantígenos, por estimularem uma resposta policlonal inespecífica de células T e a liberação aumentada de citocinas, causando toxicidade sistêmica e supressão da resposta imune adaptativa, os quais prolongam a infecção bacteriana. Os superantígenos ligam-se simultaneamente às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II e aos receptores de células T, independentemente de suas especificidades de ligação a peptídeos, formando um complexo trimolecular, que induz a proliferação demasiada de células (CUNHA; CALSOLARI; JÚNIOR, 2007; ANDRADE, 2008).

As enterotoxinas são designadas com uma letra do alfabeto na ordem de sua descoberta e são classificados com base em suas diferenças sorológicas em SEA, SEB (CASMAN et al., 1963), SEC (BERGDOLL et al., 1965), SED (CASMAN et al., 1967), SEE (BERGDOLL et al., 1971), SEG (MUNSON; BETLEY, 1991), SEH (SU; WONG, 1995), SEI (MUNSON et al., 1998), SEJ (ZHANG et al., 1998), SEK (ORWIN et al., 2001), SEL (JARRAUD et al., 2001), SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU (BALABAN; RASOOLY, 2000; STEPHAN et al., 2001; ZSCHOCK et al., 2005). Estas são divididas em enterotoxinas clássicas (SEA-SEE) e novas enterotoxinas (SEG-SEU), cujos genes já foram descritos (CUNHA, 2007; BOYNUKARA et al.; 2008 ÂNGELO, 2010). Além das enterotoxinas, existe uma toxina previamente designada como enterotoxina F, que atualmente é conhecida como responsável pela Síndrome do Choque Tóxico e não por enterite (LINDSAY et al., 1998; FORSYTHE, 2002).

Os genes que codificam as enterotoxinas podem ser carregados por plasmídeos (*sed* e *selj*), bacteriófagos (*sea* e *see*), cromossomos (*seb*, *sec*, *seh*, *sei*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp* e *selq*) ou estarem presentes em ilhas de patogenicidade, como ocorre com *sec*, *seb*, *selk* e *selq*. Além disso, os genes codificadores de *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo* estão agrupados em um *cluster*

denominado *egc* (*cluster* genômico de enterotoxinas) (LETERTRE, 2003; GOMEZ et al., 2007; DUQUENNE et al., 2016).

Segundo El-Huneidi et al. (2006), as ilhas de patogenicidade e a maioria dos elementos genéticos codificadores de enterotoxinas podem ser transmitidos horizontalmente entre as estirpes de *S. aureus*, embora, os genes para as SE não estejam distribuídos uniformemente entre elas. A expressão da toxina é regulada por um gene acessório (*agr*) que age em combinação com o gene *sar* (CHEUNG et al., 1992). A expressão do gene *agr* está intimamente ligada ao número de bactérias na população, sendo que contagens elevadas (a partir de 10⁶ UFC/g) têm um papel crucial na capacidade de produção das SE (NOVICK, 2000).

Diversos genes de enterotoxinas são expressos por uma mesma cepa de *S. aureus*, e a secreção destas proteínas varia de acordo com os fatores intrínsecos e extrínsecos do substrato em que o microrganismo esteja inserido e é cepa-específica (PAULIN et al., 2012)

Dentre as enterotoxinas, a SEA é mais frequentemente associada a doenças de origem alimentar seguida por SED e SEB. A toxina SEA é codificada pelo gene *sea*, composto de 771 pb e codifica uma proteína de 27,1 kDa (BETLEY; MEKALANOS, 1988). A detecção desse gene em isolados de *S. aureus* é importante, pois a SEA é tóxica mesmo em baixas concentrações, e uma quantidade tão pequena como 100-200ng de SEA pode produzir sintomas (BALABAN; RASOOLY, 2000; ASAO et al., 2003).

A enterotoxina SEB consiste de 798 nucleotídeos e codifica uma proteína de 31,4 kDa (JOHNS JR; KHAN, 1988). O gene *seb* é cromossomal em isolados clínicos de *S. aureus* envolvidos em intoxicação alimentar, embora seja carregado por um plasmídeo em outros isolados bacterianos (SHAFER; IANDOLO, 1978).

A enterotoxina SEC é a mais comumente associada com a mastite de bovinos, ovinos e caprinos. Contém algumas variantes que foram classificadas com base nas diferenças antigênicas e no hospedeiro animal com o qual elas estão associadas, e são designadas em SEC1, SEC2, SEC3, SEC bovina e SEC ovina. O gene *sec1* contém 801 pb e codifica uma proteína de 27,4 kDa, o gene *sec2* contém 801 pb e codifica uma proteína de 26 kDa e o gene *sec3* contém 798 pb e codifica uma proteína de 27,4 kDa. Os subtipos de SECs são designadas como SEC2 e SEC3 e são os mais frequentes em surtos de intoxicação alimentar (CHEN et al., 2001; LUZ, 2008).

A enterotoxina SED, codificada pelo gene *sed*, foi localizado no plasmídeo da penicilinase de 27,6 kb e codifica uma proteína de 26,3 kDa, pouca quantidade desta enterotoxina (100 a 200 ng) pode causar doença, especialmente em crianças e idosos (BALABAN; RASOOLY, 2000).

2.8.4 Toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1)

A toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) de *S. aureus* é um polipeptídeo de cadeia simples de 22 kDa, não glicosilada e sem pontes dissulfídicas com propriedades biológicas comuns a outras exotoxinas pirogênicas e superantigênicas, e codificada pelo gene *tst*, localizado no cromossomo bacteriano dentro de elementos genéticos móveis de 15 a 19 kb denominados de ilhas de patogenicidade estafilocócica. É provavelmente susceptível à clivagem pela pepsina, podendo ser menos estável no intestino em comparação com as SEs (LINDSAY et al., 1998; DINGES et al., 2000; RUZIN et al., 2001; LUZ, 2008; LAPPIN; FERGUSON, 2009; DEVRIES et al., 2011).

Esta toxina é reconhecida como a principal causa da Síndrome do Choque Tóxico, em seres humanos, caracterizada por febre, hipotensão, congestão em vários órgãos e choque letal (AAP, 2009; SUEN et al., 2009). A TSST-1 tem sido frequentemente isolada de leite de bovinos e bubalinos apresentando mastite. Dentre elas, a mastite bovina tem maior relevância, pois apresentam *S. aureus* com genes para a TSST-1 e a enterotoxina SEC associados com casos mais severos de mastite clínica ou casos que não respondem ao tratamento com antibióticos (LAPPIN; FERGUSON, 2009; DEVRIES et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar as cepas toxigênicas de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite de bovinos com mastites clínicas, pertencentes ao banco de germoplasma do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária.

3.2 Específico

- Detectar nas amostras de *S. aureus* isoladas, através da técnica de polimerização do DNA em cadeia (PCR), a presença de genes de enterotoxinas e da toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAP - American Academy of Pediatrics. Staphylococcal infections. In: PICKERING L. K.; BAKER, C. J.; KIMBERLIN, D. W.; LONG, S. S. (Eds). **Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases**. 28. ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics, 2009. p. 601-615.
- ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia, S. A., p. 258-264, 1997. 464p.
- AIRES, T. **Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2010.
- ANDRADE, M. A. **Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas**. 2008. 124 f. (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.
- ÂNGELO, F. F. **Detecção de genes de exotoxinas em *Staphylococcus* spp. isolados de leite cru refrigerado e de leite de vacas com mastite**. 2010, 90 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.
- ARAGON-ALEGRO, L. C.; KONTA, E. M.; SUZUKI, K.; SILVA, M. G.; FERNANDES-JÚNIOR, A.; RAAL, R.; RALL, V. L. M. Occurrence of coagulase positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. **Food Control**, v.18, p. 630-634, 2007
- ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 130, p. 33-40, 2003.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal Enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, p. 1-10, 2000.
- BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia**. v. 16, n. 4, p. 383-407, 2011.
- BASTOS, C. P. **Detecção, prevalência e expressão de genes de enterotoxinas clássicas de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos e surtos**. 2013, 91 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.
- BERGDOLL, M. S.; BORJA, C. R.; AVENA, R. M. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. **J. Bacteriol.**, v. 90, p. 1481-1485, 1965.
- BERGDOLL, M.S; BORJA; C.R; ROBBINS, R.N. Identification of Enterotoxin E. **Infect Immun.**, v. 4, p. 593-595, 1971.

