



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

**GENOTIPAGEM DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADOS DE MASTITES SUBCLÍNICAS BOVINA NO
DISTRITO FEDERAL E ENTORNO**

HUDSON HOLANDA DE ANDRADE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

JULHO/2012



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

**GENOTIPAGEM DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*
ISOLADOS DE MASTITES SUBCLÍNICAS BOVINA NO
DISTRITO FEDERAL E ENTORNO**

HUDSON HOLANDA DE ANDRADE

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a SIMONE PERECMANIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: DM 050/2012

BRASÍLIA/DF

JULHO 2012



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

**GENOTIPAGEM DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE MASTITES
SUBCLÍNICAS BOVINA NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO**

HUDSON HOLANDA DE ANDRADE

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

APROVADA POR:



**SIMONE PERECMANIS, PROF.^a DR^a (Universidade de Brasília)
(ORIENTADORA)**



**ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, PROF.^a DR^a (Universidade de Brasília)
(EXAMINADORA INTERNA)**



**CAROLINA RISCADO POMBO, PROF.^a DR^a (Universidade de Brasília)
(EXAMINADORA EXTERNA)**

BRASILIA/DF, 13 DE JULHO DE 2012

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ANDRADE, H.H. **Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites subclínicas bovina no Distrito Federal e Entorno.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 60 p. Dissertação de Mestrado.

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

Andrade, Hudson Holanda

Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites subclínicas bovina no Distrito Federal e Entorno. / Hudson Holanda de Andrade orientação de Simone Peregmanis – Brasília, 2012. 60 p.: Il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012

1. Mastite Subclínica Bovina. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Genotipagem. 4. Resistência antimicrobiana. I. Peregmanis, S. II. Título

CDD ou CDU
Agris / FAO

"Não me pergunte do que sou capaz. Apenas dê-me a missão."

AGRADECIMENTOS

Eis que chegou o momento de expressar sinceros agradecimentos a muitos amigos e familiares. Para maior percepção desse sentido devo contar que esta não foi uma caminhada breve, mas uma travessia que parecia sem fim, principalmente pelas dificuldades pessoais de toda ordem que ocorreram neste período. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força.

Agradeço inicialmente a Deus pela presença constante em minha vida e dando coragem e fé para não desistir.

Agradeço aos meus filhos Gabriel Gomes, André Farias e Samuel Farias, por me mostrarem a necessidade de continuar sempre. Ficam também registradas as desculpas pelas ocasiões em que estive ausente.

Agradeço aos meus pais Bonifácio e Dorinha e minha querida irmã Aline Holanda, pelos esforços despendidos para minha formação e por me estimularem nas horas mais árduas.

A minha esposa Vânia Farias, inicialmente peço desculpas pelos nervosismos e ausências que ficaram constantes nesta etapa final. Porém agradeço muito suas sábias lições de esperança, amor, compreensão, alegria, carinho, paciência e dedicação.

Agradeço à minha orientadora/chefe/amiga, Simone Perecmanis, por sempre me incentivar nos estudos desde a época de graduação e pós-graduação. Seus ensinamentos e experiência profissional serão valiosos na minha caminhada acadêmica.

Agradeço as professoras Ângela Patrícia e Carolina Pombo por terem aceitado participar da minha banca, pois seus ensinamentos serão de supra importância no meu futuro profissional.

Agradeço aos familiares, Deuzélia, Daniel, Clarô, Patrícia, Ludmylla, por compreenderem minha ausência nesta reta final. Meus tios Lindomar e Elcimar pela confiança e carinho depositado em mim.

Agradeço a todos do laboratório de Microbiologia Médica Veterinária (minha segunda casa), segundo minha esposa “primeira casa”. Meus queridos e inesquecíveis Rafael Magnum, Anne Dianne, Manu, Rafael Lourinho, Vinicius Drummond, Gustavo

Martins, Ana Paula, Marcela Tokatjian (principalmente no abstract), Luciana Lobo, Débora Chagas e todos os agregados tipos, Pibic, Pibex, estagiários, monitores... Sem vocês não seria a mesma coisa, pois como eram bons nossos cafés da manhã regados a muitas risadas, debates e pão de queijo. Serei sempre grato a todos pelo incentivo, motivação e ajuda.

Um muito obrigado especial aos verdadeiros amigos de LAB. Cleilson Alves, Vinicius Drummond, Dino, Manu, Nivaldo, Anne Daianne, Ana Paula, Thais Sermound, Nara Rubia, Nara Rodrigues e Leonardo Martins (Zé Leo), pois minha caminhada com muito de vocês já ultrapassa uma década. A distância de muitos não foi capaz de apagar o afeto, cumplicidade, motivação e carinho. Que nossos churrascos continuem sempre.

Agradeço a galerinha dos laboratórios vizinhos, Vanessa, Mirna, Anahí, Tati, Marcela Scalon “valeu muito pela ajuda na minha PCR”, Kelma, prof. Gino Chaves, prof. Kanzaki, Salvina, Anderson, por aparecerem no laboratório para dar um incentivo.

Agradeço aos meus cunhados Fábio e Tiago e cunhada querida Kelma, assim como minha sogrinha “mãezona” Dona Eva e meu sogro Alfredo, por sempre acreditarem em mim, além é claro dos maravilhosos almoços no domingo regado a uma boa conversa e cervejinha com meu cunhadão Fábio.

Agradeço também aos meus (ex) alunos do Madre, LS e aos colegas professores do Madre e LS Michelle Braga, Juliene Resende, Chico, Matheus, Andrea Xuxu, Claudinha, Alexandra Braga, Sol Paz, Simone Tavares, Dionísio Neto, Dirce, Walquiria e Alcione que sempre acreditaram no meu potencial.

Agradeço à Kelly da secretaria da pós por ter sempre uma enorme paciência, nas minhas dúvidas, pelos lembretes, pelos quebra galhos e claro pela sua amizade.

Dedico este trabalho a meu ex-professor de matemática (curso técnico) Antônio José por ter falado em sala que eu jamais seria um bom profissional e que nunca conseguiria entrar na UnB. Suas palavras me fizeram criar entusiasmo para poder um dia te provar o contrário, e não ser apenas um professor em sala de aula, mas sim um educador e formador de opiniões.

Por último dedico este trabalho as minhas avós Maria Madalena (*in memorian*) e Djanira de Holanda (*in memorian*).

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACIONES.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
Definição e tipificação das mastites.....	3
Agentes etiológicos causadores da mastite infecciosa.....	5
Testes diagnósticos.....	5
a) Contagem de células somáticas.....	5
b) <i>California Mastitis Test</i> (CMT).....	6
c) Teste Tamis.....	6
d) Cultura.....	6
Situação da Mastite em rebanhos bovinos.....	7
A Mastite bovina e sua importância econômica no mundo.....	7
A Mastite bovina no Brasil.....	8
Importância dos <i>Staphylococcus aureus</i> na mastite.....	8
Classificação dos <i>Staphylococcus aureus</i>	9
Habitat do microrganismo.....	11
Característica morfológicas e bioquímicas.....	11
Cultivo e identificação.....	11
Fatores de virulência.....	12
a) Constituintes da parede celular.....	12
b) Toxinas.....	12
c) Enzimas.....	14
Antibiograma e resistência antimicrobiana.....	15
OBJETIVOS.....	17
Geral.....	17
Específico.....	17
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
CAPÍTULO II.....	23
GENOTIPAGEM DE CEPAS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ISOLADOS DE MASTITES SUBCLÍNICAS BOVINA NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO, BRASIL.....	23
GENOTYPING OF <i>Staphylococcus aureus</i> STRAINS ISOLATED FROM BOVINE WITH SUBCLINICAL MASTITIS IN DISTRITO FEDERAL AND ENTORNO, BRAZIL.....	23
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
Obtenção das amostras.....	26

Isolamento e identificação bioquímica.....	26
Teste de susceptibilidade antimicrobiana.....	27
Identificação por PCR dos genes de coagulase e espécie-específico.....	28
RESULTADO.....	30
Isolamentos bacterianos e identificação bioquímica.....	30
Avaliação de sensibilidade a antimicrobianos de <i>S. aureus</i>	31
Genes da coagulase e genes de espécie-específico.....	32
DISCUSSÃO.....	35
APROVAÇÃO PELO COMITER DE ÉTICA.....	38
AGRADECIMENTOS.....	38
CONCLUSÕES.....	39
REFERENCIAS.....	40
CAPÍTULO III.....	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

		Página
Tabela 01	Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho e o tamanho dos amplicons	29
Tabela 02	Tabela de temperaturas e tempos utilizados na PCR	30
Tabela 03	Microrganismos isolados nas amostras	31
Tabela 04	Dados dos testes bioquímicos realizados com os <i>S. aureus</i>	32
Tabela 05	Porcentagens de resistência aos antimicrobianos testados	33

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 01	Diagrama da infecção intramamária através do canal da teta	10
Figura 02	Testes bioquímicos utilizados na caracterização de <i>S. aureus</i> .	13
Figura 03	Mapa do Distrito Federal e Entorno e em destaque os locais de coleta	27
Figura 04	Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados da amplificação dos genes da coagulase	34

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

AroA	Gene espécie-específico do <i>Staphylococcus aureus</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Infuso cérebro-coração
Bp	Pares de base
CCS	Contagem de células somáticas
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMT	<i>Californian Mastit Test</i>
CoA	Genes da coagulase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dnase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
FA ₁	Primer Fwd de espécie-específico
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrogênio
MicroMedVet	Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
O/F	Oxidação e Fermentação
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RA ₂	Primer Rev de espécie-específico
RFLP	Polimorfismo dos fragmentos de restrição
RIDE/DF	Região Integrada de Desenvolvimento do Distrito Federal e Entorno
TEB	Tampão de corrida
TSST-1	Toxina da síndrome do choque Tóxico 1
VP	Voges Proskauer

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* está entre os microrganismos mais comumente isolados em mastite subclínica bovina, sendo muito prejudicial para os tecidos produtores de leite devido à liberação de toxinas e de difícil tratamento. O objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de resistência antimicrobiana e genotipificar os genes da coagulase e espécie-específicos dos *S. aureus* nas propriedades do Distrito federal e Entorno. Foram analisadas 47 amostras de leite de 116 animais de diversas raças que apresentaram um escore de 3+ no teste do *Californian Mastit Test*. Foi incorporado mais 28 amostras do banco de germoplasma do Laboratório de Microbiologia (MicroMedVet) da Universidade de Brasília aos testes, totalizando 75 amostras. O teste do perfil de resistência antimicrobiana demonstrou que a penicilina (71,2%), ampicilina (52,9%) e enrofloxacina (39,9%) foram os antibióticos que mais apresentaram resistência. Os maiores índices de sensibilidades antimicrobianas foram visto na gentamicina (79,8%), neomicina (76,9%), norfloxacina (76,9%), cefalexina (74,1%), cefazolina (74,1%), lincomicina (74,1%), oxacilina (74,1%), tetraciclina (74,1%), tobramicina (74,1%), ceftiofur (71,2%). A sensibilidade da enrofloxacina apresentou uma discrepância muito elevada quando comparada a estudos anteriores, pois no presente trabalho seu índice foi de apenas 51,3%. Os genes da coagulase (CoA) obtiveram quatro diferentes tamanhos de bandas do produto da PCR nas amostras testadas. Foram elas 490bp (2,66%), 570bp (33,35%), 680bp (41,33%), e 780bp (22,66%). O gene de espécie-específico amplificou todas as 75 amostras com fragmentos de 1153bp e mostrou ser uma ferramenta útil na identificação rápida de *S. aureus*. Os resultados apresentados nesse estudo demonstra que o perfil de resistência antimicrobiana vem se tornando algo mundial e que técnicas simples podem facilitar a sua identificação e também mapear o polimorfismo ocorrido nos genes da coagulase.

