

**DETECÇÃO DE *Staphylococcus spp* E SUAS  
ENTEROTOXINAS EM LEITE  
PROVENIENTE DE BOVINOS LEITEIROS  
COM MASTITE**

**KELLY CRISTINA DA SILVA BRABES**

1999



47674  
33493MFN.

**KELLY CRISTINA DA SILVA BRABES**

**DETECCÃO DE *Staphylococcus spp* E SUAS ENTEROTOXINAS  
EM LEITE PROVENIENTE DE BOVINOS LEITEIROS COM  
MASTITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia dos Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora  
Dr<sup>a</sup> Elizabeth Oliveira da Costa

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1999

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

**Brabes, Kelly Cristina da Silva**

Detecção de *Staphylococcus spp* e suas enterotoxinas em leite provenientes de Bovinos leiteiros com mastite / Kelly Cristina da Silva Brabes. – Lavras : UFLA, 1999.

77 p. :il.

Orientadora: Elizabeth Oliveira da Costa.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Leite. 2. *Staphylococcus*. 3. Enterotoxina. 4. Mastite. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-574.163

-637.1

-641.6714

**KELLY CRISTINA DA SILVA BRABES** -

**DETECCÃO DE *Staphylococcus spp* E SUAS ENTEROTOXINAS  
EM LEITE PROVENIENTE DE BOVINOS LEITEIROS COM  
MASTITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia dos Alimentos, para obtenção do título de "Mestre".

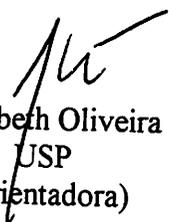
APROVADA em 25 de junho de 1999

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Pinheiro de Carvalho

UFLA

Dr. Maria Lúcia Pereira

FUNED

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elizabeth Oliveira da Costa  
USP  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1999

**DEDICO a Deus**

**OFEREÇO**  
**a minha família**

*"Não é o desafio com que nos deparamos  
que determina quem somos e o que estamos nos tornando,  
mas a maneira com que respondemos ao desafio.  
Somos combatentes, idealistas,  
mas plenamente conscientes.  
Porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre  
as coisas: só nos obriga a sermos conscientes.  
Problemas para vencer, liberdade para provar.  
E, enquanto acreditarmos no nosso sonho,  
nada é por acaso."  
(Henfil)*

## Agradecimentos

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elizabeth Oliveira da Costa pela oportunidade, incentivo colaboração.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho, seu apoio, ensinamentos, paciência e ajuda, fizeram a diferença.

À Dr<sup>a</sup> Maria Lúcia Pereira pela ajuda e colaborações essenciais para realização final deste trabalho, sua pronta simpatia foi muito importante.

À CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

Aos pesquisadores do NAP-GAMA (Núcleo de Apoio e Pesquisa da Glândula Mamária - USP - Pirassununga - SP), pela acolhida, amizade e auxílio durante a coleta. Felício e Eliana, Jô, Flávia, Raquel e Cleusa, obrigada pela força.

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA (Universidade Federal de Lavras) pela longa convivência.

Aos pesquisadores da FUNED, Meninas, vocês são ótimas! Obrigada pela ajuda.

Aos amigos da Microbiologia do Departamento de Biologia da UFLA, obrigada pelo começo de uma nova convivência.

Aos funcionários Eliane, Cipriano (Pianinho), Andréia, Gicelda, Dona Ivone do DCA/UFLA, agradeço ao bom papo e por me ouvirem nas horas difíceis.

Aos amigos da Turma de Zootecnia de Jan/97. Vocês foram o começo.

Aos Professores Juan DZO/UFLA e Francisco DMV/UFLA.

Aos Professores Luís Ronaldo, Vânia Dea, Verônica, Maria Cristina, Luís Carlos, Eduardo, que de alguma forma colaboraram na minha formação.

Aos amigos e funcionários da APG, Neila, Daisy e Daniela.

À Flávia (Fravinha), que organizou minhas idéias, anotou minha confusão, me ouviu falar, chorar, etc., meu total agradecimento.

Aos amigos Luís Roberto, Maurício, que de alguma forma deram "sangue" a esta pesquisa.

Aos amigos Ivana e Beto, meus irmãos mais velhos; Alexandre e Cristiane, Raquel, Rodrigo, Lucimeire, Elen e Alvinho, pela amizade e convivência.

Às amigas Deby e Mari, Margô, Cris e Eliz, por fazerem parte do meu dia a dia, por serem minhas meio irmãs (e sobrinha) aqui nesta cidade.

Aos amigos Daniela e Murilo, Bruno e Marco, presentes até na distância.

Ao Rafael Henrique (Fá), por ter aparecido, por ter permanecido, por ter incentivado, por ter compreendido e por continuar sendo só você.

Ao Maurício, Maria Angela, Regina, Renata e Ana Maria, por terem feito parte desta nova etapa de minha vida.

Aos meus pais Armando e Maria de Lourdes por acreditarem em mim. O amor e o carinho de vocês é muito importante. Amo muito vocês.

Aos meus avós, Cândido e Anésia (*in memoriam*), saudades.

Aos meus irmãos e sobrinhos. A tia Kelly ama vocês.

E a todos aqueles que cruzaram meu caminho.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 Introdução Geral.....	01
2 Referencial Teórico.....	03
2.1 Definição e caracterização da doença.....	03
2.2 Métodos de detecção da mastite.....	05
2.3 Agentes etiológicos da mastite.....	07
2.4 Caracterização das enterotoxinas estafilocócicas.....	09
2.5 Métodos de detecção de enterotoxinas.....	10
2.6 Estafilococos e intoxicação alimentar.....	13
2.7 Métodos de controle da mastite.....	15
2.8 Tratamentos com antibióticos .....	16
3 Referências Bibliográficas.....	18
CAPÍTULO 1: Identificação e classificação de estafilococos provenientes de leite de bovinos com mastite.....	26
Resumo.....	26
Abstract.....	27
1 Introdução.....	28
2 Material e Métodos.....	31
2.1 Material.....	31
2.2 Avaliação das propriedades e obtenção dos isolados.....	31
2.3 Purificação dos isolados.....	33
2.4 Identificação.....	33
2.4.1 Caracterização inicial dos isolados.....	33
2.4.2 Kit's de identificação.....	36

<b>3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Identificação bioquímica.....</b>	<b>37</b>
<b>4 Conclusões.....</b>	<b>45</b>
<b>5 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO 2: Produção e classificação de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por cepas provenientes de leite de bovinos leiteiros com mastite.....</b>	<b>53</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>53</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>54</b>
<b>1 Introdução.....</b>	<b>55</b>
<b>2 Material e Métodos.....</b>	<b>57</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>57</b>
<b>2.1.1 Estafilococos provenientes de vacas mastíticas.....</b>	<b>57</b>
<b>2.2 Procedimento analítico.....</b>	<b>58</b>
<b>2.2.2 Produção de enterotoxinas estafilocócicas Método da "membrana sobre ágar".....</b>	<b>58</b>
<b>2.3 Métodos para detecção de "SE".....</b>	<b>60</b>
<b>2.3.1 Método de aglutinação passiva reversa em látex ("RPLA" ou "SET-RPLA".....</b>	<b>60</b>
<b>2.3.2 ELISA (RIDASCREEN).....</b>	<b>61</b>
<b>3 Resultados e Discussão.....</b>	<b>63</b>
<b>3.1 SET-RPLA.....</b>	<b>65</b>
<b>3.2 ELISA (RIDASCREEN).....</b>	<b>67</b>
<b>4 Conclusões.....</b>	<b>70</b>
<b>5 Referências Bibliográficas.....</b>	<b>71</b>

## RESUMO

BRABES, K. C. S. Detecção de *Staphylococcus spp* e suas enterotoxinas em leite proveniente de bovinos leiteiros com mastite. Lavras: UFLA, 1999, 77p. (Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos).'

Leite e produtos lácteos contaminados têm sido associados com toxinfecções alimentares. As doenças de origem alimentar transmissíveis ao homem pelo leite e produtos lácteos podem estar relacionadas a doenças que afetam o animal como a mastite bovina. Dentre os agentes etiológicos, as bactérias têm maior prevalência, destacando-se muitas vezes *Staphylococcus spp*, sendo *S. aureus* a espécie mais encontrada. Uma característica importante destes microrganismos é a sua capacidade de síntese de enterotoxinas representando um problema à saúde pública. Visando confirmar a presença destes microrganismos como um dos principais agentes etiológicos da mastite bovina e como possível microrganismo toxigênico, foram estudadas cepas isoladas de amostras de leite de animais com mastite clínica e subclínica. Estes microrganismos foram isolados no laboratório de Microbiologia do NAP GAMA - USP (Núcleo de Apoio e Pesquisa em Glândula Mamária - Pirassununga - SP) e as amostras provenientes de leite coletadas em cinco propriedades de São Paulo e Minas Gerais. Todas as cepas foram purificadas para posterior identificação no Laboratório de Microbiologia de Alimentos no DCA (Departamento de Ciência dos Alimentos) da UFLA (Universidade Federal de Lavras, MG). As cepas foram identificadas pelo Sistema API - STAPH para identificação final. Das 128 cepas identificadas, as espécies mais encontradas foram *S. aureus* 51 (39%), *S. chromogenes* 15 (11%), *S. sciuri* 12 (9%), *S. simulans* 9 (7%), *S. hyicus* 8 (6%), *S. xylosum* 6 (5%), *S. warneri* 3 (2%), *S. epidermidis* 1 (0,78%), *S. hominis* 1 (0,78%), *S. caprae* 1 (0,78%), *S. saprophyticus* 1 (0,78%), *Micrococcus sedentarius* 1 (0,78%), *Staphylococcus spp* 19 (18%). Das 87 cepas testadas quanto à produção de enterotoxinas, apenas 16 (18%) apresentaram resultado positivo, sendo 10 cepas (62,5%) foram identificadas como *S. aureus*, cinco cepas (31,25%) como *S. sciuri*, e uma como (6,25%) *S. chromogenes*. Dentre as 26 toxinas produzidas, 10 (38%) identificadas como "SEA", 7 (27%) como "SEB", cinco (20%) como "SEC", duas (7,5%) como "SED", e duas (7,5%) como "SEE".

---

Comitê Orientador: Dr<sup>a</sup> Elizabeth Oliveira da Costa - USP (Orientadora)  
Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Coorientadora)

## ABSTRACT

BRABES, K. C. S. **Identification and classification of toxigenic Staphylococci in mastitis cow's milk.** LAVRAS: UFLA, 77p. Dissertacion - Master in Food Science)

Milk and dairy products contaminated have been associated with foodborne pathogens. The food origin diseases transmissible to man through milk and dairy products may be related to diseases that affect the animal such as bovine mastitis. Among the etiological agents, the most incident bacteria, *Staphylococcus spp* standing out many times, being *S. aureus* the most found species. An important feature of these microorganisms is their capacity of synthesizing enterotoxins representing a problem to public health. By aiming to confirm the presence of the microorganisms as one of the chief etiological agents of bovine mastitis and as a possible toxigenic organism, strains isolated from samples of milk from animals with clinic and subclinic mastitis were. These microorganisms were isolated in the Microbiology Laboratory of the NAP-GAMA - USP (Núcleo de Apoio e Pesquisa à Glândula Mamária - Pirassununga - SP) and samples coming from milk collected on five farms in São Paulo and Minas Gerais. Every strain were purified for further identification in the Food Microbiology Laboratory at the DCA (Departamento de Ciência dos Alimentos) UFLA (Universidade Federal de Lavras - MG). The strains were identified by the API STAPH Systems for final identification. Out of the 128 strains identified, the most found species were *S. aureus* 51 (39%), *S. chromogenes* 15 (11%), *S. sciuri* 12 (9%), *S. simulans* 9 (7%), *S. hyicus* 8 (6%), *S. xylosum* 6 (5%), *S. warneri* 3 (2%), *S. epidermidis* 1 (0.78%), *S. hominis* 1 (0.78%), *S. caprae* 1 (0.78%), *S. saprophyticus* 1 (0.78%), *Micrococcus sedentarius* 1 (0.78%), *Staphylococcus spp* 19 (18%). Out of the 87 strains tested as to production of enterotoxin, only 16 (18%) presented positive result, 10 strains being identified as *S. aureus*, 5 strains (31.25%) as *S. sciuri* and 1 (6.25%) as *S. chromogenes*. Out of the 26 toxins produced, 10 (38%) were identified as "SEA", 7 (27%) as "SEB", 5 (20%) as "SEC", 2 (7.5%) as "SED" and 2 (7.5%) "SEE".