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

BOYNUKARA, B.; GULHAN, T.; ALISARLI, M.; GURTURK, K.; SOLMAZ, H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 209-211, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. 2015b. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta---o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2016.

BRASIL. **Ministério da Agricultura quer fomentar o consumo de leite**. 2015a. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/03/ministerio-da-agricultura-quer-fomentar-o-consumo-de-leite>>. Acesso em: 19 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano mais pecuária** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. Brasília: MAPA/ACS, 2014. 32 p.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, p. 129-135, 1999.

BUITENHUIS, B.; RØNTVED, C. M.; EDWARDS, S. M.; INGVARTSEN, K. L.; SØRENSEN, P. In depth analysis of genes and pathways of the mammary gland involved in the pathogenesis of bovine *Escherichia coli*-mastitis. **BioMedCentral Genomics**. v. 12, n. 1, p. 130, 2011.

CASMAN, E. P.; BENNET, A. E.; DORSEY, A. E.; ISSA, J. A. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. **J. Bacteriol.**, v. 94, p. 1875-1882, 1967.

CASMAN, E. P.; BERGDOLL, M. S.; ROBINSON, J. Designation of staphylococcal enterotoxin. **J. Bacteriol.**, v. 85, p. 715-716, 1963.

CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Impacto da Instrução Normativa 51 na qualidade do leite. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 4, 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: FMVZ – UNESP, p.30-37, 2007.

CASSOL, D. M. S.; SANDOVAL, G. A. F.; PERICOLE, J. J.; GIL, P. C. N.; MARSON, F. A. Introdução Agentes da Mastite Diagnóstico e Tratamento. **A Hora Veterinária** – Ano 29, n. 175, 2010.

CHAMBERS, H. F.; DeLEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629-641, 2009.

CHEN, T. R.; HSIAO, M. H.; CHIOU, C. S.; TSEN, H.Y.; Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2, and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 63-70, 2001.

CHESNEY, P. J. Toxic shock syndrome. In: CROSSLEY K. B.; ARCHER, G. L. (Eds). **The staphylococci in human disease**. New York: Churchill Livingstone, 1997. p. 509-525.

- CHEUNG, A. L.; KOOMEY, J. M.; BUTLER, C. A.; PROJAN, S. J.; FISCHETTI, V. A. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (*sar*) distinct from *agr*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 14, p. 6462-6466, 1992.
- COSTA, G. M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais**, 2008. 123 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2008.
- CUNHA, A. S.; CUNHA, M. R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 1, p.105-114, jan-jun 2007.
- CUNHA, M. L. R. S. *Staphylococcus aureus*: toxinas e saúde pública. In: Encontro de Pesquisadores em Mastites, 4, 2007, Botucatu. **Anais...** Botucatu: FMVZ – UNESP, p. 56-63, 2007.
- CUNHA, M.; CALSOLARI, R. A.; JÚNIOR, J. P. A. Detection of Enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Genes in *Staphylococcus*, with Emphasis on Coagulase-Negative *Staphylococci*. **Microbiology and immunology**, v. 5, n. 4, p. 381-390, 2007.
- DEVRIES, A. S.; LESHER, L.; SCHLIEVERT, P. M.; ROGERS, T.; VILLAUME, L. G.; DANILA, R.; LYNFIELD, R. Staphylococcal toxic shock syndrome 2000-2006: epidemiology, clinical features, and molecular characteristics. **PLoS One**. v. 6, n. 8, 2011.
- DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 16-34, 2000.
- DOHOO, I. R.; SMITH, J.; ANDERSEN, S.; KELTON, D. F.; GODDEN, S. Diagnosing intramammary infections: evaluation of definitions based on a single milk sample. **J Dairy Sci**. v. 94, n. 1, p. 250–61, 2011.
- DUQUENNE, M.; DERZELLE, S.; FLEUROT, I.; AIGLE, M.; DARRIGO, C.; HENNEKINNE, J. A.; DELACROIX-BUCHET, A. Milk maturation temperature and time are key technological parameters to limit staphylococcal enterotoxin production during uncooked semi-hard cheese manufacture. **Food Control** , v. 59, p. 118-127, 2016.
- EL-HUNEIDI, W.; BDOUR, S.; MAHASNEH, A. Detection of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei*, and *sej* and of a novel genotype in Jordanian clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 56, n. 2, p. 127-132, 2006.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite**, São Paulo: LEMOS, 2000. 50 p.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: ARTEMED, p. 171-173, 2002. 424p.
- FRANCO, B. D. G. M. F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.
- FUSCO, V.; QUERO, G. M.; MOREA, M.; BLAIOTTA, G.; VISCONTI, A. International Journal of Food Microbiology Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (*egc*) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. **International Journal of Food Microbiology**. v. 144, n. 3, p. 528-537, 2011.

GOMEZ, C.; PINAL, L.; FRANCO, J.; CARRILO, J. M.; RAMIREZ, J. Identification of *Staphylococcus aureus* strains negative for enterotoxins A, B and C isolated from bovine mastitis in Mexico. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, p. 249-253, 2007.

GORWITZ, R. J.; KRUSZON-MORAN, D.; McALLISTER, S. K.; McQUILLAN, G.; McDOUGAL, L. K.; FOSHEIM, G. E.; JENSEN, B. J.; KILLGORE, G.; TENOVER, F. C.; KUEHNERT, M. J. Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001–2004. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 9, p. 1226-1234, 2008.

GUIMARÃES, J. L. B. 2013, 52 f. **Estimativa do impacto econômico da mastite: estudo de caso em um rebanho da raça holandesa em condições tropicais**. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2013.

HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 9, p. 179-182, 2002.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore, Maryland, USA: Williams & Wilkins Co, 1994. p. 527-551.

IBGE. **Censo Agropecuário 2006**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/sds_dads_agroextra/_arquivos/familia_censoagro2006_65.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2015

ISMAIL, Z. A. B.; DICKINSON, C. Alterations in coagulation parameters in dairy cows affected with acute mastitis caused by *E. coli* and *S. aureus* pathogens. **Veterinary Research Communication**, v. 34, p. 533-539, 2010.

JARRAUD, S.; PEYTRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. A Highly prevalence operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **J. Immunol.**, v. 166, p. 669-677, 2001.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5. ed. USA: Chapman & Hall, p.429-450, 1996. 661 p.

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

JORGE, A. M.; ANDRIGHETTO, C.; STRAZZA, M. R. B.; CORREA, R. C.; KASBURGO, D. G.; PICCININ, A.; VICTÓRIA, C.; DOMINGUES, P. F. Correlação entre o *California Mastitis Test*. (CMT) e a Contagem e Células Somáticas (CCS) do leite de búfalas Murrah. **R. Bras. Zootec.**, v. 34, n. 6, p. 2039-2045, 2005.

KERRO DEGO, O.; DIJK, J. E.; NEDERBRAGT, H. Factors involved in the early pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis with emphasis on bacterial adhesion and invasion. A review. **Veterinary Quarterly**, v. 24, n. 4, p. 181-198, 2002.

KREWER, C. C.; LACERDA, I. P. S.; AMANSO, E. S.; CAVALCANTE, N. B.; PEIXOTO, R. M.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; COSTA, M. M.; MOTA, R. A. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in

the states of Bahia and Pernambuco. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 5, p. 601-606, 2013.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P. Y.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesq. Vet. Bras.** v. 31, p. 1059-1065, 2011.

LAPPIN, E.; FERGUSON, A. J. Gram-positive toxic shock syndromes. **Lancet Infect Dis.** v. 9, p. 281-90, 2009.

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

Le BLANK, S. J.; LISSEMORE, K. D.; KELTON, D. F.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. Major advances in diseases prevention in dairy cattle. **Journal of Dairy Sciences**, v. 89, n. 4, p. 1267-1279, 2006.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 38-43, 2003.