Palavras-chave: Mastite Subclínica Bovina, *Staphylococcus aureus*, Genotipagem, Resistência antimicrobiana

ABSTRACT

GENOTYPING OF *Staphylococcus aureus* STRAINS ISOLATED FROM BOVINE WITH SUBCLINICAL MASTITIS IN DISTRITO FEDERAL AND ENTORNO, BRAZIL.

Staphylococcus aureus is one of the most commonly microorganisms isolated from bovine subclinical mastitis, it is very damaging to the producing milk tissues due to the release of toxins and difficulty of treatment. The objective of this study was to analyze the antimicrobial resistance profile and genotyping genes of coagulase and species-specific of *S. aureus* in the properties of the Distrito Federal and Entorno. We analyzed 47 milk samples from 116 animals of several breeds that showed score of 3+ in the Californian Mastit Test. Another 28 samples from the germplasm bank of the University of Brasília Microbiology Laboratory (MicroMedVet) were incorporated to the tests, totaling 75 samples. Testing of the antimicrobial resistance profile showed that penicillin (71.2%), ampicillin (52.9%) and enrofloxacin (39.9%) were the antibiotics that showed more resistance. The highest rates of antimicrobial sensitivities were seen in gentamicin (79.8%), neomycin (76.9%), norfloxacin (76.9%), cephalexin (74.1%), cefazolin (74.1%), lincomycin (74.1%), oxacillin (74.1%), tetracycline (74.1%), tobramycin (74.1%), ceftiofur (71.2%). The sensitivity of enrofloxacin showed a very high discrepancy when compared to previous works, at the present study its index was only 51.3%. Coagulase genes (CoA) had four different PCR product bands sizes in the tested samples. These were 490bp (2.66%), 570bp (33.35%) 680bp (41.33%), and 780bp (22.66%). The species-specific gene amplified all the 75 samples with fragments of 1153bp and proved to be a useful tool for *S. aureus* rapid identification. The results presented in this study shows that the antimicrobial resistance profile is becoming worldwide and that simple techniques can facilitate their identification and also map the polymorphism occurred in the coagulase genes.

Keywords: Bovine Subclinical mastitis, *Staphylococcus aureus*, genotyping, Antimicrobial Resistance

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho leiteiro do mundo e ocupa o quinto lugar entre os países produtores de leite, contudo a produção média é de 31,6 milhões de toneladas por ano (EMBRAPA, 2012). Isso não é o suficiente para satisfazer a exigência mínima de 180 litros/ano por habitante, preconizada pela Organização Mundial de Saúde (GUIMARÃES, 2006).

A heterogeneidade dos sistemas de produção nacional, a disponibilidade sazonal de forragens, bem como falhas no manejo sanitário e reprodutivo são alguns dos fatores que poderiam explicar a baixa produtividade do rebanho leiteiro. Desse modo, melhorias nas áreas de nutrição, genética, reprodução e controle sanitário são os mais importantes para obter um aumento da competitividade deste segmento, pois vale lembrar que leite é um dos alimentos mais completos da natureza com um elevado valor nutritivo, principalmente como fonte de proteína, sais minerais, gordura e vitaminas (NIELSEN, 2009).

Em relação ao manejo sanitário, embora doenças infecciosas de grande importância econômica como a brucelose e tuberculose ainda sejam endêmicas no rebanho brasileiro, a mastite bovina constitui um dos problemas sanitários mais importantes na pecuária leiteira nacional. Tal fato gera uma grande demanda, por parte de toda cadeia produtiva do leite, por alternativas que venham minorar os prejuízos

relacionados com ocorrência dessa doença, a qual deprecia a qualidade do leite, além de diminuir a rentabilidade do empreendimento, devido principalmente à queda de produção que se verifica nos rebanhos endemicamente acometidos (ZAFALON et al., 2008).

Outro aspecto relevante é a necessidade de melhoria da qualidade do leite e derivados produzidos no Brasil, de modo a atender os requisitos de qualidade do mercado internacional, embora se saiba que o leite obtido em algumas bacias leiteiras do país já preencha os quesitos de qualidade impostos pela nova legislação (BRASIL, 2011). Muitos produtores tem dificuldade de adequação aos padrões de qualidade, sobretudo em função da heterogeneidade dos rebanhos leiteiros nacionais e do desconhecimento que a maioria dos produtores tem em relação ao impacto da mastite bovina na qualidade do leite (CUNHA e CUNHA, 2007).

Além dos aspectos econômicos que envolvem a mastite o leite e seus derivados têm sido relacionados como importantes causas de intoxicações alimentares, sendo que diversos desses microrganismos comumente envolvidos na etiologia das infecções intramamárias estão frequentemente associados com as patologias gastrointestinais humanas (COSTA, 2008).

Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar a presença de *Staphylococcus aureus* na mastite subclínica bovina no Distrito Federal e Entorno e realizar a caracterização bioquímica do microrganismo, verificar os genes da coagulase (CoA) e gene espécie-específico (AroA) através da Reação de Polimerização em Cadeia do DNA (PCR), além de definir um perfil de resistência antimicrobiana: amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, bacitracina, cefalexina, cefazolina, ceftiofur, enrofloxacina, espiramicina, gentamicina, lincomicina, neomicina, norfloxacina, oxacilina, penicilina, tetraciclina e tobramicina.

REFERENCIAL TEÓRICO

Definição e tipificação das mastites

O termo mastite é derivado das palavras gregas *mastos*, que significa “peito” e *itis*, que significa “inflamação de”. A inflamação da glândula mamária resulta em vários tipos de mastites que podem ser causadas por trauma ou lesão ao úbere, irritação química, sendo a de origem infecciosa, causada por microrganismos principalmente os bacterianos, a mais comumente encontrada (PHILPOT e NICKERSON, 2000; LADEIRA, 2007).

A reação inflamatória na glândula mamária consiste em um mecanismo protetor concebido para: a eliminação do microrganismo infeccioso, a neutralização da ação das toxinas, como auxílio na reparação dos tecidos afetados, além de ter um papel importante para tentar devolver a função normal à glândula mamária. O grau de inflamação varia muito, pois isso depende muito de como o úbere reage com a fonte de irritação. (MASSEI et al., 2008; LADEIRA, 2007; PHILPOT e NICKERSON, 2000;)

As mastites podem ser classificadas como subclínica e clínica, sendo a mastite subclínica a forma mais comum da inflamação intramamária, embora não possa ser detectada por observação visual no úbere ou mesmo no leite e por isso passe despercebida por criadores e ordenhadores. Porém a inflamação pode ser detectada através da realização de testes que conseguem indicar a sua presença como os testes *California Mastitis Test* (CMT) ou Contagem de Células Somáticas (CCS) (PHILPOT e NICKERSON, 2000), que funcionam apontando um aumento das células inflamatórias no leite e indicando a presença de uma reação inflamatória, desta forma realizando o diagnóstico para evitar perdas econômicas e aumentar as chances de recuperação do animal (SINGH e BANSAL, 2004).

A mastite clínica é caracterizada por anomalias visíveis no úbere e no leite, podendo ter grandes variações no seu grau de severidade durante o curso da patologia. Esta pode acometer os quartos mamários individualmente ou não, sendo que os mesmo apresentam um aumento da permeabilidade vascular e os componentes do plasma vão se misturar ao leite, alterando assim sua característica e o epitélio alveolar danificado faz com que o animal secrete menos leite e o mesmo pode apresentar

coágulos, sangue ou secreções. (PHILPOT e NICKERSON, 2000; CARLTON e McGAVIN, 1998) O animal pode apresentar sintomatologias evidentes do processo inflamatório no úbere, como edema, dor, calor, rubor, diminuição da motilidade ruminal, aumento da pulsação e gangrena em casos mais graves (DOMINGUES e LANGONI, 2001).

De acordo com a sua gravidade podem ser classificadas em mastite clínica subaguda, aguda ou superaguda e ainda 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, perda de apetite, apatia, redução função ruminal, aumento da frequência de pulso, desidratação, fraqueza, tremores, 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 choque, fibrose no úbere, septicemia, perda da coordenação muscular, extremidades frias e redução de reflexo na pupila. (PHILPOT e NICKERSON, 2000).

A mastite pode torna-se crônica quando ocorre uma longa duração das formas clínicas descritas anteriormente ou pode começar como uma infecção subclínica com intermitentes crises de episódios clínicos. Em seus 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 no 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 e NICKERSON, 2000).

Agentes etiológicos causadores da mastite infecciosa

Os agentes etiológicos microbianos da mastite bovina são classificados em: contagiosos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* e *Mycoplasmas bovis*); patógenos ambientais (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. e *Pseudomonas* spp.); patógenos secundários ou menores (*Staphylococcus* spp. coagulase negativa); e patógenos incomuns (*Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia* spp., *Pasteurella* spp., *Mycobacterium bovis*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*, algumas espécies de bactérias anaeróbias, fungos e leveduras). (BUITENHUIS et al., 2011; QUINN et al., 2005; RADOSTIS et al., 2002; MENDONÇA et al., 1999).