---

Guidance Committee: Dr<sup>a</sup> Elizabeth Oliveira da Costa  
Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção leiteira caracteriza-se, ainda hoje, por ser uma atividade de baixa produtividade e rentabilidade devido a vários fatores que incluem aspectos genéticos, nutricionais e sanidade dos animais. Sob o este enfoque, pode-se destacar doenças provocadas por microrganismos como a mastite bovina, que atinge em especial a glândula mamária.

Os prejuízos causados pela mastite são bastante expressivos, pois além da queda na produção, o leite produzido nestas condições apresenta alterações físicas, químicas, microbiológicas e, ainda, modificações patológicas do tecido glandular do animal.

A mastite bovina é caracterizada por um processo inflamatório da glândula mamária devido à invasão do microrganismo e posterior instalação no tecido secretor de leite.

Apesar de sua grande incidência, a mastite não tem merecido a devida atenção de alguns produtores de leite. Isto se deve, talvez, ao fato desta infecção se apresentar sob duas formas, assim caracterizadas quanto à intensidade, isto é, a mastite clínica e mastite sub clínica.

No Brasil, a maioria dos casos de mastite que afetam quartos mamários é devido à forma subclínica. Os níveis de infecção do rebanho, os diferentes agentes etiológicos e a falta de informação do produtor induzem a altas despesas com tratamento, mão-de-obra e perda genética, resultando num menor valor comercial do animal.

Diversos microrganismos podem ser considerados agentes etiológicos da mastite, tais como bactérias, protozoários, vírus, fungos filamentosos, leveduras e algas, além de fatores anatômicos, fisiológicos, ambientais e de manejo, o que dificulta em muito seu tratamento. Dentre os agentes etiológicos, as bactérias

têm maior incidência, representando 80 a 90% dos casos. Os microrganismos mais comumente relatados são *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium spp*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Nocardia spp*, *Protoheca spp*, entre outros.

*Staphylococcus aureus* apresenta-se como aquele de maior importância por estar presente na proporção de 50% das infecções e por estar associado ao aparecimento da mastite subclínica ou crônica, ou até mesmo na forma superaguda, devido a sua capacidade de penetração e instalação profunda nos tecidos da glândula mamária, o que dificulta, desta maneira, a ação dos antibióticos. Outro aspecto a se destacar é a facilidade de encontrar este microrganismo na natureza, sendo que, em muitos, casos, o homem pode se apresentar como portador assintomático, podendo ser considerado como um importante agente disseminador.

Freqüentemente os alimentos de origem animal, especialmente o leite e os produtos derivados, estão sendo associados a surtos de toxinfecção alimentar, representando um grande problema para a saúde pública. O gênero *Staphylococcus spp*, por representar um expressivo agente etiológico da mastite bovina, e também um importante agente causador de toxinfecção alimentar devido a sua capacidade de produção de enterotoxinas, vem despertando um maior interesse no que diz respeito a doenças vinculadas a alimentos.

Devido à importância desta doença no Brasil e no mundo, este trabalho teve como objetivo identificar e classificar as espécies de *Staphylococcus spp* presentes em leite mastítico, assim como avaliar a capacidade de produção de enterotoxinas das cepas isoladas.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Com o crescimento do número de indústrias lácteas no Brasil e conseqüente competitividade entre seus produtos no mercado, torna-se importante a busca da qualidade dos alimentos. O leite, produto da secreção da glândula mamária, e alguns de seus derivados, considerados produtos de grande importância devido ao seu alto valor nutritivo, são conhecidos desde a pré-história, quando o homem aprendeu a dominar os animais.

A mastite bovina vem sendo considerada a enfermidade mais importante da pecuária leiteira, sendo discutida, desde o século passado, devido aos prejuízos por ela acarretados (Jordão, 1967).

### 2.1 Definição e caracterização da doença

Segundo a *International Dairy Federation* (1987), a mastite é definida como sendo uma reação inflamatória da glândula mamária que, além de mudanças físico-químicas e microbiológicas, é caracterizada por um aumento do número de células somáticas no leite e também por mudanças no tecido mamário. A doença se desenvolve quando um microrganismo passa através do canal do teto e afeta o tecido secretor de leite danificando-o, podendo igualmente se instalar no início do ducto. O dano resulta no movimento de leucócitos para dentro do tecido mamário e na redução da produção de leite (Nicherson, 1986).

Costa (1991) cita a mastite bovina como sendo a doença que causa os maiores prejuízos mundiais na pecuária leiteira. Nos Estados Unidos, dois

bilhões de dólares/ano são perdidos com esta enfermidade, sendo que, em vários levantamentos, foram detectados 40 a 50% das vacas de rebanhos leiteiros com pelo menos um quarto mamário infectado.

Segundo Nikerson (1986), a doença pode se manifestar de duas formas distintas: a mastite clínica e a subclínica. A primeira caracteriza-se por ser facilmente reconhecida devido a alterações visíveis tanto no leite como no úbere do animal, tais como grumos e pus formados pelos leucócitos que passaram para o leite; pela presença de leite aquoso ou pela inflamação visível do úbere, que se apresenta endurecido, quente e dolorido ao tato. Já a forma subclínica muitas vezes não é percebida em se considerando que tanto o leite como o animal apresentam-se aparentemente normais.

Auldist e Hubble (1998) e Machado et al (1998) concluíram, em um estudo sobre mastite, que tanto a forma clínica como a subclínica afetam a produção e a composição do leite e de seus derivados, além de causarem problemas de saúde pública através do consumo de leite e derivados contaminados. A mastite subclínica se torna, assim, a forma mais importante pois ocorre com maior frequência. Normalmente antecede a forma clínica, sendo necessária uma atenção maior neste período da doença; geralmente de longa duração; difícil e cara de ser detectada no rebanho; o que reduz consideravelmente a produção, afetando negativamente a qualidade do leite. Segundo os mesmos autores, através de revisão de vários trabalhos científicos, foram observadas modificações em vários componentes do leite, como diminuição de lactose, caseína total,  $\beta$ -caseína,  $\alpha_2$ -caseína,  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina e potássio, além do aumento de ácidos graxos livres,  $\gamma$ -caseína, proteínas do soro, soroalbumina, IgG, lactoferrina, transferrina, plasmína, Na e Cl, representando um problema de rendimento na fabricação de produtos derivados do leite.

De acordo com Costa et al (1994b), a mastite subclínica, além de reduzir a quantidade de elementos nobres do leite, como caseína, lactose, cálcio e gordura, aumenta o conteúdo de substâncias indesejáveis como lipase, imunoglobulinas, sódio e cloro, representando perdas na qualidade do leite e, conseqüentemente, na indústria de derivados lácteos.

Considerando a redução da produção leiteira, o prejuízo causado pela mastite subclínica, segundo Costa et al (1994c), é de algo estimado em 711.000 litros/ano em propriedades produtoras de leite B e; uma estimativa para a produção brasileira de leite tipo A, B e C seria em torno de 14 bilhões de litros de leite por ano.

## **2.2 Métodos de detecção da mastite**

Existem alguns métodos para a detecção da mastite que podem ser feitos no campo ou em laboratórios. Dentre eles destacam-se o “tamis” ou teste da caneca de fundo preto; o exame visual das características do úbere; métodos químicos indiretos (CMT); exame microbiológico do leite e contagem de células somáticas.

O teste da caneca telada, caneca de fundo preto ou "tamis" é utilizado ao pé do animal, antes de se iniciar a ordenha, facilitando a observação de grumos, pus, filamentos e soro, quando desprezados os primeiros jatos de leite, e, portanto, tem como objetivo detectar a mastite clínica, ou seja, o estado mais avançado da doença (Radostits, 1994).

Outro método de detecção da mastite foi idealizado por Schalm & Noorlander (1957), que desenvolveram o CMT (*California Mastitis Test*). Este teste baseia-se na estimativa do conteúdo de células somáticas no leite e é

interpretado subjetivamente estabelecendo *scores*, que, na maioria dos casos, variam de 1 a 5. Consiste num teste um pouco mais sofisticado, detectando a mastite subclínica em leite de vacas aparentemente normais. Apresenta resultado instantâneo, podendo ser realizado antes da ordenha, permitindo classificar o leite em normal ou anormal. Este método baseia-se na reação entre o reagente CMT (alquil-lauril sulfonato de sódio) e o material genético das células somáticas presentes no leite, formando um gel cuja concentração é proporcional ao número de células somáticas presentes no leite.

A contagem de células somáticas (CCS) é outro método para a detecção da mastite e corresponde ao aumento do número de leucócitos presentes no leite, sendo a maioria relacionados a neutrófilos polimorfonucleares provocados pela invasão da glândula mamária por microrganismos. Essas células fazem parte do mecanismo natural de defesa do animal, migrando da corrente circulatória para a glândula mamária e, conseqüentemente, para o leite. Brito et al, em 1997, compararam a sensibilidade do método CMT (California Mastitis Test) com o método CCS (Contagem de Células Somáticas) e concluíram que ambos os métodos possuem vantagens e desvantagens, sendo o CMT o método mais indicado para ser utilizado pelo produtor, possibilitando identificar animais sob risco, selecionar amostras para exame microbiológico e, ainda, servir de base para a organização da linha de ordenha, ou seja, este método contribui para conhecer o estado sanitário do rebanho. Já o CCS representa uma tendência em países economicamente desenvolvidos, que pagam o leite em função de sua qualidade, mostrando o CMT como o teste mais preciso. Este método pode ser conduzido de duas maneiras: em grande escala, através do uso de um aparelho chamado de Contador Eletrônico de Células Somáticas (nome comercial, Fossomatic 90), ou em laboratório, através de visualização em placas de petri marcadas.

O exame microbiológico de amostras de leite permite detectar e identificar a presença do agente etiológico causador da infecção intra-mamária. Este método de detecção da mastite é indicado devido à resistência que os microrganismos apresentam frente a princípios antimicrobianos encontrados no mercado, resistência esta já relatada por Araújo & Andrioli (1996), Cruz et al (1997), Mallikarjunaswamy e Murthy (1997), entre outros.

Costa et al (1993) compararam o CMT e o exame microbiológico para detecção da mastite bovina e concluíram que 5047 exames de CMT positivos coincidiram com o exame microbiológico em 70,97%, apontando uma boa correlação entre os dois métodos comparados.

Com relação ao exame microbiológico, Costa et al, em 1997, compararam métodos de diagnóstico microbiológico para detecção da mastite e concluíram que maior sensibilidade foi registrada para a incubação a 37<sup>o</sup> C por 12 horas. Porém, observaram maior taxa de contaminação que em outros métodos. Em relação à conservação da amostra, o congelamento, por sua vez, registrou sensibilidade superior ao método usando o leite “in natura” e que também apresentou uma taxa de contaminação semelhante ao último. Para maior eficiência no isolamento, os autores recomendam que a melhor conduta seria a combinação destes procedimentos, permitindo assim estabelecer um diagnóstico mais seguro.

### **2.3 Agentes etiológicos da mastite**

A mastite bovina é uma doença multifatorial, de etiologia complexa e variada, encontrando-se disseminada em todas as regiões produtoras de leite. De acordo com estudos desenvolvidos por Brito et al (1997), existem 135 diferentes

espécies, subespécies e sorotipos de microrganismos, que incluem bactérias, leveduras, fungos, vírus, micoplasmas e algas, que podem ser isolados do leite de vacas com mastite. Entretanto, a maioria das infecções tem origem bacteriana e cerca de 90% de todos os casos são devidos a um reduzido número de espécies. Em geral, as bactérias estão em maior número, destacando-se o *Streptococcus spp* e *Staphylococcus spp* como os mais frequentes.

Nocard & Mollereau, em 1984, citam o isolamento do primeiro agente etiológico da mastite bovina, que mais tarde foi identificado como pertencente ao gênero *Streptococcus spp*. No Brasil, em 1931, *Streptococcus spp* foi o primeiro gênero isolado em amostras de leite mastítico por Reis e Swenson (Costa et al., 1994a).