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**, Oxford, v. 29, p. 527-543, 1998.

LIPMAN, L. J. A.; NIJS, A.; LAM, J. G. M.; ROST, J. A.; DIJK, L. V.; SCHUKKEN, Y. H.; GAASTRA, W. Genotyping by PCR, of *Staphylococcus aureus* strains, isolated from mammary glands of cows. **Veterinary Microbiology**. n. 48, p. 51- 55, 1996.

LUZ, I. S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da Região Agreste de Pernambuco.** 2008. 125 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

MILLER, L. G.; DIEP, B. A. Clinical practice: colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillinresistant *Staphylococcus aureus* infection. **Clin. Infect. Dis.** v. 46, p. 752-760, 2008.

MOTA, R. A.; MEDEIROS, E. S.; SANTOS, M. V.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; MOURA, A. P. B. L.; COUTINHO, L. C. A. Participação dos *Staphylococcus* spp. na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). **Ciênc. Anim. Bras.** v. 13, p. 124-130, 2012.

MUNSON, S. H.; BETLEY, M. J. Partial characterization of a new staphylococcal enterotoxin gene. In: **General Meeting of The American Society for Microbiology**, 1991. p. 31

MUNSON, S. H.; TERMAINE, M. T.; BETLEY, M. J.; WELCH, R. A. Identification and Characterization of Staphylococcal Enterotoxin Types G and I from *Staphylococcus aureus*. **Inf. Immun.**, v. 66, p. 3337-3348, 1998.

NIELSEN, C. **Economic Impact of Mastitis in Dairy Cows.** 2009. 81 f. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Breeding and Genetics, Uppsala , Sweden, 2009.

NOVICK, R. P. Pathogenicity factors and their regulation. In: FISCHETTI, V. A.; NOVICK, R. P. FERETTI, J. J.; PORTNOY, D. A.; ROOD, J. I. (Eds.). **Gram Positive Pathogens**. ASM Press, Washington, D.C., USA, 2000. p. 392-407.

OGILVIE, T. M. **Medicina Interna de grandes animais**. Porto Alegre: ARTMED, c. 17, p. 427- 444, 2000.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; DONAHUE, H. L.; NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P. M. Biochemical and Biological Properties of Staphylococcal Enterotoxin K. **Inf. Immun.**, v. 69, p. 360-366, 2001.

PARDO, R. B. **Conteúdo celular do leite bubalino proveniente de quartos mamários sadios e portadores de mastite**. 2007. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista – Campus Jaboticabal, 2007.

PAULIN, S.; HORN, B.; HUDSON, J. A. Factors influencing staphylococcal enterotoxin production in Dairy Products. **Manual Prepared for the Ministry for Primary Industries**, 2012. 83 p.

PELES, F.; WAGNER, M.; VARGA, L.; HEIN, I.; RIECK, P.; GUTSER, K.; KERESZTURI, P.; KARDOS, G.; TURCSANYI, I.; BERI, B.; SZABO, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 186-193, 2007.

PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; ZOTTI, T. R.; ARISI, A. C. M. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 145-148, 2009.

PETROVSKI, K. R.; TRAJCEV, M.; BUNESKI, G. A review of the factors affecting the costs of bovinemastitis. **Journal of the South African Veterinary Association** . v. 7, n. 2, p. 52–60, 2006.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Wining the fight Against Mastitis**. Westfalia Surge Inc. Naperville, IL, 2000.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 8, 2010.

QUINN P. J.; CARTER M. E.; MARKEY B. K.; CARTER G. R. Mastitis. In: **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe Publishing, London, 1994. p. 327-344.

QUINN, P. J.; MARCKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: ARTMED, 2005. p.453-460.

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**. 9. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

RADOSTITS, O. M; GAY, C. C; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10. ed. Saunders Elsevier Company, 2007.

REBHUN, W. C. **Diseases of dairy cattle**, Media, Pennsylvania, USA: Williams & Wilkins Co. 1995. 530 p.

ROSA, M.S.; COSTA, M.J.R.P.; SANT'ANNA, A.C.; MADUREIRA, A.P. Boas Práticas de Manejo – Ordenha. Jaboticabal: Funep, 2009. 43 p.

RUEGG, P. L. Uso de um novo teste rápido para contagem de células somáticas. In: X Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos – Sanidade. **Anais...** p. 222-229. 2006.

RUZIN, A.; LINDSAY, J.; NOVICK, R. P. Molecular genetics of SaPII - a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 41, p. 365-377, 2001.

SÁ, M. E. P.; CUNHA, M. S. R. S.; ELIAS, A. O.; VICTÓRIA, 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. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 41, p. 321-326, 2004.

SANTILIANO, F. C.; ALMEIDA, B. R.; IGNACCHITI, M. D. C.; PEREIRA-JUNIOR, O. S. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância médica e veterinária. **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 3, p. 1005-1011, 2011.

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

SANTOS, S. J. **Detecção de genes que codificam para enterotoxinas produzidas por Staphylococcus aureus isolados de leite de tanques de expansão comunitários em Alagoas / Sidney José dos Santos**. 2014. 48 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2014.

SCHALM, A. W.; NOORLANDER, D. O Experiments and observations leading to developments and the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199-207, 1957.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production Effects Related to Mastitis and Mastitis Economics in Dairy Cattle Herds. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 475-491, 2003.

SENGER, A. E. V.; BIZANI, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal, produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas/RS, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 5, n. 2, p. 25-42, 2011.

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

SIMÕES, T. V. M. D.; OLIVEIRA, A. A. **Mastite bovina: considerações e impactos econômicos**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. 25 p.

SINGH, R. S.; BANSAL, B. K. Variation in selected components of milk among different milk fractions and its relevance to diagnosis of mastitis in buffaloes. **Buffalo Journal**, v. 20, n. 3, p. 213-24, 2004.

SOUZA, D. P. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite utilizado no restaurante escola da Universidade Federal de Pelotas. **Clinical & Biomedical Research**, v. 30, n. 1, 2010.

SPANAMBERG, A.; SANCHES, E. M. C.; SANTURIO, J. M.; FERREIRO, L. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras - Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**. v. 39, n. 1, 2009.

- STEPHAN, R.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A. A.; LAMMLERB, C. H. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 373-382, 2001.
- SU, Y-C.; WONG, A. C. L. Identification and Purification of a New Staphylococcal Enterotoxin, H. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 1438-1443, 1995.
- SUEN, J.; CHESNEY, P. J.; DAVIS, J. P. Toxic shock syndrome. In: FEIGIN, R. D.; CHERRY, J. D.; DEMMLER, G. J.; KAPLAN, S. L. **Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. 6. ed. Philadelphia, Pennsylvania: Saunders; 2009. p. 1197-212.
- TAPONEN, S.; PYÖRÄLÄ, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis - not so different from *Staphylococcus aureus*? **Vet. Microbiol.** v. 134, p. 29-36, 2009.
- TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. N.; ALMEIDA, L. R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 7, n. 10, p.1-7, jan. 2008.
- USDA - United States Department of Agriculture. **Cows Milk Production and Consumption: Summary For Selected Countries**, dez. 2015. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Cows+Milk+Production+and+Consumption%3a++Summary+For+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=2544&hidReportRetrievalTemplateID=7>>. Acesso em: 19 jan. 2016.
- WANG, S. C.; WU, C. M.; XIA, S. C.; HUA, Y.; XIA, L. N.; SHEN, J. Z. Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 276-281, 2009.
- WHIST A. C.; OSTERAS O.; SOLVEROD, L. Clinical mastitis in norwegian herds after a combined selective dry-cow therapy and teat-dipping trial. **J. Dairy Sci.** v. 89, p. 4649-4659, 2006.
- ZAFALON, L. F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F.; CASTELANI, L.; BROCCOLO, C. R. Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Vet Zootec**, v. 1, n. 1, p. 56-65. 2008.
- ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**. v. 345, p. 15-18, 2000.
- ZHANG, S.; IANDOLO, J. J. STEWART, C. The enterotoxin C plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (SEJ). **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 168, p. 227-233, 1998.
- ZSCHÖCK, M.; MANHOLD-MAURER, S.; WESCHER, A.; MERL, K.; KHAN, I.; LÄMMLER, C. Evaluation of tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis as a molecular method for species identification of streptococcal isolates from bovine mastitis. **J. Dairy Sci.**, v. 72, p. 333- 337, 2005.