TESTES DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico da mastite é realizado através da utilização de testes diretos e indiretos. Para a mastite clínica, o teste direto é realizado de forma observacional dos sinais da inflamação e com o uso da caneca telada de fundo escuro. Para diagnosticar a mastite subclínica são realizados exames microbiológicos, métodos indiretos e a CCS do leite dos quartos mamários individuais, dos animais ou mesmo do rebanho (QUINN et al., 1994).

a) Contagem de células somáticas

O teste de CCS tem sido considerado o mais preciso e confiável indicador da existência da mastite subclínica, pois a mão de obra, o tempo e a estrutura laboratorial exigidos para a técnica têm, ao longo do tempo, estimulado o desenvolvimento de muitos testes indiretos para identificar alterações na glândula mamária relacionadas à permeabilidade capilar, dano tissular, número de células somáticas, pH, viscosidade, teor de cloretos, condutividade elétrica e catalase (PARDO, 2007). A célula somática é um mecanismo de defesa do organismo que apresenta principalmente leucócitos polimorfonucleares, que migram da corrente circulatória para a glândula mamaria. Para as amostras individuais, a presença de 100.000-200.000 células/ml de leite é considerada normal, já os valores superiores a 200.000 células são indicativas de uma

mastite subclínica e sua contagem pode ser realizada por método microscópico ou com equipamentos eletrônicos automatizados (LADEIRA, 2007).

b) *California Mastitis Test (CMT)*

O teste do CMT é um indicador sensível da presença de inflamação no úbere, apesar de não ser capaz de distinguir as possíveis causas da inflamação. Este método diagnóstico tem como fundamento a reação determinada por um detergente aniônico (alquil laurilsulfonato de sódio) capaz de emulsionar os lipídios das membranas das células epiteliais e dos leucócitos presentes no leite, liberando o seu material genético (DNA) e determinando a formação de um composto gelificado correspondente à quantidade de células presentes (PARDO, 2007; BRITO et al., 1997; SCHALM e NOORLANDER, 1957). A intensidade da reação produzida pelo CMT é classificada 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) (PARDO, 2007; JORGE et al., 2005).

c) Teste Tamis

O teste da caneca de fundo escuro (Teste Tamis) consiste em examinar os primeiros jatos de leite previamente à ordenha dos animais. Pesquisam-se a presença de pus, grumos de fibrina, sangue e outras alterações sugestivas de reação inflamatória na glândula mamária, mas que ainda não são perceptíveis externamente ao úbere, sendo que este teste deve ser executado diariamente em todos os quartos de todos os animais em lactação, e em todas as ordenhas, pois permite o diagnóstico precoce da mastite subaguda. O tratamento se empregado precocemente, proporcionará maiores chances de cura e menor descarte de leite. (COSTA, 2008)

d) Cultura

A cultura bacteriológica é considerada a técnica padrão ouro para se estabelecer o estado sanitário da glândula mamária em relação à ocorrência das infecções intramamárias, porém resultados falso-positivos e falso-negativos possam ocorrer

devido à eliminação intermitente do agente microbiano no leite, a presença de resíduos de sanitizantes ou antibióticos. Após a realização da classificação dos microrganismos através dos testes bioquímicos, deve ser realizada a avaliação do perfil de resistência aos antimicrobianos, pois além de mostrar o grau de susceptibilidade antimicrobiana, auxilia no estabelecimento e disseminação de clones bacterianos em um rebanho, tendo estreita associação com mudanças no manejo, tais como a implementação de tratamento antibiótico sistemático, estabulação e a introdução de ordenhadeira mecânica, fatores que atuam como forças seletiva sobre os patógenos causadores da mastite (COSTA, 2008; REBHUN, 2000).

SITUAÇÃO DA MASTITE EM REBANHOS BOVINOS

A Mastite bovina e sua importância econômica no mundo

A mastite bovina tem uma importância econômica muito grande para a cadeia leiteira, pois a patologia impacta negativamente um animal ou no desempenho do rebanho leiteiro. Seus custos diretos incluem veterinários, medicamentos, descarte de leite, produção e qualidade do leite reduzida. Os indiretos nem sempre são perceptíveis ao criador por isso podem passar por custos ocultos, pois neles incluem a redução de fertilidade, aumento do risco de abate e ocasionalmente a mortalidade. (NIELSEN, 2009)

Como a mastite bovina está difundida mundialmente em todos os continentes seus agentes causadores vêm sofrendo mudanças rápidas na resposta infecciosa intramamária e isso pode ser atribuído às diferenças entre os países com relação a sua legislação, serviços laboratoriais, tratamento ou prática de gestão dos agricultores (SÁ et al., 2004).

A indústria de laticínios em todo o mundo obteve avanços significativos ao longo dos últimos cinquenta anos, principalmente no conhecimento da seleção genética dos animais e mudanças nutricionais nos rebanhos. Outro ponto importante é o bem-estar do gado leiteiro visto como vital para maximizar a rentabilidade e aumentar a percepção pública dos sistemas leiteiros modernos (ZADOKS e FITPATRICK, 2009).

A mastite bovina no Brasil

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), os estudos realizados no Brasil mostraram que quartos mamários com mastite subclínica produziram em média 25 a 42% menos leite do que quartos mamários normais. Nos Estados Unidos, estima-se que o custo por vaca/ano devido à mastite seja de aproximadamente US\$ 185, o que corresponde a um custo anual de US\$1,8 bilhão. Esse valor corresponde a aproximadamente 10% do total de leite vendido pelos produtores. Deste, cerca de dois terços corresponde à redução na produção de leite devido à mastite subclínica. A mastite bovina tem ocorrência nas diversas regiões de criatório leiteiro do Brasil. (FREITAS et al., 2009).

O Brasil produziu no ano de 2010 31,7 milhões de toneladas de leite e ficou como segundo maior produtor de leite da América, permanecendo atrás apenas dos Estados Unidos, sendo que nossa produção é quase três vezes menor que o primeiro colocado. O Distrito Federal conta com uma produção leiteira anual de quase 40 milhões de litros e vem sofrendo pequenas oscilações nos últimos 10 anos (EMBRAPA, 2012).

A mastite no Brasil tem um ponto de vista muito forte na saúde pública devido à qualidade do leite e seus derivados, pois os dados disponíveis sobre o assunto são muito divergentes. São frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leites crus ou de derivados produzidos com leite contaminado com microrganismos patogênicos e suas toxinas (ANDRADE, 2005). FAGUNDES e OLIVEIRA (2004) afirmam que 44% do leite consumido no Brasil é provenientes do mercado informal, sendo comercializado sem qualquer tratamento térmico ou controle laboratorial.

Importância dos *Staphylococcus aureus* na mastite

Os *S. aureus* tem um papel muito importante como causadores da mastite, pois são mais prejudiciais para a glândula mamária, devido à liberação de toxinas. Inicialmente os *S. aureus* provocam danos nos tecidos que revestem as cisternas do teto e da glândula mamária e logo depois passar para o sistema de dutos e podem estabelecer profundos bolsos de infecção nos tecidos produtores de leite (Figura 01). O sistema imunológico tenta manter as bactérias em um só lugar por compartimentar

estas áreas com leucócitos e tecido cicatricial, porém as bactérias periodicamente são lançadas a partir de tais áreas e infectam outros tecidos (PHILPOT e NICKERSON, 2000).

Os *S. aureus* é o principal agente das mastites classificadas como contagiosas, pois sua taxa de isolamento é variável de acordo com diferentes autores, entretanto, o mesmo tem sido considerado como de maior significado nas infecções intramamárias. Quanto a sua participação nas mastites, clínicas ou subclínicas, encontra-se em 16,9% e 76,5% dos casos, respectivamente (SÁ et al., 2004).

Classificação dos *Staphylococcus aureus*

Os Estafilococos são bactérias Gram-positivas que tendem a se organizar em conjuntos irregulares ou "cachos de uvas". O diâmetro médio dos cocos é de 1.0µm, sendo anaeróbios facultativos, fermentativa O/F glicose, catalase positiva, oxidase negativa e não são móveis. Seu crescimento ocorre melhor em ágar nutriente e ágar sangue ovino 5%, mas não crescem em agar MacConkey (QUINN et al., 1994).

Os *S. aureus* são denominados assim por causa da pigmentação amarela das colônias (aureus = dourado), (TORTORA et al., 2008) fato já descrito desde 1884 por Rosenbach, que propôs a nomenclatura apropriada ao grupo dos Estafilococos em dois tipos de colônias, sendo a amarela dos *Staphylococcus aureus* e a branca dos *Staphylococcus albus*, esta chamada atualmente de *Staphylococcus epidermidis*. O Manual Bergey (HOLT et al., 1994) descreve mais de 20 espécies de *Staphylococcus*, sendo os *S. aureus* bactérias patogênicas que fazem parte da microbiota endógena de diferentes espécies animais, incluindo o homem.

Existem diferenças entre amostras isoladas das espécies humana, bovina e canina, diferenças estas usadas para classificar ecovariedades de acordo com um hospedeiro específico (CARDOSO et al., 2000).

De acordo com Baird - Parker (1990) uma das características típicas dos *S. aureus* é que eles são tolerantes a concentração de 10% NaCl, crescem numa faixa de pH 4,0-10, são bactérias mesófilas com uma faixa de temperatura entre 6,7°C a 48°C, coagulase positiva e podem provocar a síndrome do choque tóxico.

É uma bactéria, classificada taxonomicamente, segundo Cavalier-Smith (2006):

- Domínio *Prokaryota*
- Reino *Bacteria*
- Filo *Firmicutes*
- Classe *Bacilli*
- Ordem *Bacillales*
- Família *Staphylococcaceae*
- Gênero *Staphylococcus*
- Espécie *Staphylococcus aureus*

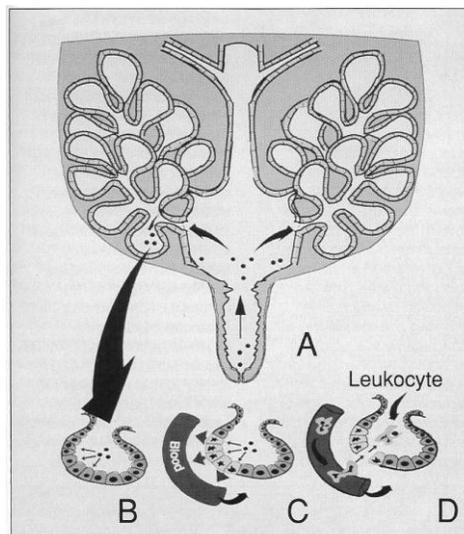


Figura 01 – Diagrama da infecção intramamária através do canal da teta. a) A adesão dos *S. aureus* aos tecidos internos podem evitar que eles sejam lavados durante a ordenha e ajudar a estabelecer a infecção. b) Vão entrar nos alvéolos onde ocorre sua multiplicação. c) Ocorre produção de toxinas que vão produzir danos nas células epiteliais produtoras de leite, que liberam substâncias (setas maiores) para a corrente sanguínea para aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos. d) Isto permite que o plasma sanguíneo contendo os leucócitos se mova para o alvéolo para englobar as bactérias, e diluí soros com toxinas bacterianas. (Fonte: Adaptado de PHILPOT e NICKERSON, 2000)

Eles crescem comparativamente bem sob condições de alta pressão osmótica e pouca umidade, o que parcialmente explica porque podem crescer e sobreviver nas

secreções nasais, pele, muitos alimentos que apresentam alta pressão osmótica ou em alimentos com pouca umidade e tendem a inibir o crescimento de outros organismos. Além disso, o pigmento amarelo provavelmente confere alguma proteção para os efeitos antimicrobianos do sol (TORTORA et al., 2008).

Habitat do microrganismo

Os *Staphylococcus aureus* podem ocorrer em todos os mamíferos do mundo, embora a propagação de estirpes entre diferentes espécies de animais é limitada. Eles colonizam a cavidade nasal do homem, pele, glândulas mamárias, membranas e mucosas e pode ser transitórios no trato intestinal. Muitas das infecções são endógenas, mas a sua sobrevivência prolongada no ambiente permite a transmissão indireta (QUINN et al., 2005 e QUINN et al., 1994).