Costa et al (1986), ao estudarem, através do exame microbiológico, a etiologia bacteriana da mastite bovina, observaram que em 2533 amostras de leite fizeram-se presentes os microrganismos *S. aureus* (49,23%), *Streptococcus spp* (27,08%), *Corynebacterium spp* (30,67%), Enterobacteriaceae (4,26%), *Pseudomonas spp* (1,06%) e 5,64% corresponderiam a *Actinobacillus spp*, *Moraxella spp*, *Brucella spp*, *Listeria spp*, *Aeromonas spp*, *Kurthia spp*, *Alcaligenes spp*, *Lactobacillus spp*, *Chromobacterium spp*, *Neisseria spp*, *Acinetobacter spp*, *Nocardia spp*, *Streptomyces spp*). Em um outro estudo também desenvolvido por Costa et al (1994a) a partir de 11.189 amostras, a porcentagem de *Staphylococcus spp* foi de 31,20%, a de *Corynebacterium spp*, 24,46%; e a de *Streptococcus spp*, 13,42%, e outros microrganismos foram encontrados em menor porcentagem.

Segundo Rea et al, em 1992, foram isolados alguns microrganismos patogênicos no leite, sendo considerados também como agentes etiológicos da mastite bovina, dentre eles: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Yersinia spp*, *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*.

Em dois estudos desenvolvido por Moretti et al (1998), os microrganismos mais comumente encontrados em animais mastíticos foram *Trichosporon capitatum* (31,2%), *T. beigelli* (18,72%), *Candida albicans* (12,48%), *C. guillermondii* (12,48%), *C. tropicalis* (12,48%), *C. parapsilosis* (6,24%) e *Saccaromyces cereviseae* (6,24%) e, dentre as bactérias, encontraem-se *S. aureus* (34,3%), *S. albo* (19,8%), *Streptococcus spp.* (17,2%), *Escherichia coli* (23,2%), *Proteus vulgaris* (5,1%) e *Pseudomonas aeruginosa* (0,5%).

*Staphylococcus aureus* tem sido motivo de preocupação entre os produtores devido a algumas características que estes microrganismos apresentam, tais como capacidade de aderência no interior da glândula mamária, o que dificulta a ação de antibióticos (Fox, 1997). Devido a este fato, este microrganismo é mais comumente relacionado a casos de mastite bovina.

## 2.4 Caracterização das enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas são caracterizadas como sendo proteínas simples, ricas em lisina, tirosina, ácido aspártico e glutâmico, constituídas por duas moléculas de cisteína formando uma ponte dissulfeto. Possuem peso molecular variando entre 26.000 e 29.000 daltons (Bergdoll & Reiser, 1980; Arbuthnott et al, 1990; Su & Wong, 1995).

As enterotoxinas, quando em estado ativo, apresentam resistência à ação de enzimas proteolíticas, como tripsina, renina, papaína, pepsina e quimotripsina (Minor & Marth, 1976; Niskanen & Koiranem, 1977; Varadaraj & Ranganathan, 1989).

Atualmente são descritos sete tipos e três subtipos sorologicamente distintos de enterotoxinas, a saber: SEA (Enterotoxina Estafilocócica A), SEB

(Enterotoxina Estafilocócica B), SEC (Enterotoxina Estafilocócica C, subtipos C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>), SED (Enterotoxina Estafilocócica D), SEE (Enterotoxina Estafilocócica E), SEG (Enterotoxina Estafilocócica G) e SEH (Enterotoxina Estafilocócica H) (Su & Wong, 1995; Bergdoll, 1996; Betley et al., 1996).

De acordo com Bayles e Iandolo (1989), algumas enterotoxinas apresentam semelhança em sua seqüência de aminoácidos, tais como SEA e SEE, SEB e SEC. A SED é um pouco diferente das demais, apresentando maior similaridade com o grupo SEA e SEE.

As enterotoxinas A e D são as que mais aparecem envolvidas em surtos de toxinfecção, podendo estar isoladas ou em combinação (Bennett, 1986 In: Varnam, A.H. & Evans, MG, 1991). Segundo Holt et al (1994), a maioria das cepas produzem EEA.

## **2.5 Métodos de detecção de enterotoxinas**

Os métodos existentes para detecção de enterotoxinas estafilocócicas são classificados em biológicos e imunológicos, sendo estes últimos aqueles de maior aplicação.

Os métodos biológicos consistem na administração intraperitoneal ou intravenosa da enterotoxina em gatos jovens; e via oral em macacos do gênero Rhesus, os quais são tidos como modelos animais confiáveis, apesar de ocorrerem algumas reações não específicas (Varadaraj & Ranganathan, 1989). Devido a necessidade de altas doses de enterotoxinas e às dificuldades de manutenção dos animais destinados para os testes, este método tornou-se praticamente inviável, passando-se, então, a usar os métodos imunológicos.

Os métodos imunológicos baseiam-se no princípio de precipitação da reação antígeno-anticorpo. Várias modalidades deste método já foram sugeridas e aperfeiçoadas, dentre as quais, podem ser relacionados as de reações em gel, onde se destacam a técnica 'O.S.P.' e 'microslide'.

A técnica 'O.S.P.' tem sensibilidade de  $0,5\mu\text{g/ml}$  (Robbins et al., 1974), sendo baseada no princípio de imunodifusão em gel e adequada para análise de enterotoxigenicidade da maioria das linhagens de *Staphylococcus spp.* A técnica consiste na modificação do método de Ouchterlony aliada à produção de enterotoxina pelos métodos membrana sobre ágar ou saco de diálise (Donnelley et al, 1968; Robbins et al, 1974).

Pela técnica de 'microslide' pode-se detectar diretamente no alimento quantidades de enterotoxinas menores que  $0,01\mu\text{g/ml}$  (Casman et al. apud Varadaraj & Ranganathan, 1989), necessitando de 100g do alimento com concentração do extrato para 0,2 ml (Casman & Bennett, 1965; Reiser et al. In: De Oliveira & Hirooka, 1996). Esta técnica tomou-se inviável pelo tempo requerido para análise, 5 dias, e dificuldade na detecção em relação a ng/g.

Muitos outros métodos foram sendo estudados e aperfeiçoados com o objetivo de detectar quantidades ínfimas de enterotoxinas presentes nos alimentos, pois constataram-se, em alguns surtos, quantidades menores que 200ng de EEA causando intoxicação, sendo necessários, para detectar as enterotoxinas, ensaios imunológicos com uma sensibilidade de 1 a 2ng/g (Evenson et al. apud De Oliveira & Hirooka, 1996).

Atualmente, os ensaios RPLA e ELISA, os quais baseiam-se no uso de anticorpos específicos, têm proporcionado melhores resultados. O método RPLA (Aglutinação Reversa Passiva em Látex) é um ensaio de aglutinação que utiliza anticorpos, purificados por cromatografia de afinidade e recobertos por partículas de látex. De acordo com Igarashi et al. (1986), sua sensibilidade é de 0,5ng de enterotoxina por grama de alimento. Este ensaio é bastante utilizado

por ser de fácil manuseio; o kit é encontrado comercialmente; é semiquantitativo; as partículas de látex são dotadas de alta densidade, o que permite sua realização em até 12 horas, não necessitando de equipamentos sofisticados. Sua limitação reside na ocorrência de reações inespecíficas, as quais se apresentam como uma nuvem branca, interferindo na sensibilidade das partículas de látex sensibilizadas e partículas de látex controle. Uma forma proposta por Pereira et al, em 1997, consiste na utilização de 5% de IgG normal e purificada de coelho para a eliminação ou controle das reações inespecíficas. Para a prevenção de tais reações, envolvendo cepas coagulase positivas ou negativas e produtoras usuais ou de diminutas quantidades de enterotoxinas, recomenda-se a adição ao sobrenadante de cultura 5% de IgG normal purificada de coelho. Esta utilização baseou-se em melhores resultados de pesquisas nas quais foram testadas, além da adição de 5% de IgG normal de coelho; IgG normal de novilha, carneiro e cavalo e ainda tratamento térmico do sobrenadante de cultura por 30 minutos a 70°C.

Um outro método para detecção de enterotoxinas estafilocócias é o TECRA-SE. Park et al (1992, 1993 e 1996) estudaram a eficiência deste método com relação a suas reações inespecíficas, falso positivas e suas possíveis soluções e concluíram que as reações inespecíficas podem ocorrer devido a contaminações por outros microrganismos como o *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens* ou . Com relação às soluções, os autores propõem tratar o extrato de toxinas com IgG normal de soro de coelho, tratar o substrato com temperatura 70°C por 3min e conjugar o uso com outros Kits comerciais como o RPLA e o ELISA (RIDASCREEN).

O ELISA (RIDASCREEN) é um método imunoenzimático dos mais sensíveis e rápidos e que foi modificado para eliminar a interferência com a proteína A através da técnica com sensibilidade de 10ng de toxina/ml,

permitindo completar o teste em 8 horas incluindo o tempo de extração. A vantagem deste método também é a detecção da toxina SEE (Enterotoxina Estafilocócia E), não identificada por outros métodos segundo Park et al, 1993.

Oliveira e Hirooka (1996) avaliando Kits comerciais encontrados no mercado, recomendaram testes mais sensíveis para a detecção de enterotoxinas, principalmente em linhagens produtoras de concentrações não detectáveis por métodos de difusão, mas que são passíveis de causar intoxicação mesmo em baixas concentrações. Sob este enfoque, os autores indicaram o uso do RPLA em se tratando de exame que envolve grande quantidade de amostras, devido a sua praticidade; e o ELISA (RIDASCREEN) naqueles casos em que vieram a ocorrer reações inespecíficas que não puderam ser eliminadas, inviabilizando a obtenção de resultados através do RPLA.

## **2.6 Estafilococos e intoxicação alimentar**

Os estafilococos compreendem um grupo de microrganismos, cuja presença se faz observar sobretudo na pele e mucosas do homem, estendendo-se, de maneira generalizada, a animais de sangue quente (Holt et al, 1994). Ainda que colonize diferentes áreas do organismo, para *S. aureus* o maior reservatório está caracterizado pelas fossas nasais e cavidade orofaríngea. A partir daí, poderá se fazer presente na pele e lesões nela localizadas, como resultado de vínculo epidemiológico decorrente de disseminação advinda dos principais sítios.

No que diz respeito aos animais, estes podem desenvolver infecções estafilocócicas e muitos carregam o microrganismo na narina e outros sítios anatômicos. Entretanto, a mais expressiva possibilidade de produção de

enterotoxinas em alimentos, através de estafilococos transferidos da fonte animal, parece estar vinculado a animais com mastite.

Das 19 espécies de estafilococos citadas por Holt em 1994, o *Staphylococcus aureus* é a que está mais associada às toxinfecções alimentares, muito embora se saiba atualmente que algumas outras espécies como *S. intermedius*, o *S. hyicus* e *S. sciuri*, dentre outros, são capazes de produzir enterotoxinas.

A intoxicação alimentar em questão é resultado da ingestão de enterotoxina estafilocócica pré-elaborada em substratos alimentícios em decorrência de microrganismos presentes em densidade populacional situada entre  $10^6$  -  $10^8$  UFC/g ou ml.

O período de incubação costuma variar, podendo ocorrer entre 30 minutos a 8 horas, sendo a média de 2 a 4 horas após a ingestão do alimento contaminado.

Os sintomas aparecem rapidamente e são caracterizados por vômitos severos, diarreias, dores abdominais, sudorese, câibras. Podem ocorrer também dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e, ainda, febres quando a quantidade de toxina ingerida for muito grande. Quando há choque e desidratação, é necessária a hospitalização para a reposição de fluidos e eletrólitos. A recuperação ocorre geralmente de 6 a 24 horas após o aparecimento dos sintomas.

Apenas dois surtos de intoxicação estafilocócica provocados por espécies não produtoras de coagulase já tiveram relato de ocorrência na literatura. Em 1959, Omori & Kato apud Pereira (1996) descrevem a intoxicação em uma escola secundária em Osaka, no Japão, envolvendo 40 estudantes.

Outro surto notificado por Breckinridge & Bergdoll (1971) apud Pereira (1996) envolveu 264 pessoas que participaram de um banquete ocorrido em

1969, nos Estados Unidos, onde foi detectada a produção de SEA por *S. epidermidis*.

No que diz respeito especificamente a episódios nos quais quantidades diminutas de enterotoxina estiveram envolvidas, Everson et al (1988) relataram o ocorrido com crianças que haviam ingerido leite achocolatado contendo 0,4-0,7ng/ml de toxina SEA em uma instituição educacional nos Estados Unidos.