CAPÍTULO II

Detecção de genes de enterotoxinas e da toxina-1 da Síndrome do Choque Tóxico de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites no Distrito Federal e Entorno.

Elisangela Aline Pereira¹, Simone Percemanis²

¹ Mestranda em Saúde Animal, Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB) Brasília- DF, Brasil.

² Professora Adjunta III da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB) Brasília- DF, Brasil

Endereço para correspondência: Simone Percemanis, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), *Campus Darcy Ribeiro*, Asa Norte. Brasília – DF, Brasil. Cep: 70.910-970 Tel: 55 61 3107-7122 FAX: 55 61 3107-7118 E-mail: perecmaniss@unb.br

1 INTRODUÇÃO

A mastite é principal doença do gado leiteiro em todo o mundo, gerando vários prejuízos econômicos que afetam o produtor com a perda da qualidade e quantidade de leite. Dentre os agentes causadores, *Staphylococcus aureus* é o microrganismo de maior incidência (COSTA, 2008; MOTA et al., 2011; KREWER, et al., 2013; SANTOS, 2014).

Staphylococcus aureus são encontrados em várias condições patológicas e como parte da microbiota endógena de diferentes espécies animais, incluindo o homem. A contaminação microbiana do leite pode ocorrer principalmente pelo contato do leite com a mão do ordenhador, utensílios e equipamentos contaminados durante as operações de ordenha ou da coleta e armazenamento, através da incorporação de microrganismos que estão presentes no úbere diretamente para o leite (FAGUNDES et al., 2004; BELOTTI et al., 2011; KREWER et al., 2013).

As infecções causadas por *S. aureus* na glândula mamária produzem mais danos que outros agentes devido à liberação de toxinas e pela formação de microabscessos no tecido glandular mamário, dessa forma diminuindo a produção de leite individual. A presença de suas

toxinas no leite usado pelas indústrias e pelos laticínios representam sérios problemas de saúde pública (PINCHUK et al., 2010; BARLOW, 2011; SANTOS, 2014).

As enterotoxinas produzidas pelo *S. aureus* pertencem a uma grande família de toxinas pirogênicas que estão associados com intoxicações alimentares e podem causar choque tóxico. São proteínas de baixo peso molecular, variando de 26.900 a 29.600 daltons (Da), resistentes à hidrólise pelas enzimas gástricas e jejunais, estáveis ao aquecimento a 100° C durante 30 minutos, não sendo inativadas totalmente através da pasteurização e tratamentos térmicos usuais (HOLECKOVÁ et al., 2002; SENGER; BIZANI, 2011; KASAMA et al., 2015).

As enterotoxinas são designadas com uma letra do alfabeto na ordem de sua descoberta e são classificados com base em suas diferenças sorológicas em SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU (CUNHA, 2007; BOYNUKARA et al.; 2008 ÂNGELO, 2010; PINCHUK et al., 2010; OMOE et al., 2013). A enterotoxina SEA é a mais frequentemente associada à gastroenterite estafilocócica, seguida por SED e SEB. A enterotoxina SEC, além de ser envolvida em intoxicações alimentares, é a mais comumente associada com a mastite de bovinos, ovinos e caprinos (CHEN et al., 2001; LUZ, 2008; PINCHUK et al., 2010).

Existe ainda uma toxina previamente designada como enterotoxina F, que atualmente é conhecida como responsável pela Síndrome do Choque Tóxico em seres humanos, caracterizada por febre, hipotensão, congestão em vários órgãos e choque letal. A toxina 1 da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1) tem sido frequentemente isolada de leite de bovinos e bubalinos apresentando mastite. Dentre elas, a mastite bovina tem maior relevância, pois apresentam *S. aureus* com genes para a TSST-1 isolados ou associados com a enterotoxina SEC nos casos mais severos de mastite clínica ou casos que não respondem ao tratamento com antibióticos (ZSCHÖCK et al., 2004; KUROISHI et al., 2003; LAPPIN; FERGUSON, 2009; DEVRIES et al., 2011).

As cepas de *S. aureus* são capazes de produzir simultaneamente uma ou mais enterotoxinas, o que pode colaborar com o aumento dos efeitos toxigênicos, sugerindo que essa coprodução possa desempenhar papel importante na patogenia das infecções intramamárias produzidas por esse microrganismo (NADER FILHO et al., 2007).

Para detecção da presença de genes das toxinas bacterianas, o método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma das mais utilizadas, e é baseada na amplificação do DNA, tida como uma técnica extremamente confiável, reprodutível e rápida. Esta técnica faz uso de *primers* de DNA complementares de ocorrência natural altamente conservados com sequências repetitivas de DNA e presente em múltiplas cópias do genoma da maioria das bactérias,

podendo diferenciar os níveis de espécie, subespécie e cepa (PELISSER et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2011; RODRÍGUEZ et al., 2016).

O *S. aureus* é uma das bactérias mais importantes causadoras de intoxicações alimentares, assumindo relevância para a saúde pública, em virtude do risco potencial de sua veiculação ao homem, principalmente através do consumo de leite contaminado (PELISSER et al., 2009; FUSCO, 2011). Com o uso de técnicas moleculares na detecção e caracterização dessas toxinas, temos a possibilidade de gerar informações que possam contribuir para a proteção à saúde dos consumidores e colaborar na produção de alimento seguro, iniciando, dessa forma, uma análise epidemiológica das cepas toxigênicas mais encontradas no DF e Entorno.

O objetivo deste trabalho foi identificar as cepas toxigênicas de *Staphylococcus aureus* isoladas do leite obtido de bovinos com mastite clínica pertencentes ao banco de germoplasma do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária, detectando, através da técnica de polimerização do DNA em cadeia (PCR), a presença de genes de Enterotoxinas e da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico.

2 Material e Métodos

2.1 Obtenção das amostras

Foram utilizadas 75 amostras de *Staphylococcus aureus* pertencentes ao Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), que foram coletados de bovinos que apresentaram sinais clínicos ou que foram positivos de 2+ ou 3+ ao teste do CMT (*California Mastitis Test*) de diversos criadores do Distrito Federal e Entorno.

2.2 Cultivo

Foram utilizados isolados bacterianos previamente caracterizados como *S. aureus* pela detecção dos genes da coagulase (CoA) e espécie-específico (AroA) e que se encontravam congelados no banco de germoplasma do laboratório de Microbiologia Médica Veterinária da UnB (ANDRADE, 2012). As amostras foram descongeladas do meio *skim milk* e estriadas em meio ágar sangue de carneiro 5% e incubadas a 37°C por 24 h para obtenção de colônias puras e isoladas. Todas as colônias foram testadas para os testes de coloração de Gram e provas bioquímicas como catalase, oxidase, oxidação e fermentação da glicose (O/F glicose),

coagulase, fermentação do de manitol e redução de nitrato, a fim de verificar uma possível contaminação (QUINN et al., 1994; QUINN et al., 2005).

2.3 Extração do DNA

Depois da obtenção das colônias puras, foram coletadas três colônias isoladas com o auxílio de alças descartáveis e, em seguida, transferidas para 200 µl de água Milli-Q em micro tubos. Foram acrescentados 200 µl de fenol-clorofórmio (SIGMA-ALDRICH®). Após realizar uma leve homogeneização, os tubos foram levados à micro centrífuga (SIGMA® 2K15) por 15 minutos, à 13.000 rpm, numa temperatura de 4°C.

O sobrenadante foi transferido para outro micro tubo com o auxílio de micropipeta para utilização na PCR. Em seguida, foi acrescentado 200 µl de clorofórmio e os tubos novamente foram para a microcentrífuga por 15 minutos, a 13.000 rpm, numa temperatura de 4°C. Após esse segundo processo, o sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta e transferido para micro tubos para posteriormente serem utilizados na PCR, segundo protocolo citado por Blanco et al. (1997).