Características morfológicas e bioquímicas

Os *S. aureus* são classificados morfológica e bioquimicamente como cocos Gram-positivos que lembram “cachos de uva”, quando examinados ao microscópio, devido à divisão irregular em planos perpendiculares e são fermentadores de glicose, maltose, produzem pigmentação e α -hemólise (figura 02). São catalase-positivos, oxidase-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos. Crescem bem em meios de cultivo comuns, como o ágar sangue a 37°C em 24h, formando colônias de tamanho médio (1 a 2 mm), lisas, brilhantes, com bordas contínuas e coloração amarelada ou esbranquiçada. (ANVISA, 2012; QUINN et al., 2005; OLIVEIRA, 2000 e QUINN et al., 1994).

Cultivo e identificação

Crescem bem no ágar sangue de carneiro 5% por 24 horas e suas colônias podem ter pigmento amarelo ou amarelo-alaranjado, sendo estas mais pronunciadas após incubação de 72h em temperatura ambiente (ANVISA, 2012). A coagulase é positiva devido o fibrinogênio no plasma de coelho ser convertido em fibrina pela coagulase, reduzem o nitrato em nitrito, gelatina, DNase e VP positivos. Fermenta os carboidratos: glicose, lactose, maltose, manitol e sacarose.

Em meio de cultivo ágar sal manitol (7,5% NaCl) ocorre a inibição do crescimento de várias bactérias e as colônias de *S. aureus* são circundadas por um halo amarelo. Apresentam resistência aos antibióticos: polimixina B (300 UI) e bacitracina (10 UI) e sensibilidade à novabiocina (5mg) (QUINN et al., 1994; OLIVEIRA, 2000; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

Fatores de virulência

Os principais fatores de virulência do *S. aureus* são os componentes da superfície celular e toxinas. Sendo que algumas evidências sugerem que determinadas enzimas também podem ser consideradas fatores de virulência (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

a) Constituintes da parede celular

A parede celular é constituída de glicopeptídeos (polímeros de *N*-acetilglicosamina e de ácido *N*-acetilmurâmico ligados de forma cruzada), similares aos encontrados em outras bactérias Gram-positivas, e ácidos teicóicos que atuam na aderência específica da bactéria na superfície das mucosas. Os ácidos teicóicos e os glicopeptídeos conferem rigidez e elasticidade à parede celular além de outras propriedades biológicas que supostamente contribuem para a virulência. A camada peptideoglicana contribui para a patogenicidade dos *S. aureus*, pois ativa a via alternativa do complemento e estimula a produção de citocinas. (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005 e KONEMAN et al., 2001).

b) Toxinas

O *S. aureus* produz várias toxinas que atuam através de diferentes mecanismos, algumas são citotoxinas e outras superantígenos e um terceiro tipo que degrada moléculas de adesão das células epiteliais cutâneas. Dentre as citotoxinas temos a alfa-toxina que tem a capacidade de formar poros na membrana celular dos leucócitos promovendo a saída do conteúdo celular e conseqüentemente sua lise. Esta atividade pode servir também como um mecanismo de evasão antifagocitária, pois além da lesão celular, ela pode promover a liberação de citocinas e conseqüentemente contribuir para

o desenvolvimento do choque séptico (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; KONEMAN et al., 2001 e QUINN et al., 1994).

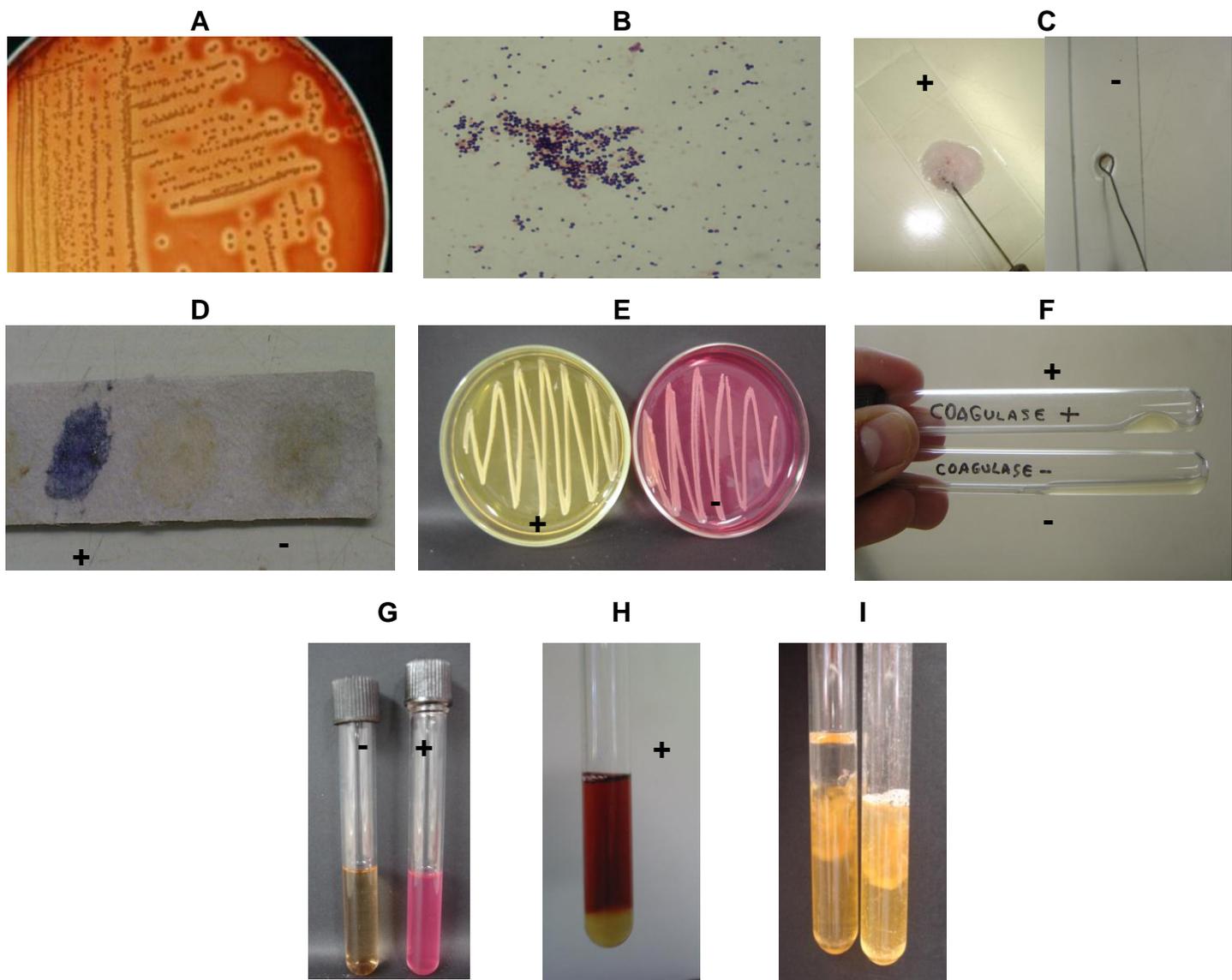


Figura 02 – Testes bioquímicos utilizados na caracterização de *S. aureus*. (A) Crescimento em ágar sangue 37°C / 24h, com formação de alfa-hemólise; (B) Visualização de microscopia óptica (1000X) com forma cocóide; (C) Produção de catalase em lâmina; (D) Teste de oxidase em filtro de papel; (E) Fermentação do ágar sal manitol; (F) Teste da coagulase em tubo; (G) Fermentação de carboidrato (glicose, manitol); (H) Redução de nitrato em nitrito; (I) Oxidação-fermentação da glicose: reação fermentativa; + = Reação positiva; - = Reação negativa (Fonte: cedido gentilmente por Vinicius Drummond)

A leucocidina é uma exotoxina que exerce um efeito tóxico direto sobre a membrana dos leucócitos polimorfonucleares humanos, causando desgranulação do citoplasma, edema celular e lise. Esta proteína apresenta atividade proteolítica e dissolve a matriz mucopolissacarídica da epiderme, resultando na separação intra-epitelial das ligações celulares do estrato granuloso (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; KONEMAN et al., 2001).

As enterotoxinas estafilocócicas são proteínas extracelulares de baixo peso molecular (26.900 a 29.600 dáltons) pertencente à família das toxinas pirogênicas (PT) originada de espécies de estafilococos e estreptococos cuja estrutura, função e seqüências de nucleotídeos são semelhantes entre si (LUZ, 2008). Estão divididas em 11 tipos: A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, TSST-1, G, H e I, e com base nas diferenças sorológicas a enterotoxina C é subdividida em EEC₁, EEC₂ e EEC₃. A TSST-1 (*toxic shock syndrome toxin-1*) responsável pelo choque tóxico estafilocócico, pois estimulam os linfócitos T a liberar citocinas para desencadear o choque. (NADER FILHO et al., 2007, TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; KONEMAN et al., 2001 e KENNY et al., 1993). A produção de TSST-1 pela primeira vez isolada em cultura pura de mastite bovina em um rebanho foi relatada por Jones e Wieneke (1988). É possível que a TSST-1 represente um fator de virulência importante em casos graves de mastites segundo Cardoso, Carmo e Silva (2000) que fizeram a primeira descrição da produção desta toxina por *S.aureus* isolado de mastites no Brasil.

As enterotoxinas A e E são moléculas termoestáveis e seus mecanismos de ação ainda é desconhecido, mas sabe-se que aumenta o peristaltismo intestinal e essas condições tóxicas são autolimitadas e requerem apenas tratamento de suporte (HWANG et al., 2010).

c) Enzimas

O *S. aureus* produz várias enzimas que podem contribuir para sua virulência, a produção da catalase pode atuar inativando o H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e radicais livres tóxicos formados pelo sistema mieloperoxidase no interior das células fagocitárias, após ingestão do mesmo. A coagulase é a enzima extracelular mais importante, pois sua presença caracteriza a espécie e sua coagulação é decorrente da

transformação da protrombina em trombina que, por sua vez, ativa a formação de fibrina, a partir do fibrinogênio. A fibrinolisa estimula a transformação do plasminogênio em plasmina que possui a capacidade de dissolver coágulos. Outras enzimas incluem, DNase, hialuronidase, lipase, protease e estafiloquinase (TORTORA et al., 2008 e KONEMAN et al., 2001).

Antibiograma e resistência antimicrobiana

O antibiograma mais utilizado é por difusão em disco, onde se utilizam discos de papel contendo quantidades conhecidas de antibióticos e que são aplicados em placas inoculadas com o microrganismo testado. O antibiograma realizado desta forma é relativamente barato, tecnicamente direto e confiável se corretamente padronizado (COLLINS et al., 2004).

A susceptibilidade antimicrobiana pode ser definida qualitativamente de três formas, sendo Sensível (S), que indica que a dose padrão do antibiótico deve ser apropriada para tratar a infecção pela cepa isolada; Resistente (R), que indica que a infecção causada pela cepa testada não deverá responder ao agente antimicrobiano; e Intermediário (I), onde as cepas são moderadamente susceptíveis ou moderadamente resistentes e indica que a cepa pode ser inibida por altas doses do antibiótico ou em locais onde o agente antimicrobiano se concentra, como no leite, por exemplo (COLLINS et al., 2004).