De um modo geral, diversos episódios já foram descritos sobre intoxicações estafilocócicas. Carmo e Bergdoll, em 1990, relataram um surto em Belo Horizonte, MG, onde 60 pessoas que consumiram bolo recheado com creme e queijo apresentaram sintomatologia compatível. Os alimentos envolvidos evidenciaram contagem bacteriana de  $10^4$  à  $10^8$  UFC/g, sendo que as toxinas encontradas foram SEA e SEB.

Outro surto de intoxicação ocorreu em 1993, como relatado por Carmo et al (1996), em que 108 pessoas apresentaram quadro característico de ambos, intoxicação estafilocócica e salmonelose aproximadamente 6 à 15 horas após o consumo de salada de batata num restaurante em Brasília, onde foram isolados *S. aureus* e *Salmonella enteritidis*, sendo que as toxinas encontradas foram do tipo SEA SEB.

## 2.7 Métodos de controle da mastite

O controle da mastite é influenciado pelas espécies de microrganismos envolvidos, a duração da infecção, o tipo e a duração do tratamento com antimicrobianos e ainda a eficiência das medidas de outros tratamentos utilizados (Sandholm et al., 1990).

As mastites são doenças típicas de falta de higiene em alguma etapa da criação. Uma série de medidas preventivas podem ser indicadas para que a doença seja controlada, como discutido por Fonseca (1992), dentre elas destacam-se:

- Higiene do ordenhador;
- Higiene dos utensílios e equipamentos de ordenha;
- Higiene nos estábulos e salas de ordenha;
- Testes periódicos para detecção principalmente de mastite subclínica;
- Exame microbiológico e antibiograma de casos de mastite subclínica;
- Isolamento e, quando necessário, descarte dos animais mastíticos;
- Adoção da linha de leite, ou seja, ordenhar animais de primeira lactação seguido de animais sem mastite subclínica e assim por diante para que não haja contaminação de um animal para o outro;
- Tratamento correto e imediato de casos na propriedade;
- Descarte do leite de animais mastíticos.

## 2.8 Tratamentos com antibióticos

A administração não apropriada de antibióticos no tratamento de casos de mastite gera uma ineficácia do produto (Ruiz, 1983; Rebdhun et al., 1995).

Devido à diversidade dos agentes patogênicos e às práticas de manejo que podem estar relacionadas com a mastite, seu tratamento torna-se bastante complexo. Normalmente são utilizados mais de um medicamento, até que se descubra o mais eficaz, o que encarece o tratamento, além de causar problemas como a presença de resíduos de antibióticos no leite. O uso indiscriminado de antibióticos sem a devida prescrição técnica e testes de identificação do

patógeno específico pode levar à seleção de cepas resistentes desses microrganismos, tornando a cura da mastite ainda mais difícil, sem mencionar que este medicamento é liberado no leite por alguns dias, após a sua administração, ainda que o tratamento térmico não “destrói” esse medicamento, podendo causar problemas também para o consumidor.

McDougall (1998) testou a resistência à penicilina de bactérias isoladas de animais mastíticos encontrando resistência de 20% *S. aureus*, 0% de *Streptococcus uberis* e 100% de *E. coli* isolados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AULDIST, M. J.; HUBBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v.53, n.1, p.28-36, april 1998.
- ARAÚJO, M. L. C.; ANDRIOLI, J. L. *Staphylococcus aureus*: Resistance Patterns to Antimicrobial and Penicilinase Among Strains isolated from apparently Healthy Lactating Cows. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 1, n.27, p.60-63, 1996.
- ARBUTHNOTT, J.P.; COLEMAN, D.C.; AZAVEBO, J.S. Staphylococcal human disease. In: JONES, D.P.; BOARD, K.G.; SUSSUMAN, M.S. *Staphylococci*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.19, p.101-107, 1990.
- BERGDOLL, M.S.; REISER, R. Application of radioimmunoassay for detection staphylococcal enterotoxins in foods. **Journal of Food Protect**, Iowa, v.43, n.1, p.68-72, 1980.
- BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In: BONETTI, F.B. **Caracterização de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos utilizando as técnicas de RAPD e SDS-PAGE**, Campinas: UNICAMP. 1996. 79p. (Dissertação - Mestrado em Microbiologia de Alimentos).
- BETLEY, M.J.; BORST, D.W.; REGASSA, L.B. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxic and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. In: BONETTI, F.B. **Caracterização de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos utilizando as técnicas de RAPD e SDS-PAGE**, Campinas: UNICAMP. 1996. 79p. (Dissertação - Mestrado em Microbiologia de Alimentos).
- BRECKINRIDGE, J.C.; BERGDOLL, M.S. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. **Medical Intelligence**, v.284, n.10, p.542-543, 1971.

BRITO, J. R. F.; CALDEIRA, G. A. V.; VERNÊQUE, R. S.; BRITO, M. A. V. P. Sensibilidade e Especificidade do "California Mastitis Test" como recurso diagnóstico da Mastite Subclínica em relação à Contagem de Células Somáticas. Pesquisa Veterinária Brasileira, São Paulo, v.2, n.17, p.49-53, 1997.

CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. Staphylococcal Food Poisoning in Belo Horizonte (BRAZIL). Revista de Microbiologia, São Paulo, v.21, n.4, p.320-323, 1990.

CARMO, L.S.; VIEIRA, A.C.; REIS, J.D.P.; NASCIMENTO, R.S.; PEREIRA, M.T.; SANTOS, E.J.; BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* present in food implicated in food poisoning. Revista de Microbiologia, São Paulo, v.27, p.122-125, 1996.

CASMAN, E.P.; BENNETT, R.W. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. Applied Microbiology, USA, v.13, p.181-189, 1965.

COSTA, E. O.; COUTINHO, S. D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C. M. Etiologia Bacteriana da Mastite Bovina no Estado de São Paulo, Brasil. Revista de Microbiologia, São Paulo, v.17, n.2, p.107-112, 1986.

COSTA, E.O. Importância Econômica da Mastite Inteciosa Bovina. Comunicções Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo: USP, v.15, n.1, p.21-26, 1991.

COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A. R.; VIANI, F. C.; MASCOLLI, R.; OLIVEIRA, P. J. Mastite Bovina: CMT x Microbiológico. Anais do Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, v.17, p.165-170, 1993.

COSTA, E.O.; BENTES, N.R.; CARCIOFI, A.C.; MELVILLE, P.A.; PRADA, M.S.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E. Survey on the Etiology of Intramamarian Infections in Dairy Cattle. Congresso Mundial de Buiatria, Bolonha, v.18, p.853-855, 1994a.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A.R.; PRADO, R.B.; GARINO, F.; SILVA, J. A. B.;  
Estudo da Ecologia dos Microrganismos contribuindo para o Controle da  
Mastite por Agentes Ambientais. **Anais do Congresso Brasileiro de  
Medicina Veterinária**, Olinda, v.23, p.233-239, 1994b.

COSTA, E. O.; PARDO, R. B.; VIANI, F. C.; WATANABE, E.T.; VENZON,  
P. Estimativas de prejuízos devido à Mastite Subclínica em propriedades  
leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Anais do Congresso  
Brasileiro de Medicina Veterinária**, Olinda, v23, p.268-275, 1994c.

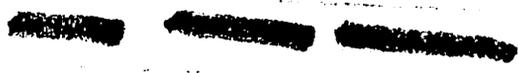
COSTA, E. O.; MELVILLE, P. A.; RIBEIRO, A R.; PRADO, R. B.; WHITE, C.  
R. Métodos para diagnóstico microbiológico de mastite clínica bovina.  
**Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.49,  
n.2, p.159-167, 1997.

CRASS, B.A.; BERGDOLL, M.S. Involvement of coagulase-negative  
staphylococci in toxic shock syndrome. **Journal of Clinical  
Microbiology**, v.23,p.43-45, 1986.

CRUZ, A S.; LOPES, C. A M.; MODOLO, J.R.; GOTTSCHALK, A F.  
Comparative "in vitro" study on the susceptibility and emergence of  
mutants resistant to danofloxacin among *Staphylococcus aureus* isolated  
from bovine mastitis. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, p.61-64,  
1997.

DE OLIVEIRA, T.C.R.M.; HIROOKA, E.Y. Atualidades sobre a detecção de  
enterotoxinas estafilocócicas. **Boletim SBCTA**, São Paulo, v.30, n.2,  
p.121-131, 1996a.

DONNELLEY, C.B.;LESLIE, J.E.; BLACK, L.A. Production of enterotoxin A  
in milk. **Applied Microbiology**, USA, v.16,p.917-924, 1968.



EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S.; BERGDOLL, M.S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. In: DE OLIVEIRA, T.C.R.M.; HIROOKA, E.Y. Atualidades sobre a detecção de enterotoxinas estafilocócicas. *Boletim SBCTA*, São Paulo, v.30, n.2, p.121-131, 1996b.

FONSECA, L.F.L. Estudo da prevalência da mastite bovina e sua relação com práticas de manejo, higiene e terapia em fazendas produtoras de leite tipo "B" no estado de São Paulo. Piracicaba: ESALQ. 1992, p.148. (Dissertação apresentada à ESALQ - USP para obtenção do Título de Mestre em Agronomia e Ciência Animal e Pastagens).

FOX, L.K. Here's why *S. aureus* mastitis doesn't go away. *Hoard's Dairyman*, USA, p.279, Abril, 1997.

GOMES, H.A.; GALLO, C.R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo "C" e queijo "Minas Frescal" comercializados em Piracicaba - SP. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, São Paulo, v.2, n15, p.158-161, 1995.

HALPIN-DOHNALEK, M.I.; MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: Production of Extracellular Compounds and Behavior in Foods - A Review. *Journal of Food Protection*, Iowa, v.52, n.4, p.267-282, 1989.

IGARASHI, H.; FUJIKAWA, H.; SHIGAKI, M.; BERGDOLL, M.S. Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome. *Journal Clinical Microbiology*, USA, v.23, n.3, p.509-512. 1986.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Bovine mastitis - definition and guidelines for diagnosis. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 211, 7, 1987.

**JORDÃO L.P.** Conceitos atuais da mastite bovina. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes, Juiz de Fora, v.22, n.132, p.3-18, maio-jun. 1967.**

**MACDOUGALL, S.** Prevalence of clinical mastitis in 38 Waikato dairy herds. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, v.58, p.76-78, 1998.**

**MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SILVA, L.F.P.** Fatores que afetam a composição do leite. **Indústria de Laticínios, Juiz de Fora, n.17, p.32-35, 1998.**

**MALLIKARJUNASWAMY, M. A ; MURTHY, G. V. K.** Antibiogram of Bacterial Pathogens Isolated from Bovine Subclinical Mastitis Cases. **Indian Veterinary, New Delhi, v.74, p.885-886, 1997.**

**MINOR, T.E.; MARTHY, E.H.** Staphylococcal food poisoning. A review. Characteristics and isolation of *Staphylococci*, properties of enterotoxins, and epidemiology of staphylococcal intoxications. **Indian Nutrition Dietery, New Delhi, v.9, p.161-186, 1976.**

**MORETTI, A.; PASQUALI, P.; MENGARONI, G.; BONCIO, L.; FIORETTI, D.P.** Relationship Between Cell Counts in Bovine Milk and the presence of Mastitis Pathogens (Yeasts and Bacteria). **Journal Veterinary Medical, Berlin, v.45, n.3, p.129-132, 1998.**

**NISKANEN, A.; KOIRANEN, L.** Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources. **Journal of Food Protect, Iowa, v.40, p.543-548, 1977.**

**NICKERSON, S. C.** Development of mastitis. **Dairy Research Report. Louisiana Agricultural Experiment Sation, Lousiana, p.175-182, 1986.**

- NOCARD & MOLLEREAU, 1984 APUD GIESECKE, W.H.; VAN DEN HEEVER, L.V.** The diagnosis of bovine mastitis with particular reference to subclinical mastitis: a critical review of relevant literature. **Journal of Veterinary Research**, v.41, n.8, p.169-212, aug. 1974
- OLIVEIRA, T. C. R. M.; HIROOKA, E. Y.** Atualidades sobre a Detecção de Enterotoxinas Estafilocócias. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.2, p.121-131, jul/dez 1996.
- OMORI, G.; KATO, Y.** A staphylococcal food-poisoning caused by a coagulase negative strain. **Journal Biken's**, v., p.92, 1959.
- PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K.** Nonspecific Reactions of a Commercial enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit (TECRA) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Foods. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v.58, n.8, p.2509-2512, 1992
- PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K.** Simple Solutions to False-Positive Staphylococcal Enterotoxin Assays with Seafood Tested with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit (TECRA). **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v.59, n.7, p.2210-2213, 1993.
- PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K.** Evaluation of Commercial Enzyme Immunoassay Kit (RIDASCREEN) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A, B, C,D and E in Foods. **Applied and Environmental Microbiology**. USA, v.60, n.2, p.677-681, 1994.
- PARK, C. E.; WABURTON, D.; LAFFEY, P. J.** A Collaborative Study on the Detection of Staphylococcal Enterotoxin in Foods with an Enzyme Immunoassay Kit (TECRA). **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 59,n.4, p.390-397, 1996.