2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR-multiplex foram realizadas para as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e TSST-1 em combinação, e depois foram feitas combinações com SEA, SEB e SEC e para SEC e TSST-1 associados. A PCR-uniplex foi utilizada para a pesquisa das enterotoxinas separadamente. As reações foram adaptadas segundo o protocolo estabelecido por Johnson et al. (1990), em volume final de 50 µL, contendo 5 µl do DNA extraído, 5 µl de solução tampão (10X, pht®); 1,5 mM de MgCl (pht®); 0,2 mM de dNTPs mix (pht®); 1,5 µl de Taq DNA polimerase (5U/µl, pht®) e 1,0 µl de cada *primer* (10 pmol de *forward primer* e 10 pmol de *reverse primer*) discriminados na Tabela 1.

A amplificação foi realizada no termociclador da marca TECHNE, modelo FT GENE5D, utilizando os parâmetros descritos por Johnson et al. (1991). As misturas de PCR foram submetidas a um primeiro ciclo de 94 °C por 4 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 2 min, pareamento a 55 °C por 2 min e extensão final dos oligonucleotídeos a 72 °C por 2 min. No final dos 30 ciclos, os tubos serão incubados a 72 °C por 7 min e à 4 °C até o momento de retirada do termociclador.

Tabela 1 – *Primers* utilizados para detecção de genes de enterotoxinas.

<i>Primer</i>	Sequência de oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do fragmento (pb)
SEA-1	TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA	120
SEA-2	GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA	120
SEB-1	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	478
SEB-2	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	478
SEC-1	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	257
SEC-2	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	257
SED-1	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	317
SED-2	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	317
TSST-1	ATG GCA GCA TCA GCT TGA TA	350
TSST-2	TTT CCA ATA ACC ACC CGT TT	350

Legenda: bp - pares de base.

Fonte: Adaptado de JHONSON et al. (1991).

2.5 Eletroforese

Os produtos da amplificação da PCR foram submetidos à eletroforese (Biotech[®]) em gel de agarose a 2%. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (Major Science[®]) com a fonte ajustada para 65 V, 95 mA, e 100 W por 50 min. Foi utilizado o padrão de massa molecular de 100 bp (EasyGen[®]). Em seguida, o gel foi banhado em uma solução de água destilada com brometo de etídio (5 mg/ml) por 20 min e posteriormente submetido à luz ultravioleta em transiluminador (UVP[®]), para a visualização das ampliações.

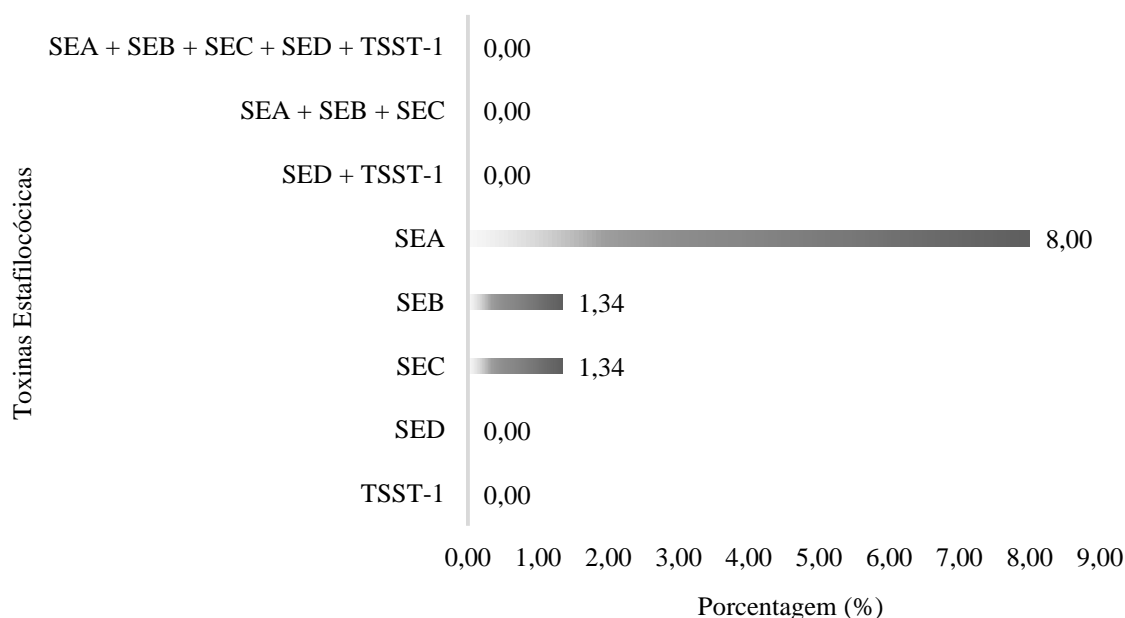
3 RESULTADOS

De acordo com as características fenotípicas e bioquímicas, todos os 75 isolados obtidos neste estudo foram identificados como *S. aureus*, para os testes de coloração de Gram, produção de catalase, oxidase, oxidação e fermentação da glicose (O/F glicose), coagulase, fermentação do ágar sal manitol e redução de nitrato.

Embora as amplificações obtidas apresentem tamanhos maiores que o esperado para os genes de enterotoxinas, foram identificados entre os isolados de *S. aureus*, 10,68% de amplificações com utilização de primers isoladamente (uniplex).

Como mostra a Figura 1, as análises em combinação com diferentes primers (multiplex) não apresentaram nenhuma amplificação dos segmentos dos 75 isolados de *S. aureus*. Analisando a PCR-uniplex, houve prevalência da enterotoxina SEA, positivo em 8% dos isolados, o gene SEB e SEC foram positivos em 1,34% e os genes SED e TSST-1 não apresentaram nenhuma amplificação nesse estudo.

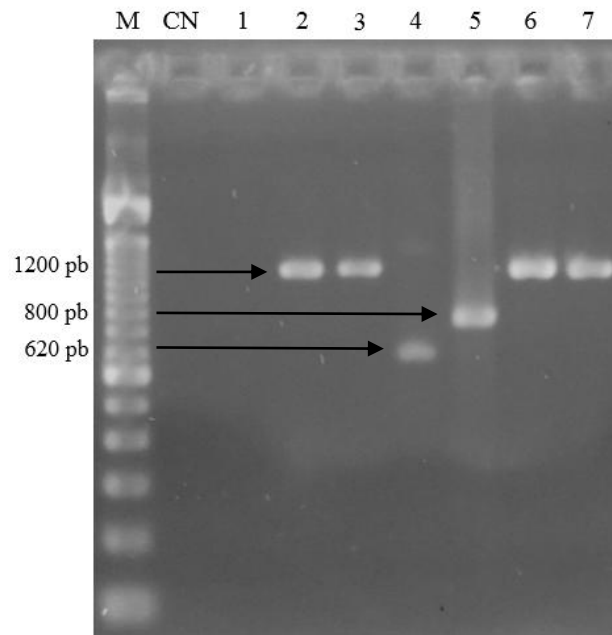
Figura 1– Distribuição da produção das enterotoxinas isoladas e/ou combinadas das 75 linhagens de *Staphylococcus aureus*.



Fonte: do autor (2016).

Através da eletroforese em gel de agarose, foi avaliado o tamanho das amplificações das enterotoxinas da PCR-uniplex. A Figura 3 mostra as amplificações para SEA. Das 75 amostras testadas, apenas 6 apresentaram amplificações, sendo que 4 das amostras isoladas apresentaram 1.200 pb, 1 amostra com 800 pb e outra com 620 pb. Em relação à SEB (Figura 4) e à SEC (Figura 5), houve apenas amplificação de uma de suas amostras, com tamanho da banda de 1.200 pb e 1100 pb, respectivamente.