A antibioticoterapia não deve ser usada no lugar de outros métodos de controle e prevenção de doença. Fatores como nutrição, ambiente, higiene, manejo e vacinação devem sempre ser levados em conta (JACKSON e COCKCROFT, 2007).

A minimização do uso de antibióticos, facilita a obtenção de produtos de origem animal livres de resíduos de antibióticos, bactérias zoonóticas resistentes e bactérias resistentes que possam transferir essa resistência a bactérias do ser humano (JACKSON e COCKCROFT, 2007).

Como fato marcante do uso indiscriminado de antibióticos, a utilização muito difundida de metilina e outras penicilinas semi-sintéticas no final dos anos 60 induziu à emergência de *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA), que continuam a persistir tanto em ambientes de cuidado à saúde como na comunidade (STEVENS, 2003).

Atualmente, muitos dos isolados de *S. aureus* apresentam resistência a meticilina e alguns isolados têm desenvolvido também resistência a mais de 20 diferentes agentes antimicrobianos, tais como a vancomicina, lincomicina, amoxicilina dentre outros (LUZ, 2008).

OBJETIVOS

Geral

Isolar e genotipificar cepas de *Staphylococcus aureus* em mastites subclínicas em fêmeas bovinas em granjas leiteiras do Distrito Federal e Entorno.

Específicos

- Caracterizar bioquimicamente dos *S. aureus* isolados do leite bovino;
- Detectar nas amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas, através da reação em cadeia da polimerase (PCR) os genes da coagulase (CoA) e gene espécie – específico (AroA);
- Definir um perfil de sensibilidade dos *Staphylococcus aureus* isoladas frente aos antimicrobianos: amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, bacitracina, cefalexina, cefazolina, ceftiofur, enrofloxacina, espiramicina, gentamicina, lincomicina, neomicina, norfloxacina, oxacilina, penicilina, tetraciclina e tobramicina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, H.H.; ***Staphylococcus aureus* na mastite bovina do Distrito Federal e Entorno.** p. 38 - Monografia de Conclusão de Curso (Biologia) - Faculdade Juscelino Kubitschek. Taguatinga D.F. – 2005.

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária: **Gram – positivos / Staphylococcus** Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/isol_sta.htm > Acesso em: 11/06/2012.

BAIRD- PARKER, A.C. **The staphylococci- an introduction.** Journal of Applied Bacteriology Supplied, 1S-8S, 1990.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 62, de dezembro de 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília D.F. 2011.

BRITO J. R. F., CALDEIRA G. A. V., VERNEQUE R. S. & BRITO M. A. V. P. 1997. **Sensibilidade e especificidade do *California Mastites Test* como recurso diagnóstico da mastite subclínica em relação à contagem de células somáticas** Pesq. Vet. Bras. 17(2):49-53, abr./jun. 1997.

BUITENHUIS, B.; RONTVED, C.M.; EDWARDS, S.M. et al. **In depth analysis of genes and pathways of the mammary gland involved in the pathogenesis of bovine *Escherichia coli*-mastitis.** BioMedCentral Genomics. Published online – February 28. V.12, 2011.

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

CARLTON, W., McGAVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thomson.** 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 672 p.

CAVALIER-SMITH T. **Cell evolution and Earth history: stasis and revolution.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361 (1470): p. 969–1006. 2006

COLLINS, C. H.; LYNE, P. M.; GRANGE, J. M.; FALKINHAM III, J. O. **Collins & Lyne's Microbiological Methods.** 8. ed. London: Arnold, 2004. 456p.

COSTA, G.M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais** / Geraldo Márcio da Costa. – 2008. 123 p.: il. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

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.

DOMINGUES, F. D.; LANGONI, H. **Manejo Sanitário Animal: mastite bovina.** 1.ed.Rio de Janeiro: EPUB, 2001, p. 171 – 182

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: **Agronegócio do leite - mastite.** Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_202_21720039247.html> Acesso em: 08/06/2012

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.

FREITAS, J.A.; PEDROSO, S.C.S.; BARROSO, R.; AGUIAR, R.V.; MONTEIRO, F.J.C., **Ocorrência de mastite em rebanhos leiteiros bovinos e bubalinos no estado do Pará.** Rev. Ciênc. Agrár., Belém, n. 52, p. 189-194, jul.dez. 2009.

GUIMARÃES, F.F. **Modificação da geografia da produção mundial de leite.** Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira, v. 9, n. 1, p.19-23, 2006.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. et al. **Bergeys's manual of determinative bacteriology.** 9.ed. Baltimore, USA: Williams e Wilkins, 1994. 787p.

HWANG, S.Y.; PARK, Y.K.; KOO, H.C.; PARK, Y.H. **Spa typing and enterotoxin gene profile of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in Korea.** Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine and BK21 Program for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea, 2010.

- JACKSON, P.G.G.; COCKCROFT, P.D. **Handbook of Pig Medicine**. Philadelphia: Saunders, 2007. 296p.
- JONES, T.O.; WIENEKE, A.A. **Staphylococcal toxic shock syndrome**. *Veterinary Record*, v. 25, p. 435-436, 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
- KENNY, K.; REISER, R.F., BASTIDA-CORCUERA, F.D. et al. **Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus***. *Journal of Clinical Microbiology.*, v. 31, n. 3, p. 706-707, 1993.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e atlas colorido**. 5. ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465p.
- LADEIRA, S.R.L. Mastite bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças dos ruminantes e equinos**. Santa Maria: Palloti, 2007. v. 1, p. 359-371.
- LUZ, I.S.; **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de pernambuco**. P.126 – Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2008.
- MASSEI, R.A.; SANTOS, W.R.M.; INFORZATO, G.R. **MASTITE – DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PREVENÇÃO: REVISÃO DE LITERATURA**. *Ver. Cient. Eletr. De Med. Vet.* Ano VI – Nº 10, 2008.
- MENDONÇA, C. L.; FIORAVANT, M.C.S.; SILVA, J.A.B.A. **Etiologia da mastite bovina**. *Veterinária notícias*, Uberlândia, v.5, n.1, p. 17-118, 1999.
- NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A. et al. **Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tático por cepas**

de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*,v.5, p.1316-1318, 2007.

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

OLIVEIRA, S.J. **Microbiologia Veterinária: Guia bacteriológico prático.** 2.ed. Canoas: Ulbra, 2000. 237p.

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.

PHILPOT, W.N.; NICKERSON, S. C. **Wining the fight Against Mastitis.** Westfalia Surge Inc. 1880 Country Farm Drive, Naperville, IL 60563. 2000.

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

QUINN, P.J.; MARCKEY, B.K.; CARTER, M.E. ; DONNELLY, W.J.; LEONARD F.C.; trad. Lúcia Helena Niederauer Weiss e Rita Denise Niederauer Weiss. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Ed. Artmed. 2005 p.453-460.

RADOSTITS O.M.; GAY C.C.; BLOOD D.C. & HINCHCLIFF K.W. 2002. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos.** 9ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1737p.

REBHUN, W.C. **Doenças do Gado Leiteiro.** São Paulo: Editora Roca, 2000. p. 339 - 377.

SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.S.R.S.; ELIAS, A.O. et al. **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.

SCHALM O. W. & NOORLANDER D. D. **Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test.** *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 130: 199-204. 1957.

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.

STEVENS, D. L. **Community-acquired *Staphylococcus aureus* infections: increasing virulence and emerging methicillin resistance in the new millennium.** Current Opinion in Infectious Diseases, London, v. 16, p. 189-191, 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 8a. ed. Porto Alegre, Brasil: ARTMED, 2008. 894p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 679p.

ZADOKS, R.N.; FITZPATRICK, J.L. **Changing trends in mastitis.** Irish Veterinary Journal. V.62 (Suppl 4). Published online - 2009.

ZAFALON, L.F.; POZZI, C.R.; CAMPOS, F.P. et al. **Boas práticas de ordenha.** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/876545/1/documentos78.pdf>>. Acesso em: 26 jul. 2012, 14:16.

CAPÍTULO II

GENOTIPAGEM DE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS DE MASTITES SUBCLÍNICAS BOVINA NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO, BRASIL

GENOTYPING OF *Staphylococcus aureus* STRAINS ISOLATED FROM BOVINE WITH SUBCLINICAL MASTITIS IN DISTRITO FEDERAL AND ENTORNO, BRAZIL.

Hudson Holanda de Andrade¹; Simone Perecmanis²

¹ Mestrando em Saúde Animal, Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), Brasília – DF

² Professor adjunto III da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (UnB), Brasília – DF

INTRODUÇÃO

A Mastite é a síndrome patológica mundial mais isolada e comum em vacas leiteiras, respondendo por até 38% de morbidade. Destes, 7% dos bovinos afetados são descartados, e 1 % morre em consequências da afecção (SMITH, 1994).

O *S. aureus* está associado à mastite bovina em todos os continentes e é considerado o agente que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária

leiteira (COSTA, 2008). No Brasil, ele é considerado o principal agente causal, com taxas de isolamento variáveis entre 8,3% e 49,23% (DONATELE et al., 2002; LAFFRANCHI et al., 2001; BRITO et al., 1999) sua transmissão ocorre usualmente entre vacas durante a ordenha e o conhecimento da sua distribuição pode ajudar na formulação de estratégias para o controle da doença (ZAFALON et al., 2008a).

A produção da coagulase pelo *S. aureus* constitui-se em um importante determinante fenotípico, uma vez que está associada à virulência desses microrganismos e sua ação ocorre juntamente com outras toxinas e fatores celulares para causar lesões. Outro fator importante é a intoxicação alimentar atribuída à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no leite ou seus derivados, como é termoestável, podem permanecer no alimento mesmo após o cozimento favorecendo assim a ocorrência da intoxicação (LUZ, 2008).

Pode-se ainda destacar a importância da avaliação do perfil de resistência aos antimicrobianos, pois a utilização indiscriminada dos antibióticos na medicina veterinária tem determinado um aumento no aparecimento de bactérias multirresistentes e conseqüentemente interferindo em um tratamento efetivo das infecções por este agente e se tornando um risco à saúde pública (COSTA, 2008).

O *S. aureus* destaca-se como um dos microrganismos mais frequentemente associados às mastites bovinas em todos os continentes e o agente que isoladamente determina as maiores perdas na pecuária leiteira. No Brasil ele é considerado como o principal agente causal da mastite, com taxas de isolamento variáveis entre 8,3% e 49,23% (COSTA, 2008)

Dados sobre a distribuição dos tipos específicos de *Staphylococcus aureus* em vacas com mastites subclínicas no Distrito Federal e Entorno são bastante escassos. Esses dados têm grande importância quando se pretende identificar e tratar os animais além de poder implantar nas propriedades medidas de controle e programas de biossegurança, pois é estimado que para cada caso de mastite clínica na propriedade existam 14 casos de mastite subclínica (LADEIRA, 2007).