**PEREIRA, M.L. Estafilococos Coagulase Negativos Pauciprodutores de Enterotoxinas Estafilocócias e Relato de um Surto Por Espécie Coagulase Positiva. Campinas: Unicamp, 1996. 143p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos).**

**PEREIRA, M. L.; HENEINE, L. G. D.; PEREIRA, J. L.; BERGDOLL, M. S. Control of nonspecific reactions on reversed passive latex agglutination assay (RPLA) for detecting nanogram quantities of staphylococcal enterotoxins. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, v.49, n.4, p.493-497, 1997.**

**REA, M. C.; COGAN, T.M.; TOBIN, SYNTH. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. Journal of Applied Bacteriology, Oxford, v4, n73, p.331-335, 1992.**

**REBHUN, W.C.; GUARD, C.; RICHARDS, C.M. Diseases of Dairy Cattle. USA: Willians & Wilkins, 1995. 530p.**

**ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M.S. Detection the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. Applied Microbiology, USA, v.28, n.6, p.946-950, 1974.**

**RUIZ, R.L. O problema das mastites nos bovinos. Prevenção e tratamento. Higiene Alimentar, Mirandópolis, v.2, n.1/2, p.55-63, jan.-fev. 1983.**

**SANDHOLM, M.; KAARTINEN, L.; PYORALA, S. Bovine mastitis - why does antibiotic therapy not always work? Na overview. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Oxford, v.13, n.3, p.248-260, sep. 1990.**

**SCHALM, O. W.; NOORLANDER, B. S. Experiments and Observations Leading to Development of the California Mastitis Tes. Journal of the American Veterinary Medical Association, Chicago, v.130, n5, p.199-207, 1957.**

SU, Y.C.; WONG, A.C.L. Identification and purification of new staphylococcal enterotoxin H. **Applied and Environ. Microbiology**, USA, v.61, n.4, p.1438-1443, 1995.

VARADARAJ, M.C.; RANGANATHAN, B. Staphylococcal enterotoxins - methods of production and detection - A Review. **Indian Journal Dairy Science**, New Delhi, v.42, n.2, p.267-277, 1989.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. **Foodborne Pathogens. An Illustrated text.** London: Mosby Year Book, 557p., 1991.

## CAPÍTULO 1

### IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE ESTAFILOCOCOS PROVENIENTES DE LEITE DE BOVINOS LEITEIROS COM MASTITE

#### RESUMO

BRABES, K. C. S. Identificação e classificação de estafilococos em leite de vacas mastíticas. Lavras: UFLA, 1999 (Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos).'

Dentre os agentes etiológicos da mastite bovina, as bactérias têm maior incidência, sendo que, na maioria dos casos, cerca de 80 a 90% são atribuídos a *Staphylococcus spp*, sendo *S.aureus* a espécie mais encontrada. Visando confirmar a presença destes microrganismos como um dos principais agentes etiológicos da mastite bovina, foram estudadas cepas isoladas de amostras de leite de animais com mastite clínica e subclínica. Estes microrganismos foram isolados no laboratório de Microbiologia do NAP GAMA - USP (Núcleo de Apoio e Pesquisa em Glândula Mamária - Pirassununga - SP) e as amostras provenientes de leite coletadas em cinco propriedades de São Paulo e Minas Gerais. Todas as cepas foram purificadas para posterior identificação no Laboratório de Microbiologia de Alimentos no DCA (Departamento de Ciência dos Alimentos) UFLA (Universidade Federal de Lavras, MG). Após purificação, as mesmas foram testadas quanto à coloração de Gram, catalase, oxidase, coagulase, hemólise e termonuclease. Cepas com características do grupo em estudo foram inoculadas no Sistema API - STAPH, para identificação final. Das 128 cepas identificadas, as espécies mais encontradas foram *S.aureus* 51 (39%), *S.chromogenes* 15 (11%), *S.sciuri* 12 (9%), *S.simulans* 9 (7%), *S.hyicus* 8 (6%), *S.xylosus* 6 (5%), *S. warneri* 3 (2%), *S. epidermidis* 1 (0,78%), *S. hominis* 1 (0,78%), *S.caprae* 1 (0,78%), *S.saprophyticus* 1 (0,78%), *Micrococcus sedentarius* 1 (0,78%), *Staphylococcus spp* 19 (18%).

---

Comitê Orientador: Dr<sup>a</sup> Elizabeth Oliveira da Costa - USP (Orientadora)  
Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Coorientadora)

## ABSTRACT

BRABES, K. C. S. **Identification and classification of staphylococci in mastitis cow's milk.** Lavras: UFLA, (Dissertation - Master Dissertation in Food Science).

Out of the etiological agents of bovine mastitis, bacteria present the greatest incidence, being that in most cases, about 80 to 90% are ascribed to *Staphylococcus spp*, being *S. aureus* the most found species. By aiming to confirm the presence of these microorganisms as one of the main etiological agents of bovine mastitis, strains isolated from samples of milk from animals with clinic and subclinic mastitis were studied. These microorganisms were isolated in the Microbiology Laboratory of the NAP-GAMA - USP (Núcleo de Apoio e Pesquisa em Glândula Mamária - Pirassununga - SP) and the samples coming from milk collected on five farms of São Paulo and Minas Gerais. All the strains were purified for further purification in the Food Microbiology Laboratory at the DCA (Departamento de Ciência dos Alimentos) UFLA (Universidade Federal de Lavras - MG). After purification, they were tested as to Gram coloration, catalasis, oxidasis, coagulasis, hemolisis and thermonucleasis. Strains with characteristics of the groups under study were inoculated in the API STAPH System for final identification out of the 128 strains identified, the most found species were: *S. aureus* 51 (39%), *S. chromogenes* 15 (11%), *S. sciuri* 12 (9%), *S. simulans* 9 (7%), *S. hyicus* 8 (6%), *S. xylosum* 6 (5%), *S. warneri* 3 (2%), *S. epidermidis* 1 (0.78%), *S. hominis* 1 (0.78%), *S. caprae* 1 (0.78%), *S. saprophyticus* 1 (0.78%), *Micrococcus sedentarius* 1 (0.78%), *Staphylococcus spp* 19 (18%).

---

Guidance Committee: Dr<sup>a</sup> Elizabeth Oliveira da Costa  
Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho

# 1 INTRODUÇÃO

Existe um aumento no número de consumidores que procuram por alimentos naturais de alta qualidade, livres de conservantes artificiais e microrganismos contaminantes que podem vir a comprometer a saúde pública (Rea et al, 1992)

Leite e produtos lácteos contaminados têm sido associados com doenças de origem alimentar, sendo os microrganismos os principais responsáveis pela transmissão dessas doenças, mencionando ainda a deterioração que pode vir a ocorrer com esses produtos (Gomes e Gallo, 1995). As doenças de origem alimentar transmissíveis ao homem pelo leite e produtos lácteos podem estar relacionadas a contaminações provenientes do meio ambiente do animal e da indústria, do manuseio do leite pelo homem e, mais especificamente, de doenças que afetam o animal como a mastite bovina.

A mastite bovina é considerada um dos maiores obstáculos à exploração lucrativa da pecuária leiteira, sendo responsável também por grande perda da produção de leite. Nos EUA, os prejuízos econômicos determinados por sua ocorrência somam cerca de US\$ 2 bilhões, ou US\$ 200,00 por vaca por ano (Costa et al, 1997). Na região sudeste do Brasil, cerca de 20% dos quartos mamários são afetados pela mastite subclínica, enquanto 1% é afetado clinicamente. A redução média na produção de leite devido à mastite subclínica foi de 35%, enquanto a perda por mastite clínica foi de 55%, resultando numa perda diária de 7,5% da produção de leite produzidos a menos por ano (Veiga et al, 1994). Os diferentes níveis de infecção do rebanho, os diferentes agentes etiológicos e a falta de informação do produtor induzem a altas despesas com tratamento, mão-de-obra e perda genética, resultando num maior valor comercial do animal.

Qualquer microrganismo pode vir a ser considerado como agente etiológico da mastite ou mamite bovina, destacando-se as bactérias; além de outros fatores, como anatômicos, fisiológicos, ambientais e muitas vezes decorrentes do próprio manejo, dificultando, com isso, seu tratamento. Dentre os agentes etiológicos, as bactérias têm maior incidência, sendo 80 a 90% dos casos atribuídos ao *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*. *Staphylococcus aureus* tem grande importância por estar presente na proporção de 50% das infecções, estando associado ao aparecimento da mastite subclínica ou crônica, ou até mesmo na forma superaguda. A frequência com que este microrganismo é encontrado é citada por vários autores, sendo a espécie *Staphylococcus aureus* a mais relatada; outras espécies, principalmente as coagulase negativas são sempre citadas como *Staphylococcus ssp* (Costa et al em 1986, 1994a, 1994b; Rea et al em 1992 e Moretti em 1997).

Devido a sua capacidade de penetração e instalação profunda nos tecidos da glândula mamária, torna-se dificultada a ação dos antibióticos. Outro aspecto a se destacar é a facilidade de encontrar este microrganismo na natureza, sendo que em muitos casos o homem pode se apresentar como portador assintomático, portanto importante agente disseminador (Gomes e Gallo, 1995).

Fox, (1997) comenta esta presença devido a algumas características de aderência no interior da glândula mamária, dificultando a ação do tratamento de agentes antimicrobianos. Calvino et al, em 1997, analisou características na glândula mamária e no leite de mastite induzida por cepas de *Staphylococcus aureus* em concentrações diferentes em cada quarto mamário, obtendo um aumento representativo de células somáticas no leite e também uma resposta clínica visível no úbere.

Com base no acima exposto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar as diferentes espécies de estafilococos isolados de leite de vacas mastíticas em cinco propriedades de São Paulo e Minas Gerais.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

As cepas de *Staphylococcus spp* utilizadas neste experimento foram isoladas a partir de leite mastítico proveniente de gado de cinco propriedades diferentes de São Paulo e Minas Gerais. Este isolamento foi feito no NAP GAMA (Núcleo de Apoio e Pesquisa da Glândula Mamária localizado no Campus Universitário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP - Pirassununga - São Paulo).

Foram isolados 128 amostras bacterianas em leite provenientes de animais que apresentavam mastite clínica e subclínica detectadas no campo pelos métodos "Tamis" e CMT.

As cepas foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras - MG, onde foram realizadas as análises microbiológicas para purificação e identificação das mesmas.

### **2.2 Avaliação das propriedades e obtenção dos isolados**

Durante a avaliação das propriedades leiteiras foram realizados, como provas de triagem, os exames de "Tamis" (Caneca telada) (Radostits, 1994) e o CMT ("California Mastitis Test" - Schalm & Noorlander, 1957) de todos os quartos.

O teste de "Tamis" foi realizado sobre caneca telada ou sobre uma caneca com fundo preto no qual desprezam-se os primeiros jatos de leite para verificar alterações neste, tal como presença de grumos, filamentos, soro, o que caracteriza o processo de mastite clínica (Radostits, 1994). A prova de CMT é realizada sobre uma bandeja na qual desprezam-se os jatos de leite, individualmente, em quatro recipientes, e a esta é adicionado o detergente aniônico (alquil-lauril sulfonato de sódio), que atua sobre as células presentes no leite rompendo suas membranas e liberando o material nuclear. A liberação deste material resulta numa viscosidade que caracteriza a reação. Este método é o mais utilizado para diagnóstico da mastite subclínica. Estas provas permitem a indicação de ocorrência do processo inflamatório, que pode ter várias causas, como por exemplo os traumatismos, sendo a infecciosa a mais importante.