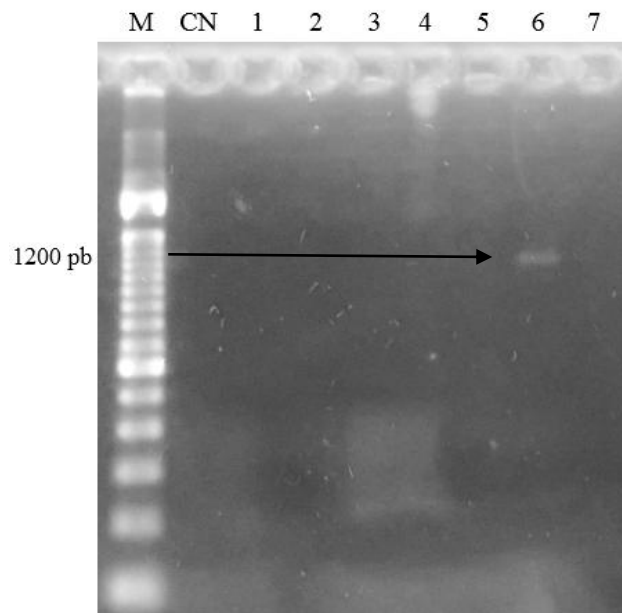
Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de amplificação da enterotoxina SEA.



Legenda: M - marcador DNA *ladder* 100 bp; CN - controle negativo (reação da PCR sem DNA). 1 - amostra S17; 2 - amostra S26; 3 - amostra S26; 4 - amostra S56; 5 - amostra S68; 6 - amostra S72; 7 - amostra S74.

Fonte: do autor (2016).

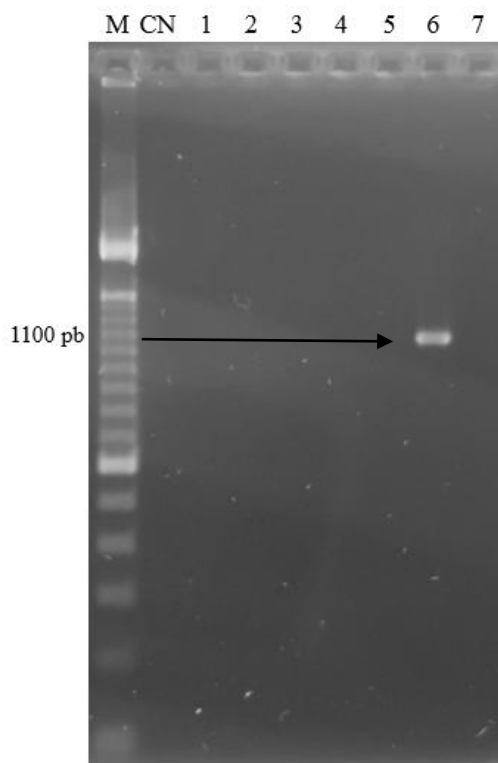
Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de amplificação da enterotoxina SEB.



Legenda: M - marcador DNA *ladder* 100 bp; CN - controle negativo (reação da PCR sem DNA). 1 - amostra S17; 2 - amostra S26; 3 - amostra S26; 4 - amostra S56; 5 - amostra S68; 6 - amostra S72; 7 - amostra S74.

Fonte: do autor (2016).

Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados de amplificação da enterotoxina SEC.



Legenda: M - marcador DNA *ladder* 100 bp; CN - controle negativo (reação da PCR sem DNA). 1 - amostra S17; 2 - amostra S26; 3 - amostra S26; 4 - amostra S56; 5 - amostra S68; 6 - amostra S72; 7 - amostra S74.

Fonte: do autor (2016).

4 DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus é o microrganismo mais envolvido em infecções intramamárias dos bovinos e o leite é um excelente meio de desenvolvimento desse patógeno com consequente produção de toxinas. Neste contexto, sabemos que pequenas concentrações de toxinas são suficientes para causar doença em seres humanos, principalmente crianças e idosos (CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2011; KREWER et al.,2013; MEDEIROS, 2013).

Em nosso trabalho as análises da PCR-uniplex apresentaram amplificações dos segmentos de tamanhos diferentes do esperado para as enterotoxinas SEA, SEB e SEC da mesma forma que Pelisser et al. (2009), que também encontraram diferentes tamanhos moleculares nos produtos amplificados. Entretanto a realização das análises da PCR-multiplex para as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e TSST-1 não apresentaram nenhuma amplificação.

Estudos anteriores com isolados de *S. aureus* de origem bovina realizados em São Paulo e na Alemanha também não detectaram a presença dessas enterotoxinas ou detectaram em baixo percentual (CABRAL et al., 2004; SALASIA et al., 2004).

Esses resultados também foram encontrados por Luz (2008), ao avaliar 94 isolados de *S. aureus* provenientes de leite e queijo coalho de vacas com mastites, em propriedades de exploração leiteira de cinco municípios da região de Pernambuco, Brasil, e nenhum dos avaliados pela PCR-Multiplex possuía essas enterotoxinas.

O gene de enterotoxina mais amplificado foi o de SEA, sendo que SEB e SEC foram amplificados em apenas uma amostra cada. Segundo Borges et al. (2008) e Pinchuk et al. (2010), a prevalência da enterotoxina SEA é significativa, por ser tóxica mesmo em baixas concentrações.

Em um surto de intoxicação alimentar envolvendo 10.000 casos causados pela ingestão de leite reconstituído, que tinha como matéria prima leite desnatado em pó, em Osaka, Japão, verificou-se que a toxina envolvida era a SEA (IKEDA et al., 2005).

Veras (2004) observou que, em 30 amostras de *S. aureus* provenientes de leite e derivados envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar, ocorrido em Minas Gerais no período de 1998 a 2002, também obteve maior porcentagem de amplificação para o gene de SEA (26,6 %), seguida de SEB (20 %) e posteriormente SEC (3,33 %).

Normanno et al. (2005) investigaram *S. aureus* em vários produtos alimentícios fabricados na Itália, e que nas 217 amostras analisadas, estas estirpes produziram SEA (26,7%), SEB (0,9%), SEC (28,1%) e SED (15,7%).

Resultados semelhantes aos encontrados em nosso trabalho foram obtidos por Longaray (2007), Zafalon et al. (2009) e Dias (2010), em que a prevalência de amplificação também foi para a enterotoxina SEA. Shanehbandi et al. (2014) obtiveram resultado de 34,8% de positividade para SEA de isolados de *S. aureus*, 13% para SEB e 4,3% para SEC. Para SED, da mesma forma que neste estudo, não houve amplificação.

Ao ser estudada a codificação dos genes para enterotoxinas em amostras de leite de tanques de expansão de cinco fazendas em Assis, Estado de São Paulo, SEA também foi o mais frequente (16; 41,0%), seguido pelo SEC (8; 20,5%), SED (5; 12,8%) e SEB (3; 7,7%) (RALL et al., 2008).

Contudo, Lamaita et al. (2003a) encontrou com maior frequência SEC e SEB, seguido de SED e SEA ao analisar 80 amostras de *S. aureus* de leite in natura de diferentes propriedades em Minas Gerais. Já no trabalho de Nader Filho et al. (2007), houve a maior presença da enterotoxina SEA e SEB seguida de SEC, pesquisadas em 72 amostras de *S. aureus* isoladas no

leite de vacas com sinais de mastite ou que apresentavam positividade no *California Mastitis Test*, em 10 propriedades rurais do Estado de São Paulo.

Diferentemente dos achados contidos neste trabalho, existe relato de não detecção de SEA em *S. aureus* oriundos de leite bovino mastítico ou leite do tanque (HATA et al., 2008). Carfora et al. (2005) ao analisar 35 amostras de *S. aureus* oriundas de leite e produtos lácteos não detectaram a enterotoxina SEA e SEB, e encontram SEC e SED em apenas uma amostra.

Embora muitos pesquisadores associam TSST-1 e a enterotoxina C às amostras causadoras de mastites agudas e subclínicas em bovinos (MATSUNAGA et al., 1993; TAKEUCHI et al., 1998; SIDHU et al., 2006; KARAHAN et al., 2009) neste trabalho, nenhuma amostra apresentou amplificação para a TSST-1. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores como Peles et al. (2007) que não constataram TSST-1 em nenhum isolado de mastite e Sidhu et al. (2006) constataram TSST-1 em apenas 0,01% dos isolados avaliados.