O objetivo deste estudo foi realizar o isolamento bacteriano dos *Staphylococcus aureus* e realizar a análise genética dos genes da coagulase (CoA) e genes de espécie-

específico (AroA), caracterização fenotípica e realização do antibiograma do material coletado das mastites subclínicas bovinas no Distrito Federal e Entorno.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Foram obtidas amostras de leites de 116 animais de diversas raças, sendo 40 provenientes de saídas de campos e 76 enviadas diretamente ao laboratório, sendo essas coletas supervisionadas pelo veterinário responsável. As amostras foram obtidas de dez diferentes núcleos rurais (cooperativas, pequenos produtores) do Distrito Federal (Brazlândia, Sobradinho, Planaltina, Samambaia, São Sebastião e Paranoá) e Entorno (Formosa, Águas Lindas, Santo Antônio do Descoberto e Luziânia), destacados na Figura 03.

O entorno é uma região integrada de desenvolvimento do Distrito Federal (RIDE/DF). Ocupa uma região de 55.439,99 quilômetros quadrados e é composta por 42 municípios, sendo 29 do estado de Goiás e 13 do estado de Minas Gerais (CODEPLAN, 2007).

Todos os animais foram submetidos ao teste do *California Mastitis Test*, inclusive os provenientes das amostras particulares enviadas ao laboratório. A seleção dos quartos mamários foi feita a partir daqueles animais que obtiveram um escore de 3+ no CMT. O leite coletado foi armazenado em tubo coletor estéril, previamente identificado e concomitantemente à coleta de dados do animal. As amostras foram armazenadas em bolsa refrigerada até o transporte ao Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária (MicroMedVet) da UnB, onde foram processadas.

Isolamento e identificação bioquímica

Ao chegar ao laboratório, as amostras foram incubadas a 37°C *overnight* por 18 horas e posteriormente a este período as amostras de leite foram estriadas em Placas de Petri contendo meio de cultura Base para Agar Sangue acrescido de sangue de ovino desfibrilado 5% (Acumedia®), e incubadas a 37°C por 24h. Após o período de incubação as amostras que apresentava algum tipo de contaminação eram submetidas a um novo repique para isolamento destas colônias em novo Agar Sangue para realizar a identificação bioquímica das mesmas (QUINN et al., 2005 e QUINN et al., 1994).

Müller-Hinton (Bio-Rad[®]), aonde o mesmo foi passado em toda superfície do ágar segundo o método de Kirby-Bauer modificado, em recomendação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010).

As cepas foram testadas para as seguintes bases farmacológicas: amoxicilina + ácido clavulânico 20µg, ampicilina 10µg, bacitracina 10UI, cefalexina 30µg, cefazolina 30µg, ceftiofur 30µg, enrofloxacin 5µg, espiramicina 100µg, gentamicina 10µg, lincomicina 2µg, neomicina 30µg, norfloxacin 10µg, oxacilina 1µg, penicilina 30µg, tetraciclina 30µg e tobramicina 10µg. Após este procedimento, as mesmas foram incubadas a 37°C por 18h, a leitura do teste foi realizada com um paquímetro e posteriormente os dados obtidos foram comparados com a tabela padrão de interpretação, conforme tabela do CLSI (2010). Após o final de todos os procedimentos de identificação e teste do perfil antimicrobiano as amostras foram mantidas congeladas em Freezer -18°C em solução estoque (BHI + glicerol) (Himedia[®]), para depois ser realizada a extração do DNA através do lisado celular.

Identificação por PCR dos genes de coagulase e espécie-específico

As bactérias foram descongeladas do caldo e estriadas em ágar sangue de carneiro 5% e incubada a 37°C por 24h para obtenção de colônias puras e isoladas. Após esse período, foram coletadas três colônias isoladas com o auxílio de alças descartáveis e em seguida transferidas para 200µl de água Milli-Q em microtubos e depois foram acrescentados 200 µl de fenol-clorofórmio (SIGMA-ALDRICH[®]). Após realizar uma leve homogeneização os tubos foram levados à microcentrifuga (SIGMA[®] 2K15) por 15 minutos, a 13.000g, numa temperatura de 4°C.

O sobrenadante foi transferido para outro microtubo com auxílio de micropipeta para utilização na PCR. Em seguida foi acrescentado 200µl de clorofórmio e os tubos novamente foram para a microcentrifuga (SIGMA[®] 2K15) por 15 minutos, a 13.000g, numa temperatura de 4°C. Após esse segundo processo o sobrenadante foi retirado com auxílio de micropipeta e transferido para microtubos para posteriormente serem utilizados na PCR, segundo protocolo citado por Blanco et al. (1997).

As reações foram realizadas em volume final de 25 µL, contendo 4µl do DNA extraído; 2,5µl de solução tampão (10X, pht[®]); 1,25µl de dNTP (10 mM, pht[®]); 1,0µl de

Taq DNA polimerase (5U/μl, pht[®]) e 0,5μl de cada *primer* (*forward* e *reverse*) específico para genes da coagulase (CoA) e espécie-específico (AroA) (10 pmol/μl). A sequência de nucleotídeos utilizados e o tamanho dos amplicons estão listados na Tabela 01.

Tabela 01 – Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho e o tamanho dos amplicons

Nome	Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho do amplicon (bp)
CoA	5 – ATAGAGATGCTGGTACAGG -3 5 – GCTTCCGATTGTTTCGATGC – 3	490 / 570 / 680 / 780 / 850
AroA	5 - AAGGGCGAAATAGAAGTGCCGGGC -3 5 - CACAAGCAACTGCAAGCAT -3	1153

CoA = Gene da coagulase; AroA = gene espécie-específico; bp = pares de base. (Fonte: MARCOS et al., 1999 e HOOKEY et al., 1998)

As amostras foram colocadas em um termociclador da marca BIO-RAD[®], sendo rodada em ciclos diferentes conforme pode ser observado na Tabela 02 abaixo. A desnaturação, extensão e anelamento sofrem variações de acordo com cada *primer*. Para cada reação, eram feitos testes com controles negativos, com água Milli-Q no lugar do DNA no preparado, e positivos, utilizando-se uma cepa *S. aureus* ATCC 25923.

Os produto da amplificação da PCR foram submetidos à eletroforese (Biotech[®]) em gel de agarose a 1% para o Gene CoA e 1,5 % para o gene de espécie-específico. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (Major Science[®]) com a fonte ajustada para 80V; 95mA; 100W por 50 minutos. Foi utilizado como padrão de massa molecular de 100bp (EasyGen[®]). Em seguida o gel foi banhado em uma solução de água destilada com Brometo de Etídio (5mg/ml) por 20 minutos e posteriormente submetido à luz ultravioleta em transiluminador (UVP[®]), para a visualização das amplificações.

Tabela 02 – Tabela de temperaturas e tempos utilizados na PCR

Genes	Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
CoA	Desnaturação	94°C	45 segundos	1 ciclo
AroA	Desnaturação	94°C	120 segundos	1 ciclo
CoA	Desnaturação	94°C	20 segundos	30 ciclos
AroA	Desnaturação	92°C	60 segundos	40 ciclos
CoA	Anelamento	57°C	15 segundos	30 ciclos
AroA	Anelamento	58°C	60 segundos	40 ciclos
CoA	Extensão	70°C	15 segundos	30 ciclos
AroA	Extensão	72°C	90 segundos	40 ciclos
CoA	Extensão	72°C	120 segundos	1 ciclo
AroA	Extensão	72°C	10 minutos	1 ciclo

CoA = Gene da coagulase; AroA = gene espécie-específico. (Fonte: MARCOS et al., 1999 e HOOKEY et al., 1998)

RESULTADOS

Isolamentos bacterianos e identificação bioquímica

Das 116 amostras de leite coletadas foram isolados 334 microrganismos dos mais diversos gêneros Tabela 03, sendo 47 *S. aureus*. Essas cepas foram submetidas à identificação bioquímica e os resultados foram condizentes com bactérias da espécie *S. aureus*, conforme as tabelas de identificações de autores como Koneman et al. (2001), Oliveira (2000) e Quinn et al. (1994).

Para a classificação dos *S. aureus* foi realizado as provas de catalase, O/F glicose, coagulase, fermentação de glicose, fermentação de maltose e fermentação de manitol obteve-se uma apresentaram de positividade em 100% (47/47) das amostras testadas. Todos os dados referentes à identificação bioquímica citada anteriormente podem ser vistos na Tabela 04.

Tabela 03. Microrganismos isolados nas amostras

Microrganismo isolado	Total	%
<i>Actinomyces</i> spp	02	0,6
<i>Bacillus</i> spp	53	15,9
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	03	0,9
<i>Corynebacterium</i> spp	10	3,0
<i>Enterobacter agglomerans</i>	03	0,9
<i>Escherichia coli</i>	47	14,1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	03	0,9
Leveduras	28	8,4
<i>Malassezia</i> spp	05	1,5
<i>Pasteurella</i> spp	03	0,9
<i>Proteus mirabilis</i>	02	0,6
<i>Proteus vulgaris</i>	01	0,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	05	1,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	47	14,1
<i>Staphylococcus</i> spp	61	18,3
<i>Streptococcus pyogenes</i>	22	6,6
<i>Streptococcus</i> spp	13	3,9
<i>Streptococcus uberis</i>	01	0,3
Ausência de crescimento bacteriano	25	7,5

*Total de microrganismos isolados: 334

Avaliação de sensibilidade a antimicrobianos de *S. aureus*

Para a realização do teste do perfil de resistência além das 47 cepas isoladas no seguinte trabalho, também foi realizado o testes em 28 amostras de *S. aureus* do banco de germoplasma do Laboratório de MicroMedVet. da UnB. Todas essas sendo provindas de mastites subclínicas de bovinos do Distrito Federal e Entorno, com isso totalizando 75 amostras.

Com a realização do antibiograma foi possível traçar um perfil de resistência dos diferentes antibióticos testados. As bases farmacológicas que tiveram uma maior porcentagem de *S. aureus* resistente neste estudo foram a penicilina (71,2%), ampicilina (52,9%) e enrofloxacina (39,9%). Já as bases que mais apresentaram uma alta sensibilidade foram a gentamicina (79,8%), neomicina (76,9%), norfloxacina (76,9%), cefalexina (74,1%), cefazolina (74,1%), lincomicina (74,1%), oxacilina (74,1%), tetraciclina (74,1%), tobramicina (74,1%), ceftiofur (71,2%).

Tabela 04 – Dados dos testes bioquímicos realizados com os *S. aureus*

Testes Bioquímicos	Positivos	Negativos
α-hemólise	82,98%	17,02%
Catalase	100%	0,0%
Oxidase	0,0%	100%
O/F glicose	100%	0,0%
Coagulase	100%	0,0%
Fermentação Ágar sal manitol	95,75%	4,25%
Fermentação de glicose	100%	0,0%
Fermentação de manitol	93,6%	6,4%
Fermentação de maltose	100%	0,0%
Redução de nitrato	93,6%	6,4%
Gelatinase	76,6%	23,4%
Voges-Proskauer	91,5%	8,5%

47 cepas testadas

Ao avaliar cada cepa frente às bases farmacológicas a gentamicina foi a que apresentou um maior perfil de sensibilidade com quase 80% e a penicilina foi a que alcançou o maior perfil de resistência com um pouco mais de 70%. Sendo que a ampicilina revelou uma porcentagem de sensibilidade e resistência muito próxima. As porcentagens podem ser mais bem visualizadas na tabela 05.