Para o diagnóstico de infecção da glândula foram colhidas, assepticamente, amostras de leite somente das glândulas mamárias positivas em qualquer uma das provas acima relacionadas. O quarto era lavado com solução desinfetante e água, submetido a secagem com toalha de papel descartável, anti-sepsia com algodão embebido em álcool-iodado e então eram colhidas as amostras de leite em frascos estéreis (16 x 160mm com rolha de borracha nº 4) para exames microbiológicos. As amostras foram encaminhadas ao laboratório sob refrigeração.

No laboratório, estas foram semeadas em meio de ágar-sangue de carneiro e incubadas a 37°C, sendo realizadas leituras com 24 e 48 horas de crescimento. As técnicas microbiológicas para identificação das bactérias foram empregadas conforme descrito por Lennette et al (1985), Cowan (1985). As provas utilizadas foram: produção de catalase, plasma coagulase, urease, indol; motilidade em ágar semi-sólido; esculina, acidificação de carboidratos; oxidação-fermentação em meio de Hugh & Leifson; produção de H<sub>2</sub>S; crescimento em TSI, ágar citrato de Simmons, "Camp Test". As bactérias

isoladas foram classificadas de acordo com o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg & Holt, 1994).

### **2.3 Purificação dos isolados**

Utilizou-se, para a purificação dos isolados, o meio de cultivo Ágar Baird-Parker - Merck (Baird-Parker,1962; Stiles & Ng, 1981; Baird & Lee, 1995), onde selecionaram-se cepas características e não características:

- colônias negras e lustrosas, devido à precipitação de telurito de potássio
- com e sem presença de halo transparente ao redor das colônias.

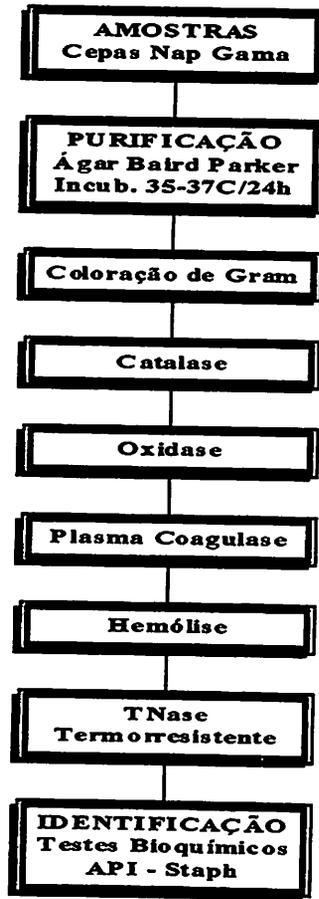
### **2.4 Identificação**

#### **2.4.1 Caracterização inicial dos isolados**

As colônias características foram repicadas em ágar padrão inclinado ("Plate Count Agar", Merck) a 37°C por 24 horas. Estas cepas foram testadas convencionalmente, de acordo com algumas provas bioquímicas (Figura 1).

- quanto à coloração de Gram,
- produção de coagulase livre, Sperber & Tatini (1975), utilizando plasma coagulase - EDTA Coagu-Plasma LB. (Laborclin),

- **termonuclease (Tnase) pelo Ágar azul-O de Toluidina - DNA, formulação segundo ABNT. (1991); "Internation Dairy Federation" (1987) e adaptada por Mandil, (1982) como citado por Sabioni et al (1998),**
- **catalase utilizando-se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%,**
- **oxidase através da fita de oxidase, Bactident Oxidase (Merck),**
- **hemólise em meio Ágar Sangue Base (Merck) acrescido de sangue de carneiro.**



**FIGURA 1** - Esquema de purificação e classificação de estafilococos provenientes de vacas mastíticas obtidas pelo NAP Gama - USP - SP

#### **2.4.2 Kit's de identificação**

A identificação das cepas de *Staphylococcus spp* foi realizada pelo Sistema de Identificação de Estafilococos e Micrococcos API Staph da Biolab-Merieux, que é composto por testes bioquímicos padronizados e miniaturizados em base de dados específica.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Identificação bioquímica

Os resultados obtidos da identificação de todas as propriedades estudadas estão apresentados na Tabela 1.

**TABELA 1** Porcentagem de espécies de amostras bacterianas obtidas de leite mastítico, coletadas em cinco propriedades estudadas pelo NAP-Gama - USP - SP.

<i>Staphylococcus</i>	n <sup>o</sup>	%
<i>aureus</i>	51	38
<i>spp</i>	19	18
<i>chromogenes</i>	15	11
<i>sciuri</i>	12	9
<i>simulans</i>	9	7
<i>hyicus</i>	8	6
<i>xylosus</i>	6	5
<i>warneri</i>	3	2
<i>epidermidis</i>	1	0,78
<i>saprophyticus</i>	1	0,78
<i>caprae</i>	1	0,78
<i>hominis</i>	1	0,78
<b>TOTAL</b>	<b>128</b>	<b>100</b>

Obs. Uma cepa (0,78%) foi identificada como *Micrococcus sedentarius*.

De 128 cepas estudadas, foram identificadas 51 (39%) como *Staphylococcus aureus*; 19 (18%), *Staphylococcus spp*; 15 (11%), *S. chromogenes*; 12 (9%), *S. sciuri*; 9 (7%), *S. simulans*; 8 (6%), *S. hyicus*; 6 (5%), *S. xylosus*; 3 (2%), *S. warneri*; 1 (0,78%), *S. epidermidis*; 1 (0,78%), *S. caprae*; 1

(0,78%), *S. saprophyticus*; 1 (0,78%), *S. hominis*; 1 (0,78%), *Micrococcus sedentarius*.

Os resultados da identificação bioquímica obtida pelo API Staph por propriedade estão apresentados nas Tabelas 1,2,3,4,5 e 6.

**TABELA 2** Porcentagem do número de amostras bacterianas isoladas a partir de leite de vacas mastíticas na propriedade A.

<i>Staphylococcus</i>	n <sup>o</sup>	(%)
<i>aureus</i>	24	80
<i>warneri</i>	2	6,67
<i>chromogenes</i>	2	6,67
<i>spp</i>	1	3,34
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>100</b>

Obs. Uma cepa foi identificada na propriedade A, como *Micrococcus sedentarius* representando 3,34%

**TABELA 3** Porcentagem do número de amostras bacterianas a partir de leite isoladas em vacas mastíticas na propriedade B

<i>Staphylococcus</i>	n <sup>o</sup>	(%)
<i>aureus</i>	10	21
<i>chromogenes</i>	12	25
<i>hyicus</i>	7	15
<i>simulans</i>	3	6
<i>sciuri</i>	2	4
<i>caprae</i>	1	2
<i>saprophyticus</i>	1	2
<i>Staphylococcus spp</i>	11	23
<i>Staphylococcus ssp</i>	22	45,84
<b>TOTAL</b>	<b>48</b>	<b>100%</b>

**TABELA 4** Porcentagem do número de amostras bacterianas a partir de leite isoladas em vacas mastíticas na propriedade C

<i>Staphylococcus</i>	n <sup>o</sup>	(%)
<i>aureus</i>	9	32
<i>simulans</i>	6	22
<i>sciuri</i>	5	18
<i>hyicus</i>	1	3,5
<i>hominis</i>	1	3,5
<i>epidermidis</i>	1	3,5
<i>xylosus</i>	1	3,57
<i>Staphylococcus ssp</i>	4	14
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>	<b>100%</b>

**TABELA 5** Porcentagem do número de amostras bacterianas a partir de leite isoladas em vacas mastíticas na propriedade D.

<i>Staphylococcus</i>	n <sup>o</sup>	(%)
<i>xylosus</i>	4	40
<i>aureus</i>	2	20
<i>sciuri</i>	2	20
<i>chromogenes</i>	1	10
<i>Staphylococcus ssp</i>	1	10
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>100%</b>

**TABELA 6** Porcentagem do número de amostras bacterianas a partir de leite isoladas em vacas mastíticas na propriedade E.

<i>Staphylococcus</i>	n <sup>o</sup>	(%)
<i>aureus</i>	6	50
<i>sciuri</i>	3	25
<i>xylosus</i>	1	8,34
<i>Staphylococcus ssp</i>	2	16,66
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>100%</b>

Os resultados da identificação bioquímica obtida pelo API Staph por propriedade estão apresentados nas Tabelas 2,3,4, 5 e 6. Pode-se notar que o predomínio de *Staphylococcus aureus* é superior em algumas propriedades estudadas ( propriedade A 80%, C 32% e E 50%). Apenas em duas propriedades há predominância de outras espécies (propriedade B 25% de *S. chromogenes*; propriedade D 40% *S. xylosus*).

Os estafilococos apresentam algumas características bioquímicas importantes e que são utilizadas para sua identificação em espécies. Produzem várias enzimas extracelulares, como a hemólise, nuclease, coagulase e lipase, e toxinas (enterotoxinas estafilocócicas), de acordo com Halpin-Dohnalek & Marth, 1989.

Baird-Parker (1962) cita outro aspecto importante na caracterização de *S. aureus* como a pigmentação da colônia, normalmente amarelo-dourada, com presença de  $\beta$ -hemólise quando cultivada em ágar sangue, mas estas características são variáveis, podendo estar associadas com cepas de *Staphylococcus epidermidis*.

A coagulase livre é uma enzima produzida por algumas espécies de estafilococos, principalmente o *S. aureus* em plasma de coelho. Este teste tem sido largamente utilizado para identificação de *Staphylococcus aureus* coagulase

positiva e outras espécies produtoras ou não de coagulase, Sperber & Tatine (1975); Chang & Huang (1995 e 1996).

A Tnase ( termonuclease) é uma enzima produzida por algumas cepas de estafilococos como produto metabólico juntamente com as enterotoxinas, é uma proteína globular de cadeia simples, apresentando-se bastante estável a processamentos térmico, Hirooka et al (1990) e, muitas vezes sua presença num alimento indica a provável correlação da patogenicidade das cepas de estafilococos, principalmente por apresentar uma metodologia de custo inferior quando comparado à produção das enterotoxinas, Neumayer et al (1990); Schinitt et al (1990); Hirooka et al (1992); Sabioni & Maia (1998).

Plastridge, em 1958, indicava que os microrganismos que ocorrem com maior freqüência em mastite eram *Streptococcus agalatae*, *Streptococcus uberis* e o *Micrococcus pyogens*. Novas pesquisas vêm comprovar que os microrganismos causadores de mastite bovina podem ser outros. Costa et al, em 1986, estudando a etiologia bacteriana da mastite bovina em 2553 amostras no estado de São Paulo, cita outros microrganismos, dentre eles *Staphylococcus spp* (49,23%), *Streptococcus spp* (27,08%), *Corynebacterium spp* (30,67%), Enterobacteriaceae (4,26%), *Pseudomonas spp* (1,06%), e 5,64% correspondem a outras bactérias.

Em um estudo feito por Costa et al (1994a) em 11.189 amostras a porcentagem de *Staphylococcus spp* foi de 33,49%, a de *Corynebacterium spp* 24,46% e a de *Streptococcus spp* 13,42%, e outros microrganismos foram encontrados em menor porcentagem.

Wilson et al, em 1997, relatam através de um levantamento feito de janeiro de 1991 a junho de 1995 em Nova York e Pensilvânia, que 75% das infecções intramamárias dos 108.312 animais estudados em 1601 propriedades são causadas por *Streptococcus agalatae*, *Streptococcus spp*, *Staphylococcus*

*aureus* e algumas espécies de estafilococos coagulase negativos, todos citados como *Staphylococcus spp.*

Murdough et al (1995) estudando a prevalência de patógenos em amostras de leite provenientes de gado com mastite subclínica, detectaram também as espécies *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. chromogenes* e *S. xylosum*. Estes mesmos autores estudaram a prevalência destes microrganismos em leites congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 2 semanas e verificaram que esta temperatura não afetou a viabilidade destes patógenos. Confirmado por Sargeant et al, em 1998, que encontraram maior incidência de coagulase negativo demonstrando que estas espécies vêm crescendo como importantes agentes etiológicos da mastite, justificando resultados encontrados nesta pesquisa.