Por outro lado, resultados diferentes foram observados por Van Leeuwen et al. (2005), em o que gene codificador da proteína da Síndrome do Choque Tóxico, foi mais frequentemente encontrado entre as amostras analisadas e Rall et al. (2008), ao analisar *S. aureus* isolados de mastite, onde verificaram que 42,27% das amostras produziam TSST-1.

Alguns autores sugeriram que a produção de toxinas pode ser mais comum em isolados de maior patogenicidade do que naqueles com baixo grau de virulência. Isto implica que os isolados toxigênicos não só são potenciais microrganismos causadores de surtos de origem alimentar, como também podem favorecer a persistência da bactéria no rebanho, o que contribui para a cronicidade da doença (MATSUNAGA et al., 1993; CUNHA; CUNHA, 2007; SANTOS et al., 2007).

A detecção dos genes de enterotoxinas nos isolados de um alimento não é uma indicação de que as toxinas estão efetivamente presentes neste alimento. Morandi et al. (2010) avaliou 107 amostras de *S. aureus* isolados de produtos lácteos, e observou que os genes de enterotoxinas foram detectados em 67% das amostras, mas apenas 52% foram capazes de produzir enterotoxinas, o que significa que a presença dos genes de enterotoxinas não necessariamente implica na capacidade do microrganismo de produzir toxina biologicamente ativa suficiente para levar à manifestações clínicas.

Entretanto, a presença de genes enterotoxigênicos em estirpes é significativa, pois estas podem encontrar condições favoráveis para a expressão desses genes e pode oferecer riscos à saúde pública (OMOE et al., 2005; CHAPAVAL et al., 2006; ZAFALON et al., 2009).

A detecção de genes toxigênicos em cepas de *S. aureus* pode se apresentar bastante variável. Essas diferenças podem ocorrer devido às variações na distribuição de toxinas e estar

relacionadas à diversas condições ambientais e às variantes geográficas, pois o hospedeiro de *S. aureus* pode sofrer adaptações, o que reflete a importância da genotipagem desse microrganismo para melhores interpretações (PINHEIRO DE SÁ et al., 2004; HWANG et al., 2007).

Dessa maneira, a técnica de PCR permite a detecção do potencial genético para a produção de enterotoxinas, o que a torna útil tanto como um teste de triagem como para a confirmação destas (RODRÍGUEZ et al., 2016).

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciaram a detecção de prováveis genes SEA, SEB e SEC, de enterotoxinas de *S. aureus*, pela técnica de PCR. É importante ressaltar que o conhecimento do perfil molecular dos *S. aureus* será capaz de auxiliar em estudos epidemiológicos de infecções intramamárias de rebanhos leiteiros, para prevenir e controlar as infecções nos rebanhos e melhorar a qualidade dos produtos lácteos oferecidos à população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, H. H. **Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites subclínicas bovina no Distrito Federal e Entorno**. 2012. 60 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal)- Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

ÂNGELO, F. F. **Detecção de genes de exotoxinas em *Staphylococcus* spp. isolados de leite cru refrigerado e de leite de vacas com mastite**. 2010, 90 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia**. v. 16, n. 4, p. 383-407, 2011.

BELOTTI, V.; RIBEIRO JUNIOR, J. C.; TAMANINI, R.; YAMADA, A. K.; CAVALETTI, L.; SHECARIA, C. L.; NOVAES, D. G.; SILVA, F. F.; GIOMBELLI, C. J.; MANTOVANI, F. D.; SILVA, M. R. Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru refrigerado produzido no município de Sapopema/PR. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 16, p. 16, 2011.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; BLANCO, J.; MORA, A.; PRADO, C.; ALONSO, M. P.; MOURIÑO, M.; MADRID, C.; BALSALOBRE, C.; JUÁREZ, A. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 54, p. 309-319, 1997.

BONE, F. J.; BOGIE, D.; MORGAN-JONES, S. C. Staphylococcal food poisoning from sheep milk cheese. **Epidemiol Infect**, v. 103, p. 449-458, 1989.

- BORGES, M. F.; ARCURI, E. F.; PEREIRA, J. L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A. Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 70-86, 2008.
- BOYNUKARA, B.; GULHAN, T.; ALISARLI, M.; GURTURK, K.; SOLMAZ, H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 209-211, 2008.
- CABRAL, K. G.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M.; LANGONI, H.; SÁ, M. E.; VICTÓRIA, C.; SILVA, A. V. Pheno and genotyping *Staphylococcus aureus*, isolated from bovine milk samples from São Paulo State, Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 901-909, 2004.
- CARFORA, V.; CAPRIOLI, A.; MARRI, N.; SAGRAFOLI, D.; BOSELLI, C.; GIACINTI, G.; GIANGOLINI, G.; SORBARA, L.; DOTTARELLI, S.; BATTISTI, A.; AMATISTE, S. Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. **International Dairy Journal**, v. 42, p. 12-15, 2015.
- CHAPAVAL, L.; MOON, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M. Use of PCR to detect classical enterotoxins genes (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 gene (*tst*) in *Staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolates harboring these genes. **Arq Inst Biol**. v. 73, n. 2, p. 165-169, 2006.
- CHEN, T. R.; HSIAO, M. H.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2, and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 63-70, 2001.
- CHESNEY, P. J. Toxic shock syndrome. In: CROSSLEY K. B., ARCHER, G. L. (Ed.). **The staphylococci in human disease**. New York: Churchill Livingstone, 1997. p. 509-525.
- CONTRERAS, G. A.; RODRÍGUEZ, J. M. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.16, p.339-356, 2011.
- COSTA, G. M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais**, 2008. 123 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2008.
- CUNHA, A. S.; CUNHA, M. R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 1, p.105-114, jan-jun 2007.
- DEVRIES, A. S.; LESHER, L.; SCHLIEVERT, P. M.; ROGERS, T.; VILLAUME, L. G.; DANILA, R.; LYNFIELD, R. Staphylococcal toxic shock syndrome 2000-2006: epidemiology, clinical features, and molecular characteristics. **PLoS One**. v. 6, n. 8, 2011.
- DIAS, N. L. **Identificação de *Staphylococcus aureus*, avaliação do seu potencial enterotoxigênico e resistência a metilina pela técnica de PCR em amostras de leite da microrregião de Sete Lagoas-MG**, 2010. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, jul-ago, 2004.
- FUSCO, V.; QUERO, G. M.; MOREA, M.; BLAIOTTA, G.; VISCONTI, A. International Journal of Food Microbiology Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* harbouring the enterotoxin gene cluster (*egc*) and quantitative detection in raw milk by real time PCR. **International Journal of Food Microbiology**. v. 144, n. 3, p. 528-537, 2011.
- HATA, W.; KATSUDA, K.; KOBAYASHI, H.; NISHIMORI, K.; UCHIDA, I.; HIGASHIDE, ISHIKAWA, M. E.; SASAKI, T.; EGUCHI, M. Bacteriological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from humans and bulk milk. **J Dairy Sci**. v. 91, n. 2, p. 564-569, 2008.
- HOLECKOVÁ, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 9, p. 179-182, 2002.
- HWANG, S. Y.; KIM, S. H.; JANG, E. J.; KWON, N. H.; PARK, Y. K.; KOO, H. C.; JUNGA, W. K.; KIMA, J. M.; PARKA, Y. H.; Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 117, p. 99-105, 2007.
- IKEDA, T.; TAMATE, N.; YAMAGUCHI, K.; MAKINO, S. I. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 252, p. 267-272, 2005.
- JOHNSON, W. M.; TYLER, E.P.; ASHTON, F. E.; POLLARD, D. R.; ROZEE, K. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.** v. 29, p. 426-430, 1991.
- KASAMA, T.; IKAMI, M.; JIN, W.; YAMADA, K.; KAJI, N.; ATSUMI, Y.; MIZUTANI, M.; MURAI, A.; OKAMOTO, A.; NAMIKAWA, T.; OHTA, M.; TOKESHI, M.; BABA, Y. Rapid, highly sensitive, and simultaneous detection of staphylococcal enterotoxins in milk by using immuno-pillar devices. **Analytical Methods**, v. 7, n. 12, p.5092-5095, 2015.
- KARAHAN, M.; AÇIK, M. N.; ÇETINKAYA, B. Investigation of Toxin Genes by Polymerase Chain Reaction in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Mastitis in Turkey. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 8, p. 1029-1035, 2009.
- KUROISHI, T.; KOMINE, K.; KAI, K.; ITAGAKI, M.; KOBAYASHI, J.; OHTA, M.; KAMATA, S.; KUMAGAI, K. Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin-C and toxic shock syndrome toxin-1 in bovine mammary gland secretions, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 65, n. 8, p. 899-906, 2003.
- KREWER, C. C.; LACERDA, I. P. S.; AMANSO, E. S.; CAVALCANTE, N. B.; PEIXOTO, R. M.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; COSTA, M. M.; MOTA, R. A. Etiology, antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* spp. and risk factors associated with bovine mastitis in the states of Bahia and Pernambuco. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 5, p. 601-606, 2013.
- KWON, N. H.; KIM, S. H.; PARK, K. T.; BAE, W. K.; KIM, J. Y.; LIM, J. Y.; AHN, J. S.; LYOO, K. S.; KIM, J. M.; JUNG, W. K.; NOH, K. M.; BOHACH, G. A.; PARK, Y. H. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing

of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. **Int. J. Food Microbiol.** v. 97, p. 137-145, 2004.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária de Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 5, p. 702-709, maio 2005.

LAPPIN, E.; FERGUSON, A. J. Gram-positive toxic shock syndromes. **Lancet Infect Dis.** v. 9, p. 281-90, 2009.

LONGARAY, S. M. **Identificação de enterotoxinas produzidas por linhagens de *Staphylococcus aureus* envolvidas em surtos de doenças transmitidas por alimentos no período de 2002 a 2003, no Rio Grande do Sul** - Porto Alegre: UFRGS, 2007. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 2007.

LUZ, I. S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da Região Agreste de Pernambuco.** 2008. 125 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

MASUD, T.; ALI, A.M.; SHAH, M.A. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy products. **Aust J Dairy Technol**, n. 48, p.30-32, 1993.

MATSUNAGA, T.; KAMATA, S.; KAKIICHI, N.; UCHIDA, K. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, p. 297-300, 1993.

MEDEIROS, M. I. M.; NADER FILHO, A.; SOUZA, V.; MELO, P. C.; FERREIRA, L. M.; CANALEJO, L. M. M. Epidemiologia molecular aplicada ao monitoramento de estirpes de *Staphylococcus aureus* na produção de queijo minas frescal. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n.1, p.98-105, 2013.

MENDONÇA, C. L.; FIORAVANT, M. C. S.; SILVA, J. A. B. A.; SOUSA, M. I.; EURIDES, D.; LANGONI, H. Etiologia da mastite bovina: revisão. **Veterinária Notícias**, v. 5, n. 1, p. 107-118, 1999.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; LODI, R. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains from italian dairy products. **Int. J. Microbiol.** v. 2009, 2010.

MOTA, R. A.; MEDEIROS, E. S.; SANTOS, M. V.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; MOURA, A. P. B. L.; COUTINHO, L. C. A. Participação dos *Staphylococcus* spp. na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). **Ciênc. Anim. Bras.** v. 13, p. 124-130, 2012

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; AMARAL, L. A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; OLIVEIRA, R. P. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.5, 2007.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.;

SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, n. 98, p.73-79, 2005.

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

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; YU, S.; HU, D. L.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates Harboring *seg*, *seh*, or *sei* Genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 857- 862, 2002.

OMOE, K.; HU, D. L.; ONO, H. K.; SHIMIZU, S.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; UCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K.; IMANISHI, K. I. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. **Infection and immunity**, v. 81, n. 10, p. 3627-3631, 2013.

PÁDUA, I. P. M. **Avaliação da presença de estafilococos enterotoxigênicos em leite mastítico através de métodos convencionais e análise da composição dos ácidos graxos por cromatografia gasosa**, 2001, 60 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

PELES, F.; WAGNER, M.; VARGA, L.; HEIN, I.; RIECK, P.; GUTSER, K.; KERESZTURI, P.; KARDOS, G.; TURCSANYI, I.; BERI, B.; SZABO, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 186-193, 2007.

PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; ZOTTI, T. R.; ARISI, A. C. M. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 145-148, 2009.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. São Paulo: Milkbizz, 2002. 192 p.

PINHEIRO de SÁ, M. E.; CUNHA, M. L. R. S.; ELIAS, A. O.; VICTÓRIA, 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. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 41, n. 5, p. 320-326, 2004.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n. 8, 2010.

QUINN P. J.; CARTER M. E.; MARKEY B. K.; CARTER G. R. Mastitis, p. 327-344. In: **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe Publishing, 1994.

QUINN, P. J.; MARCKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: ARTMED, p.453-460, 2005.

RALL, V. L. M.; VIEIRA, F. P.; RALL, R.; VIEITIS, R. L.; FERNANDES-JR, A.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K.F.G.; ARAÚJO-JR, J. P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Vet Microbiol.** v. 132, p. 408–13, 2008.

- RODRÍGUEZ, A.; GORDILLO, R.; ANDRADE, M. J.; CÓRDOBA, J. J.; RODRÍGUEZ, M. Development of an efficient real-time PCR assay to quantify enterotoxin-producing staphylococci in meat products. **Food Control**, v. 60, p. 302-308, 2016.
- SALASIA, S. I. O.; KHUSNAN, Z.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in Java in Indonesia and Hesse in Germany. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 5, p. 103-109, 2004.
- SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- SANTOS, S. J. **Detecção de genes que codificam para enterotoxinas produzidas por *Staphylococcus aureus* isolados de leite de tanques de expansão comunitários em Alagoas / Sidney José dos Santos**. 2014. 48 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2014.
- 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**. 2000. 75 f. Tese (Doutorado) - Escola Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- SENGER, A. E. V.; BIZANI, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal, produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas/RS, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 5, n. 2, p. 25-42, 2011.
- SHANEHBANDI, D.; BARADARAN, B.; ETEGHAD, S.; ZARREDAR, H. Occurrence of methicillin resistance and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in traditional cheeses in the north west of Iran. **IRSN Microbiology**, 5 p., 2014.
- SHARMA, N. K.; REES, C. E. D.; DODD, C. E. R. Development of a single reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Appl. Env. Microbiol.** v. 66, p. 1347-1353, 2000.
- SIDHU, M.; GURJAR, A.; HEGDE, N.; LOVE, B.; JAYARAO, B. Detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. **NMC Annual Meeting of Procedures**, p. 248-249, 2006.
- STEPHAN, R.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A. A.; LÄMMLER, C. H. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 373-382, 2001.
- TAKEUCHI, S.; ISHIGURO, K.; IKEGAMI, M.; KAIDOH, T.; HAYAKAWA, Y. Production of toxic shock syndrome toxin by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. **Veterinary Microbiology**, v. 59, p. 251-258, 1998.
- VAN LEEUWEN, W. B.; MELLES, D. C.; ALAIDAN, A.; AL-AHDAL, M.; BOELEN, H. A. M.; SNIJDERS, S. V.; WERTHEIM, H.; VAN DUIJKEREN, E.; PEETERS, J. K.; VAN DER SPEK, P. J.; GORKINK, R.; SIMONS, G.; VERBRUGH, H. A.; VAN BELKUM, A. Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** v. 187, n. 13, p. 4584-4591, 2005.

VERAS, J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALIM, C. C.; SILVA, M. C. C.; MARTINS, R. T.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104/105, p. 218-119, jan./fev. 2003.

VASCONCELOS, N. G.; PEREIRA, V. C.; ARAUJO-JUNIOR, J. P.; CUNHA, L. R. S. Molecular detection of enterotoxins E, G, H and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 749-762, 2011.

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