Genes da coagulase e genes de espécie-específico

Todas as 75 amostras foram testadas para os genes da coagulase (CoA) e espécie-específico (AroA), através da técnica reação em cadeia da polimerase (PCR). No gene da coagulase os tamanhos da banda se distinguem entre 490bp, 570bp, 680bp, 780bp e 850bp (HOOKEY et al., 1998) e 627pb, 710pb, 910pb (SALEM-BEKHIT et al., 2010)

Neste trabalho verificou-se que todas as amostras bacterianas já classificadas anteriormente pelos testes bioquímicos como *S. aureus* (75/75) possuíam genes da

coagulase (CoA): 490bp, com 2,66%; 570bp, com 33,35%; 680bp, com 41,33%; 780bp, com 22,66%. Nenhuma das amostras amplificou com 850bp e o controle positivo *S. aureus* ATCC 25923 apresentou 680bp nos testes realizados. Na figura 04 mostra as diferenças obtidas a partir da amplificação da extremidade 3' do gene da coagulase.

Tabela 05 – Porcentagens de resistência aos antimicrobianos testados

Antibiótico	Sensíveis*	Intermediários*	Resistentes*
Amox.+Ác. Clav. (20/10 µg/disco)	57,0%	8,5%	34,2%
Ampicilina (10µg/disco)	47,0%	2,9%	52,9%
Bacitracina (10UI/disco)	65,5%	0,0%	34,2%
Cefalexina (30µg/disco)	74,1%	2,8%	22,8%
Cefazolina (30 µg/disco)	74,1%	0,0%	25,6%
Ceftiofur (30 µg/disco)	71,2%	0,0%	28,5%
Enrofloxacina (5 µg/disco)	51,3%	8,5%	39,9%
Espiramicina (100 µg/disco)	59,8%	8,5%	34,2%
Gentamicina (10 µg/disco)	79,8%	5,7%	14,2%
Lincomicina (2 µg/disco)	74,1%	2,8%	22,8%
Neomicina (30 µg/disco)	76,9%	2,8%	19,9%
Norfloxacina (10 µg/disco)	76,9%	8,5%	14,2%
Oxacilina (1 µg/disco)	74,1%	2,8%	22,8%
Penicilina (30 µg/disco)	22,8%	5,7%	71,2%
Tetraciclina (30 µg/disco)	74,1%	0,0%	25,6%
Tobramicina (10 µg/disco)	74,1%	2,8%	22,8%

A porcentagem está calculada em cima do total de 75 cepas testadas

No gene de espécie-específico o tamanho da banda é de aproximadamente 1153bp (SAEI et al., 2009; HOOKEY et al., 1998) sendo que todas as amostras testadas neste trabalho (75/75) ao gene amplificaram em aproximadamente 1153bp como descrito pelo autor.

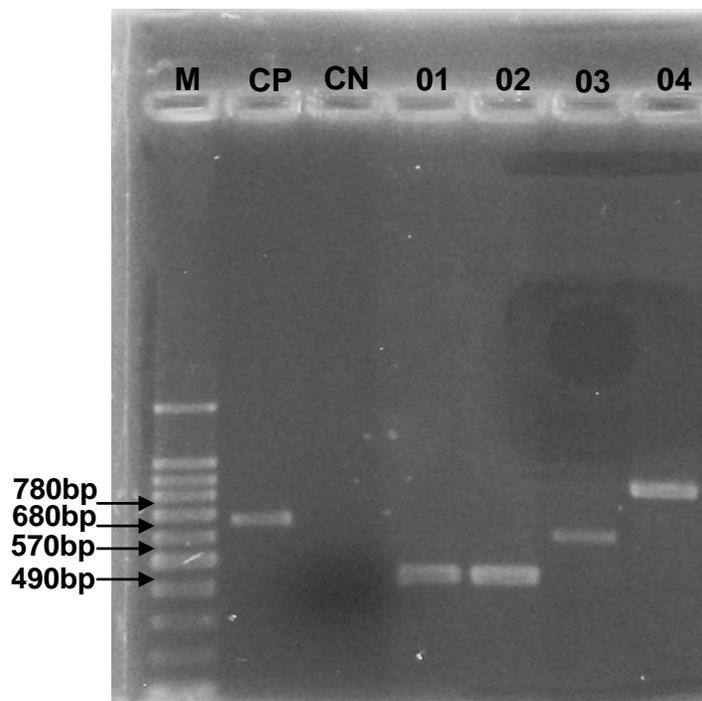


Figura 04 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos resultados da amplificação dos genes da coagulase. M Marcador DNA *ladder* 100bp; CP (Controle Positivo) com 680bp; CN (Controle Negativo); 01 Amostra: (Sta001) com 490bp; 02 Amostra: (Sta032) com 490bp; 03 Amostra: (Sta072) com 570bp; 04 Amostra: (Sta028) com 780bp; bp (Pares de base)

DISCUSSÃO

Os índices de mastites subclínicas e clínicas constituem parâmetros importantes para se monitorar a sanidade da glândula mamária dos animais e a eficiência das medidas de controle adotadas para a doença na propriedade (COSTA, 2008). Os resultados obtidos no seguinte trabalho no que se refere à identificação dos *Staphylococcus aureus* frente às mastites subclínicas demonstra que em todos os dez núcleos rurais onde foram realizadas as coletadas ou que enviaram amostras diretamente ao laboratório de MicroMedVet apresentaram uma ou mais propriedades com leite contaminado com *S. aureus*.

A identificação bioquímica das cepas de *S. aureus* obtidos no presente trabalho apresentou dados semelhantes aos já publicados de Quinn et al. (1994), Oliveira (2000), Koneman et al. (2001). Behme et al. (1996) e Quinn et al. (1994) testando e identificando bioquimicamente cepas de *S. aureus* afirmaram que todas as suas cepas foram positivas para a fermentação dos carboidratos (glicose, maltose e Manitol), coagulase, O/F glicose, catalase e negativas para a oxidase.

De acordo com Quinn et al. (1994) todas as amostras de *S. aureus* quando realizada a observação macroscópica de suas colônias, verificando-se a presença de hemólise, tamanho médio (1 a 2 mm), lisas, brilhantes, com bordas contínuas e coloração amarelada ou esbranquiçada, sendo observados as mesmas características no seguinte trabalho. A produção de hemólise completa alfa-hemolisina foi observada em 82,98% das amostras testadas, entretanto autores como Trabulsi e Alterthum (2005), Quinn et al. (1994) relatam que todas as cepas de *S. aureus* apresentam uma alfa-hemólise, já no presente trabalho 17,02% das amostras apresentou uma hemólise incompleta causada pela beta-hemolisina.

Os testes de fermentação do Ágar sal manitol (95,75%) positivo, redução de nitrato (93,6%) positivo, gelatinase (76,6%) positivo, Voges-Proskauer (91,5%) positivo, são dados semelhantes ao proposto por Holt et al. (1994).

No teste do perfil de resistência aos antibióticos verificou-se um baixo índice de bactérias com multirresistência as bases testadas. As cepas testadas foram sensíveis ao menos a um antibiótico, o que apresenta semelhanças com os trabalhos de Zanette et al. (2010), Andrade et al. (2000), Cardoso et al. (2000).

A resistência encontrada para penicilina no presente estudo foi similar à reportada por Nader Filho et al. (1984), Cardoso et al. (2002), Andrade et al. (2000) em Minas Gerais que obtiveram um índice de resistência próximo a 70%. Em nosso trabalho o índice de resistência foi de 71,2%. De acordo com Cardoso (2002) a ampicilina foi descrita com um índice de resistência superior a 50%, onde também ficou de acordo aos dados obtidos nesse trabalho com 52,9% de resistência.

Essa resistência encontrada para esses dois antibióticos justifica-se em razão do uso indiscriminado e inadequado (subdosagens) na medicina veterinária, pois são frequentemente utilizados para controle de mastite (ANDRADE et al., 2000). A norfloxacin e bacitracina nesse estudo apresentaram uma porcentagem de sensibilidade de 76,9% e 65,5% respectivamente. Dados próximos aos encontrados por Ferreira et al. (2010) e Costa et al. (2008).

Neste estudo verificou-se uma discrepância muito elevada nos estudos de Costa, (2008), acima de 80% e Cardoso et al. (2000) 98,4% quanto a sensibilidade da enrofloxacin. Pois a totalidade de cepas resistente a enrofloxacin nesse estudo foi de 39,9%, isso demonstra que é necessário um aprofundamento no estudo dessas resistências no Distrito Federal e Entorno.

A sensibilidade encontrada as cefalosporinas, aminoglicosídeos e tetraciclina no presente estudo foi similar à reportada por Zanette et al. (2010), Zafalon et al. (2008b) onde os valores ultrapassam os 70% de sensibilidade. O conhecimento de padrões de sensibilidade antimicrobiana a essas bases é fundamental para o desenvolvimento de métodos preventivos que sejam efetivos, assim como de elaboração de estratégias de tratamento quando forem necessárias.

A ocorrência de sensibilidade encontrada nesse presente estudo para a oxacilina foi de 74,1%, foi muito divergente aos encontrados por Martins (2011), Silveira-Filho (2005). Martins encontrou um percentual de sensibilidade para apenas 33,3% no presente estudo que foi realizado no Goiás e Distrito Federal, enquanto Silveira-Filho verificou um índice de sensibilidade inferior a 50% para a oxacilina e lincomicina. Sendo que a lincomicina no presente estudo teve um índice de resistência de apenas 22,8%, sendo novamente divergente aos encontrados por Silveira-Filho (2005) e Ferreira et al. (2010) 81,76% de resistência.

No presente estudo quatro diferentes tamanhos de bandas do produto da PCR para o gene da coagulase foram obtidas a partir da heterogeneidade de uma região contendo 81pb de repetições da extremidade final 3' do gene CoA. Foram elas: 490bp (02/75); 570bp (25/75); 680bp (31/75); 780bp (17/75). Hookey et al. (1998), Salasia et al. (2004), Kalorey et al. (2007), Reinoso et al. (2008) obtiveram também resultados semelhantes quanto ao tamanho dos pares de bases.

Os diferentes tipos de genes coagulase devem ocorrer por razão do polimorfismo entre os isolados de *S. aureus*, pois o tamanho da banda do gene da coagulase CoA se divergem um pouco entre os autores, Saei et al. (2009) encontrou de 490pb à 850pb e Salem-Bekhit et al. (2010) encontrou de 627pb à 910pb. No presente trabalho as bandas com peso de 490 pb, 570 pb, 680pb e 780pb, também foi descrita na pesquisa de Saei et al. (2009).

Os diferentes tamanhos moleculares encontradas nos produtos amplificados provavelmente ocorrem devido a mutações na extremidade 3' do gene CoA onde nucleotídeos podem ser inseridos ou excluídos no gene e como consequência alterar o tamanho do mesmo ou ainda provavelmente propriedades antigênicas da enzima coagulase (HOOKEY et al., 1998).