A presença de maior número de *S. aureus* em leites de vacas mastíticas foi também detectada por vários autores (Costa et al, 1986; Costa et al, 1994a; Costa et al, em 1994b; Rea et al, em 1992; Rebhun et al, em 1995; Brito et al, em 1997; Lange et al, em 1997; Moretti et al, em 1998; Mallikarajuna & Murthy, em 1998; Barkema et al, em 1998).

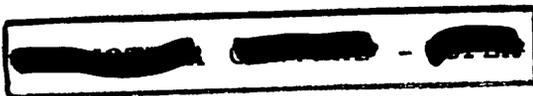
Mcdougal, em 1998, citou a prevalência de mastite bovina e concluiu que quartos posteriores apresentam maior incidência e os microrganismos isolados foram *Streptococcus uberis*, 74,7%, estafilococos coagulase negativos, 10,2%; coliformes, 4,7%; *Streptococcus dysgalactiae*, 4,1%; *Staphylococcus aureus*, 2,9%; 3,3% de outras espécies. Neste trabalho, o autor cita também a resistência à penicilina, destacando resistência de 25% dos 44 isolados de *S. aureus*, 0% de 10 *Streptococcus uberis*, e 100% de 12 *E. coli* isoladas; estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Myllys et al, em 1998, em estudos realizados na Finlândia de 1988 à 1995.

Para a indústria, este é um aspecto também de extrema importância, pois o problema encontrado no campo reflete um prejuízo para a própria indústria e também para a saúde humana, já que estes microrganismos são relacionados

com surtos de intoxicação de origem alimentar, principalmente quando o alimento é fabricado com leite "in natura" (sem tratamento térmico prévio) ou o consumo do próprio leite nas mesmas condições. Um exemplo dessa situação é a citado por Santos et al (1981) que encontraram *S. aureus* em leite cru, no pasteurizado e em queijos tipo "Minas Frescal" produzido com leite cru e fabricados artesanalmente. Quando o leite sofre tratamento térmico adequado este problema desaparece com a presença do microrganismo, como demonstra um estudo realizado em Cuiabá com leite tipo C pasteurizado, Wendpap et al (1997). Resultados semelhantes foram obtidos por Brito et al, em 1998, que avaliaram a presença do microrganismo obtido na plataforma de recepção de uma indústria com amostras retiradas do tanque na plataforma de recepção antes da pasteurização.

Nascimento et al, em 1991, concluíram como insatisfatórias as condições microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de Piracicaba - SP, num estudo com setenta amostras de leite tipo B, C e reconstituído, coletadas de abril a dezembro de 1989, encontrando bactéria mesófila e *S aureus* excedendo os limites legais vigentes (portarias 1/87 da DNVSA/MS E 5/80 da SIPA), como confirmado por Gómez et al, em 1983, em estudo sob condições microbiológicas de queijo "Minas Frescal" comercializados em Lavras - MG.

Reflexos dos prejuízos que a mastite causada por *S. aureus* e espécies coagulase negativos quando comparados com quartos sadios, acarretam para a indústria são relatados por Nicolau et al, em 1996, encontrando como resultados um aumento nos valores médios de pH, teor de cloretos, número de leucócitos polimorfonucleares e uma diminuição nos valores médios de acidez, densidade, teor de gordura, extrato seco total e desengordurado, crioscopia e caseína, resultados semelhantes aos encontrados por outros autores, como citado pelo mesmo.



Como comentado, este microrganismo pode ser eliminado em processos de tratamentos térmicos como a pasteurização, já que suas proteínas são consideradas como termolábeis, o que o torna importante com relação à presença deste microrganismo e com a saúde pública devido a sua capacidade de produzir enterotoxinas, substâncias consideradas como termoestáveis e responsáveis pela intoxicação alimentar estafilocócica, podendo permanecer também em produtos derivados (Marshall. 1992). Cepas enterotoxigênicas foram encontradas em isolados de mastite bovina por *S. aureus* (Freitas & Magalhães, 1990), sendo que alguns tipos de toxinas podem provocar "Síndrome de choque tóxico", como o relatado por Takeuchi et al (1998) em cepas provenientes de mastite.

A mastite é uma doença que acomete a glândula mamária de qualquer espécie animal, inclusive os humanos. Mastite estafilocócica foi identificada em dezenove mulheres, cujo leite apresentava concentrações de  $10^2$  a  $10^4$  CFU/ml de estafilococos, sendo que destas, oito amostras apresentavam produção de enterotoxinas detectadas por difusão em gel, sendo algumas produtoras de Síndrome de choque Tóxico detectadas por RPLA, Pereira et al (1995), comprovando a importância da mastite bovina estafilocócica.

#### 4 CONCLUSÕES

- Dentre as 128 cepas estudadas, foram identificadas 51 (38%) como *Staphylococcus aureus* ; 19 (18%) *Staphylococcus spp*; 15 (11%) *S. chromogenes*, 12 (9%) *S. sciuri*, 9 (7%) *S. simulans*, 8 (6%) *S. hyicus*, 6 (5%) *S. xylosum*, 3 (2%) *S. warneri*, 1 (0,78%) *S. epidermidis*, 1 (0,78%) *S. caprae*, 1 (0,78%) *S. saprophyticus*, 1 (0,78%) *S. hominis*, 1 (0,78%) *Micrococcus sedentarius*.
- O predomínio de *Staphylococcus aureus* foi superior em algumas propriedades estudadas ( propriedade A 80%, C 32% e E 50%).
- Apenas em 2 propriedades a predominância foi de outras espécies (propriedade B 25% de *S. chromogenes*; propriedade D 40% *S. xylosum*).

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). Alimentos - Contagem de *S. aureus* em placas. MB-3464, p.1-4, 1991.
- BARKEMA, H.W.; SCHUKKEN, Y.H.; LAM, T.J.G.M.; BEIBOER, M.L.; WILMINK, H.; BENEDICTUS, G.; BRAND, A. Incidence of Clinical Mastitis in Dairy Herdes Grouped in There Categories by Bulk Milk Somatic Cell Counts. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.81, n.2, 1998.
- BAIRD, R.M.; LEE, W.H. Media used in the detection na enumeration of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*. Amsterdam, v.26, p.15-24, 1995.
- BAIRD-PARKER, A.C. An improved diagnostic and seletive medium for isolating coagulase positive staphylococci. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.25, p.12-19, 1962.
- BRITO, J. R. F.; CALDEIRA, G. A V.; VERNEQUE, R. S.; BRITO, M. A V. P. Sensibilidade e Especificidade do “California Mastitis Tes” como recurso diagnóstico da Mastite Subclínica em relação à Contagem de Células Somáticas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, São Paulo, v.2, n.17, p.49-53, 1997.
- BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SOUZA, H.M.; VARGAS, O.L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, São Pulo, v.18, n.1, 1998.
- CALVINO, L.F.; ZURBRIGGEN, M.A.; CANAVESIO, V.R. Infeccion experimental de la glandula mamária bovina com una cepa vacunal de *Staphylococcus aureus*. *Veterinaria Argentina*, Buenos Aires, v.14, n.35, p.300-306, 1997.

- CHANG, T.C.; HUANG, S.H. Evaluation of Coagulase Activity and Protein A Production for the Identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.58, n.8, p.858-862, 1995.
- CHANG, T.C.; HUANG, S.H. Modification of the Conventional Procedure for the Test of Staphylococcal Coagulase. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.59, n.2, p.197-198, 1996.
- COSTA, E. O.; COUTINHO, S. D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C. M. Etiologia Bacteriana da Mastite Bovina no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.17, n.2, p.107-112, 1986.
- COSTA, E.O.; BENITES, N.R.; CARCIOFI, A.C.; MELVILLE, P.A.; PRADA, M.S.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E. Survey on the Etiology of Itramamarian Infections in Dairy Cattle. **Congresso Mundial de Buiatria**, Bolonha, v.18, p.853-855, 1994a.
- COSTA, E. O.; PARDO, R. B.; VIANI, F. C.; WATANABE, E.T.; VENZON, P. Estimativas de prejuízos devido à Mastite Subclínica em propriedades leiteiras dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Olinda, v23, p.268-275, 1994c.
- COSTA, E. O.; RIBEIRO, A.R.; PRADO, R.B.; GARINO, F.; SILVA, J. A. B.; Estudo da Ecologia dos Microrganismos contribuindo para o Controle da Mastite por Agentes Ambientais. **Anais do Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Olinda, v.23, p.233-239, 1994b.
- COSTA, E.O. Mastite: controle a partir da anti-sepsia após a ordenha. **Balde Branco**, São Paulo, n.389, p.32-36, 1997.
- COWAN, S.T. Cowan and Steel's, **Manual for the identification of medical bacteria**, Cambridge: Cambridge University Press, 2a. ed., 1985.

FOX, L.K. Here's why *S. aureus* mastitis doesn't go away. **Hoard's Dairyman**, USA, Abril, p.279, 1997.

FREITA, M.A.Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.21, n.4, p.315-319, 1990.

GÓMEZ, R.C.; CARVALHO, E.P.; COSTA, L.C.G.C. Condições Microbiológicas de queijo "Minas Frescal" comercializados em Lavras - MG. **Ciência e Prática**, Lavras, v.7, n.2, p.111-121, 1983.

GOMES, H.A.; GALLO, C.R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo "C" e queijo "Minas Frescal" comercializados em Piracicaba - SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.2, n.15, p.158-161, 1995.

HALPIN-DOHNALEK, M.I.; MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: Production of Extracellular Compounds and Behavior in Foods - A Review. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.52, n.4, p.267-282, 1989.

HIROOKA, E.Y.; VICENTE, E.; YOSHIMOTO, Y. Detecção de Termonuclease Estafilocócica em leite: Extração e Manutenção da Atividade Enzimática. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.10, n.2, p.216-230, 1990.

HIROOKA, E.Y.; VICENTE, E.; YOSHIMOTO, Y.; KAMOGAE, M.; BERGDOLL, M.S. A rapid and low cost adaptation of staphylococcal Tnase Detection in Milk. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.23, n.4, p.243-249, 1992.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Bovine mastitis - definition and guidelines for diagnosis. **Bulletin of the International Dairy Federation**, 211, 7, 1987.

- KRIEG, N.R. & HOLT, J.C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, 9ed., Baltimore: Willians & Wilkins, 1994.
- LANGE, C.; CARDOSO, M.; PIANTA, C. Epidemiological characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, p.215-219, 1997.
- LENNETE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J., **Manual of clinical microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, 4ed, 1985.
- MACDOUGALL, S. Prevalence of clinical mastitis in 38 Waikato dairy herds. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, New Zealand, v.58, p.76-78, 1998.
- MALLIKARJUNASWAMY, M. A ; MURTHY, G. V. K. Antibigram of Bacterial Pathogens Isolated from Bovine Subclinical Mastitis Cases. **Indian Veterinary**, New Delhi, v.74, p.885-886, 1997.
- MARSHALL, V. MERCK. Inoculated ecosystems in a milk enviroment. **Journal of Applied Bacteriology**. Oxford, vol73, p.127S - 135SYNTH, 1992.
- MORENO, G.; LOPES, C.A.M.; GOTISCHALK, A.F.; MODOLO, J.R. Incidence and characterization of mastitic bovine milk antimicrobial multi-drug resistent bacteria in middle west region of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Res. Animal Science**, São Paulo, v.34, n.4, p.207-210, 1997.
- MORETTI, A.; PASQUALI, P.; MENGARONI, G.; BONCIO, L.; FIORETTI, D.P. Relationship Between Cell Counts in Bovine Milk and the presence of Mastitis Pathogens (Yeasts and Bacteria). **Journal Veterinary Medical**, Berlin, v.45, n.3, p.129-132, 1998.

**MURDOUGH, P.A.; DEITZ, K.E.; PANDEY, J.W.** Effects of freezing on the viability of nine pathogens from quarters with subclinical mastitis. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.79, n.2, p.334-336, 1996.

**MYLLYS, V.; ASPLUND, K.; BROFELDT, E.; HIRVELÄ-KROSKE, V.; HONKANEM-BUZALSKI, T.; JUNTILA, J.; KULKAS, L.; MYLLYKANGAS, O.; NISKANEM, M.; SALONIEMI, H.; SANDHOLM, M.; SARANPÄÄ, T.** Bovine Mastitis in Finland in 1988 and 1995 - Changes in Prevalence and Antimicrobial Resistance. **Acta Vet. Scand.**, v.39, n.1, p.119-126, 1998.