Essa região do gene CoA pode ter um papel importante na variação antigênica da coagulase e pode ser um mecanismo de escape do efeito inibitório dos agentes anticoagulase. Os anticorpos e outros fatores não-anticorpo podem neutralizar a atividade da coagulase e consequentemente aumentar a resistência contra infecções de *S. aureus* (SAEI et al., 2009).

O par de iniciadores utilizados neste estudo FA₁ e RA₂, a partir do gene AroA *S. aureus*, de espécie-específico com fragmento de 1153pb obtiveram a amplificação por PCR em todas as amostras testadas (75/75), resultado semelhante ao encontrado por Saei et al. (2009) em 58 amostras de leite, Marcos et al. (1999) em 38 amostras de leite.

Esses resultados demonstram que a amplificação por PCR do gene AroA poderia ser uma ferramenta útil para a rápida identificação de *S. aureus* a partir de células bacterianas. Marcos et al. (1999) conseguiu resultados favoráveis na amplificação do gene AroA a partir de materiais biológicos, tais como o leite.

APROVAÇÃO PELO COMITE DE ÉTICA

Esse trabalho foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, tendo sido aprovado sob o número de UnBDOC n.º 65701/2011.

AGRADECIMENTO

Agradecimento aos Médicos Veterinários que sempre estiveram presentes comigo nas coletas a campo. Marcos, Flávia, Tiago e Pedro da EMATER-DF; Rafael Magnum, Rafael Lourinho, Anne Daianne, Manuela Rodrigues, Vinicius Drummond do laboratório de MicroMedVet.

CONCLUSÕES

No presente estudo foram identificadas e genotipificadas cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de mastite subclínica bovina no Distrito Federal e Entorno. Foi observada através da técnica de PCR que existem diferentes tipos de genes coagulase entre as granjas leiteiras e isso pode ter um papel importante para o *S. aureus* para aumentar sua resistência frente aos antimicrobianos. Os genes de espécie-específico mostrou ser uma alternativa rápida e segura para identificar o *S. aureus*.

Existem poucos dados que abordem o percentual de cepas susceptíveis aos antibióticos testados, sendo que a penicilina e ampicilina com 71,2% e 52,9% respectivamente de suas cepas obtiveram um índice muito elevado de resistência. Outro ponto que ainda necessita de mais estudos acerca do tema é sobre o perfil de resistência da enrofloxacina que alcançou 39,9% neste estudo e com isso obteve-se uma discrepância muito elevada quando comparada com estudos de outros autores que indicam até 98,4% de sensibilidade.

Os resultados obtidos demonstram a alta incidência de mastite subclínica por *S. aureus*, pois em todas as propriedades pelo menos um animal tinha o microrganismo no leite. A porcentagem encontrada assemelha-se as já relatadas em trabalhos nacionais e internacionais. O risco de transmissão por esta bactéria, conjuntamente com a frequência de resistência antimicrobiana, como observada neste estudo, também deve ser levado em conta, pois podem acarretar em sérios problemas para a saúde pública.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. A.; FILHO, F.C.D.; MESQUITA, A.J. et al. **Sensibilidade in vitro de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica.** Ciência Animal Brasileira, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 53-57, 2000.

BEHME, R.J.; SHUTTLEWORTH, R.; MCNABB, A.; COLBY, W.D. **Identification of staphylococci with a selfeducating system using fatty acid analysis and biochemical tests.** Journal of Clinical Microbiology, 34, 3075-3084, 1996.

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. Vol. 54: 309-319, 1997.

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

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

CARDOSO, H.F.T.; COSTA, G.M.; SILVA, N. **Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais.** Revista Brasileira de Medicina Veterinária, v. 22, n. 5, p. 199-206, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Disponível em <www.clsi.org>. Acesso em: 10/12/2010, 23:48.

CODEPLAN Anuário Estatístico do Distrito Federal – 2007. Disponível em: <<http://www.codeplan.df.gov.br/sites/200/216/00000274.pdf>>. Acesso em: 25/07/2012, 13:52.

COSTA, G.M. **Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do estado de Minas Gerais** / Geraldo Márcio da Costa. – 2008. 123 p.: il. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

DONATELE, D.M.; MOTTA, O.V.; FOLLY, M.M. **Perfil antimicrobiano de linhagens de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva na mastite subclínica de vacas leiteiras nas regiões norte e noroeste do Estado do Rio de Janeiro.** *Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira*, v. 5, n. 2, p. 3-6, 2002.

FERREIRA, J.L.; PIGATTO, C.P.; LINS, J.L.F.H.A. et al. **Bactérias causadoras de mastite subclínica em rebanhos leiteiros no município de Teresina, Piauí.** *Revista científica eletrônica de medicina veterinária ano viii – número 14 – janeiro de 2010 – periódicos semestral*

GOOGLE EARTH-MAPAS. Disponível em: <<http://maps.google.com.br>> acesso em: 26/07/2012, 09:25.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. et al. **Bergeys' manual of determinative bacteriology.** 9.ed. Baltimore, USA: Williams e Wilkins, 1994. 787p.

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

KALOREY, D.R.; SHANMUGAM, Y.; KURKURE, N.V.; CHOUSALKAR, K.K.; BARBUDDHE, S.B. **PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases.** *J. Vet. Sci.* 8, 151–154, 2007. Kapur, V., Sicho, W.M., Greer, R.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e atlas colorido.** 5. ed., Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465p.

LADEIRA, S.R.L. Mastite bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças dos ruminantes e equinos.** Santa Maria: Palloti, 2007. v. 1, p. 359-371.

LAFFRANCHI, A.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C. et al. **Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação.** *Ciência Rural*, v. 31, n. 6, p. 1027-1032, 2001.

LUZ, I.S.; **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco.** P.126 – Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, 2008

MARCOS, J.Y., SORIANO, A.C., SALAZAR, M.S., MORAL, C.H., RAMOS, S.S., SMELTZER, M.S., CARRASCO, G.N. **Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *aroA* gene.** *J. Clin. Microbiol.* 37, 570–574, 1999.

MARTINS, J.L.; NICOLAU, E.S.; JARDIM, E.A.G.V. et al. **Estudo da etiologia e resistência a antimicrobianos das principais bactérias isoladas de mastite bovina de propriedades rurais de Goiás e Distrito Federal – Resultados Preliminares.** 2011. Disponível em < <http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/mestrado/trabalhos-mestrado/mestrado-juliana-dias.pdf> > Acesso em: 18/06/2012, 19:05.

NADER FILHO, A.N.; ITURRINO, R.P.S.; ROSSI-JUNIOR, O.D. **Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite gordura 3,2%.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 36, n. 5, p. 549-58, 1984.

OLIVEIRA, S. J. **Microbiologia Veterinária: Guia bacteriológico prático.** 2. ed. Canoas: Ulbra, 2000. 237p.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. **Clinical Veterinary Microbiology.** London: Wolfe-Mosby, 1994. 648p.

QUINN, P.J.; MARCKEY, B.K.; CARTER, M.E. ; DONNELLY, W.J.; LEONARD F.C.; trad. Lúcia Helena Niederauer Weiss e Rita Denise Niederauer Weiss. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Ed. Artmed. p.453-460, 2005.

REINOSO, E.B., EL-SAYED, A., LAMMLER, C., BOGNI, C., ZSCHOCK, M. **Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine**

subclinical mastitis and food samples in Argentina. Microbiol. Res. 163, 314–322, 2008

SAEI H.D.; AHMADI M.; MARIAN K.; BATAVANI R.A. **Molecular typing of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran.** Vet. Microbiol. 137: 202-206, 2009.

SALASIA, S.I., KHUSNAN, Z., LAMMLER, C., ZSCHOCK, M. **Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany.** J. Vet. Sci. 5, 103–109, 2004

SALEM-BEKHIT, M.M.; MUHARRAM, M.M.; IBRAHIM, M.A. et al. **Molecular Detection of Genes Encoding Virulence Determinants in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Mastitis.** Journal of Applied Sciences Research, 6(2): 121-128, 2010, INSInet Publication

SILVEIRA-FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; FREITAS, M.L.F. et al. **Molecular epidemiologic study of *Staphylococcus aureus* associated to bovine mastitis from Pernambuco state, Brazil.** Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Produção Leiteira, v. 8, n. 1, p. 12-17, 2005.

SMITH, B. **Tratado de medicina interna de grandes animais.** Volume 2., São Paulo, Manole, 1994. p.1045-1056.

TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 679p.

ZAFALON, L.F.; POZZI, C.R.; CAMPOS, F.P. et al. **Boas práticas de ordenha.** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008a. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/876545/1/documentos78.pdf>>. Acesso em: 26 jul. 2012, 14:16.

ZAFALON, L.F.; LANGONI, H.; BENVENUTTO, F. et al. **Aspectos epidemiológicos da mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*.** Vet. Zootec. V.15, n.1, abr., p. 56-65, 2008b.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E.M. **Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com**

suspeita de mastite. Unoesc & Ciência – ACBS, Joaçaba, v. 1, n. 1, p. 65-70,
jan./jun. 2010

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os casos de mastites subclínicas são difíceis de detectar, por não apresentarem sinais clínicos evidente na glândula mamária ou alterações visíveis ao leite. Muitos criadores não estão habituados a realizar o teste de Tamis e CMT que poderiam ser um indicador rápido, barato e acessível a campo para um tratamento mais precoce das mastites.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a alta taxa de mastite subclínica nos rebanhos estudados, isso traz um reflexo direto na produtividade do rebanho e na qualidade do leite produzido, evidenciando a necessidade de maiores esforços por parte dos proprietários, cooperativas, laticínios, órgãos de fiscalização e mesmo instituições de pesquisas. Isso ajudaria os produtores a controlar de forma eficiente a mastite, minimizando os prejuízos ocasionados pela mesma em toda a cadeia produtiva de leite. O leite e seus derivados são um dos alimentos mais completos da natureza e por isso seu consumo é abundante principalmente por crianças e idosos. Consequentemente os casos de intoxicações alimentares por *S. aureus* pode ocasionar sério risco a saúde pública, devido principalmente ao comércio de produtos clandestinos.

Os percentuais de resistência aos antimicrobianos encontrados nesse estudo demonstram uma tendência mundial de seleção de bactérias multirresistentes, o que muitas vezes se deve ao fato da utilização indiscriminada de antibióticos por produtores ou veterinários que utilizam estes fármacos como tratamento, mas sem a realização de exames laboratoriais para identificar o real agente causador e a quais bases antimicrobianas possuem sensibilidade.

Embora o presente estudo apresente isolados de *S. aureus* com diferentes tipos de genes da coagulase e um alto índice de resistência antimicrobiana, são necessários estudos mais aprofundados acerca deste tema, com o intuito de avaliar melhor a resistência da enrofloxacin e para uma melhor compreensão dos tipos de genes da coagulase circulantes no presente trabalho, utilizando a técnica de Polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), pois com isso poderia se obter dados específicos sobre as variantes do gene da coagulase.