**NASCIMENTO, G.G.F.; FIGUEREDO, S.H.M.; UBISSES, D.M., ANTONELLI, E.M.** Condições Microbiológicas do leite Pasteurizado comercializado em piracicaba, - SP. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.25, n.1, p.13-21, 1991.

**NEUMAYER, L.; KRÄMER, J.** Production of enterotoxin A and thermonuclease by *Staphylococcus aureus* in legumes. **International of Food Microbiology**, Amsterdam, v.10, p.225-234, 1990.

**NICOLAU, E.S.; NADER-FILHO, A.; AMARAL, L.A.; ROSSI-JUNIOR, O.D.** Influência da mastite subclínica estafilocócica sobre as características físico-químicas e celulares do leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.16, n.1, p.35-38, 1996.

**NOCARD & MOLLEREAU, 1984 APUD GIESECKE, W.H.; VAN DEN HEEVER, L.V.** The diagnosis of bovine mastitis with particular reference to subclinical mastitis: a critical review of relevant literature. **Journal of Veterinary Research**, v.41, n.8, p.169-212, aug. 1974

**PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; SANTOS, E.J.; SELLOS, I.T.; BERGDÖOL, M.S.** Staphylococci breast milk from women with and without mastitis. **Revista Brasileira de Microbiologia**, São Paulo, v.26, n.2, p.117-120, 1995.

- PLASTRIDGE, W.N. Bovine Mastitis: A Review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.41, n.9, p. 1141-1181, 1958.
- RADOSTITS, O.M.; LESLIE, W.B.; FETROW, J. **Herd Health: Food animal production medicine**, Toronto, 2 ed., 1994.
- REA, M. C.; COGAN, T.M.; TOBIN, SYNTH. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v4, n73, p.331-335, 1992.
- REBHUN, W.C.; GREARD, C.; RICHARDS, C.M.; Mastitis. In: WILLIAMS & WILLIAMS: **Discases of Dairy Cattle**, USA, 530p., 1995.
- SABIONI, J.G.; MAIA, A.R.P. Correlação entre a população de *Staphylococcus aureus* e a atividade de Termonuclease, em queijos Minas-Frescal. **Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v.12, n. 54, p.48-50, mar/abr, 1998.
- SANTOS, E.C.; GENIGEORGIS, C.; FARVER, T. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of brazilian minas cheese. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.44, n.3, p.172-176, 1981.
- SARGEANT, J.M.; SCOTT, H.M.; LESLIE, K.E.; IRELAND, M.J.; BASHIRI, A. Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: Frequency of occurrence and bacteriological isolates. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 39, 1998.
- SCHALM, O. W.; NOORLANDER, B. S. Experiments and Observations Leading to Development of the California Mastitis Tes. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v.130, n5, p.199-207, 1957.

- SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, Tnase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Internation Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.11, p.1-20, 1990
- SPERBER, W.H.; TATINI, S.R. Interpretation of the Coagulase Test for Identification if *Staphylococcus aureus*. **Appied Microbiology**, v.29, n.4, p.502-505, Apr. 1975
- STILES, M.E.; NG, L.K.; Use of Baird-Parker's Medium to Enumerate *Staphylococcus aureus* in Meats. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.44, n.8, p.583-587, August 1981.
- SWAMY, M.C.M.; KRISHNAMURTHY, G.V. Prevalence of *Staphylococcus* species in california mastitis test positive cows. **Indian Veterinary**, New Delhi, v.75, p.101-103, 1998.
- TAKEUCHI, S.; ISHIGURO, K.; IKEGAMI, M.; KAI DOH, T.; HAYAKAWA, Y. Production of toxic shock syndrome toxin by *Stapylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. **Veterinary Microbiology**, USA, v. 59, p.251-258, 1998.
- VEIGA, V.M.O.; TEIXEIRA, M.R.; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F. Controle da Mamite dos Bovinos. In: FURLONG, J. **Manejo Sanitário, Prevenção e Controle de Parasitoses e Mamite em Rebanhos de Leite**. Coronel Pacheco: EMBRAPA, 1994, 70p.
- WENDPAP, L.L.; ROSA, O.O.; LIMA, M.G. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo comercializado em Cuiabá - MT. **Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v.11, n.47, 1997.
- WILSON, D.J.; GONZALEZ, R.N.; DAS, H.H. Bovine Mastitis Pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and Effects on Somatic Cell Count and Milk Production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n.10, p.2592-2598, 1997.

## CAPÍTULO 2

### **PRODUÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS PRODUZIDAS POR CEPAS PROVENIENTES DE LEITE DE BOVINOS LEITEIROS COM MASTITE**

#### **RESUMO**

**BRABES, K. C. S. Produção e classificação de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por cepas provenientes de leite de bovinos leiteiros com mastite. Lavras: UFLA, 1999 (Dissertação de Mestrado em Ciência dos Alimentos)**

Dos agentes etiológicos da mastite bovina considerados neste experimento, cerca de 80 a 90% foram atribuídos a *Staphylococcus spp.* Visando avaliar a capacidade enterotoxigênica destes microrganismos, 87 cepas estudadas foram obtidas de leite de animais mastíticos, coletadas em propriedades de São Paulo e Minas Gerais, obtidas no Laboratório de Microbiologia do NAP GAMA - USP (Núcleo de Apoio e Pesquisa em Glândula Mamária - Pirassununga - SP), foram purificadas, identificadas e submetidas à produção de enterotoxinas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos no DCA/UFLA (Universidade Federal de Lavras - MG). As identificações foram feitas pelo Sistema API - STAPH (Bio-Lab Meriéux). Para produção de enterotoxinas foi utilizado o método da "Membrana sobre Ágar", e a detecção se realizou através dos testes comerciais RPLA/OXOID e ELISA (RISDASCREEN) no Setor de Anaeróbios e Epidemiologia Molecular da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, MG. Das 87 cepas testadas, 16 (18%) apresentaram produção de enterotoxinas, sendo destas, 10 (62,5%) identificadas como *S. aureus*, cinco cepas (31,25%) como *S. sciuri* e uma como (6,25%) *S. chromogenes*. Dentre as 26 toxinas produzidas, 10 (38%) foram identificadas como "SEA", sete (27%) como "SEB", 5 (20%) como "SEC", 2 (7,5%) como "SED" e 2 (7,5%) como "SEE". Das 16 cepas produtoras de enterotoxinas, 6 cepas (37,5%) apresentaram produção de mais de uma toxina simultaneamente, três cepas (50%) SEA e SEB; uma (16,7%) SEA, SEB e SEC; uma (16,7%) SEA, SEC, SED e SED; uma (16,7%) produziu SEA, SEC, SED.

---

Comitê Orientador: Dr<sup>a</sup> Elizabeth Oliveira da Costa - USP (Orientadora)  
Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Co-orientadora)

## ABSTRACT

**BRABES, K. C. S. Production and classification of staphylococci Enterotoxins produced by strains coming from mastitis cow's. Lavras: UFLA, 1999 (Master Dissertation in Food Science)**

Of the etiological agents of bovine mastitis, some 80 to 90% are ascribed to *Staphylococcus spp.* *Staphylococcus aureus*, negative coagulase staphylococci and their capacity of synthesizing enterotoxins stand for a new problem to public health. By aiming to confirm the presence of these microorganisms as toxigenic, 87 strains isolated from milk of animals with mastitis were studied in the Microbiology Laboratory of the NAP-GAMA (Núcleo de Apoio e Pesquisa à Glândula Mamária - Pirassununga - SP), purified, identified and the toxins obtained in the Food Microbiology Laboratory at the DCA/UFLA (Universidade Federal de Lavras - MG) being that the samples were collected from farms in São Paulo and Minas Gerais. The identification were done by the API-STAPH System (Bio-Lab Meréux). For enterotoxin production, Membrane on agar method and the detection by the comercial test RPLA/OXOID and ELISA (RIDASCREEN) were performed in the Setor de Anaeróbios e Epidemiologia Molecular da FUNED (Fundação Ezequiel Dias Foundation) Belo Horizonte, MG. Out of 87 strains tested, only 16 (18%) presented enterotoxin production, being 10 strains (62.5%) identified as *S. aureus*, 5 strains (31.25%) as *S. sciuri* and 1 (6.25%) as *S. chromogenes*. Out of the 26 toxins produced, 10 (38%) were identified as "SEA", 7 (27%) as "SEB", 5 (20%) as "SEC", 2 (7.5%) as "SED" and 2 (7.5%) "SEE". From the 16 enterotoxin producing strains, 6 strains (37.5%) presented production of more than one toxin simultaneously, 3 strains (50%) SEA and SEB; 1 (16.7%) SEA, SEB and SEC; 1 (16.7%) SEA, SEC, SED and SEE, 1 (16.7%) yielded SEA, SEC and SED.

---

Guidance Committee: Dr<sup>a</sup> Elizabeth Oliveira da Costa  
Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho

# 1 INTRODUÇÃO

O envolvimento de estafilococos, principalmente *S. aureus* em surtos de toxinfecção alimentar decorrentes da ingestão de suas enterotoxinas previamente elaboradas nos alimentos vêm crescendo e merecendo a cada dia maior atenção. Vários tipos de alimentos já foram relacionados como importantes indutores desta intoxicação, destacando-se produtos lácteos (leite e derivados), produtos de confeitaria, carnes, ovos e massas (Pereira, 1996).

Este microrganismo pode ser eliminado em processos de tratamentos térmicos como a pasteurização e a esterilização comercial, já que suas proteínas são consideradas como termolábeis. Entretanto, o que o torna problemático com relação à saúde pública é sua capacidade de produzir enterotoxinas, que são substâncias consideradas como termoestáveis e se responsabilizam pela intoxicação estafilocócica (Marshall, 1992).

Alguns tipos de enterotoxinas já são conhecidas e classificadas em tipo A (SEA), B (SEB), C<sub>1</sub> (SEC<sub>1</sub>), C<sub>2</sub> (SEC<sub>2</sub>), C<sub>3</sub> (SEC<sub>3</sub>), D (SED), E (SEE), G (SEG), H (SEH) (Su & Wong, 1995; Bergdoll, 1996; Betley et al., 1996). Os métodos existentes para detecção de enterotoxinas estafilocócicas são classificados em biológicos e imunológicos, sendo estes últimos aqueles de maior aplicação, dentre eles destacando-se o RPLA (Reversed Passive Látex Agglutination Assay) e o ELISA RIDASCREEN (Enzyme immunoassay for the detection of *Staphylococcus enterotoxins*).

Comumente é atribuído a *S. aureus* a capacidade de produção de "SE" (Enterotoxina Estafilocócica), mas atualmente sabe-se da capacidade das espécies coagulase negativas como produtoras de enterotoxinas, mesmo que, na maioria dos casos, em pequenas quantidades. Dentre elas, destacam-se, principalmente, as espécies *S. hyicus* e *S. intermedius* (Bergdoll, 1990). Não se

pode afirmar que uma determinada cepa de *Staphylococcus aureus* é patogênica apenas com base na sua produção de coagulase, termonuclease e hemólise, sem que se faça a detecção da enterotoxina no alimento incriminado num surto de toxinfecção. A fim de que se possa identificar cepas de *S.aureus* e *Staphylococcus ssp* como microrganismos patogênicos, essas provas devem ser previamente realizadas, sendo as mais importantes a capacidade de produção de coagulase e termonuclease, as quais podem estar estreitamente relacionadas com produção de enterotoxinas. Vale ressaltar que algumas cepas de *S. aureus* coagulase e ou termonuclease negativas têm estado associadas com surtos de toxinfecção alimentar (Bennett et al., In: Varnam, A.H. & Evans, M.G., 1991; Bautista et al., 1988).

A mastite bovina é uma doença que afeta a glândula mamária de bovinos e vêm sendo considerada a enfermidade mais importante da pecuária leiteira, sendo discutida, desde o século passado, devido aos prejuízos que acarretam (Jordão, 1967). É, na maioria dos casos, provocada por bactérias, sendo a mais importante *Staphylococcus spp*, conforme Brito et al (1997), Costa et al (1986), Rea et al, 1992, Moretti et al (1998).

Face a isto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar e classificar a produção de enterotoxinas das diferentes espécies de estafilococcus isolados de leite de vacas mastíticas em cinco propriedades de São Paulo e Minas Gerais, através de dois métodos imunológicos comerciais, o RPLA/OXOID e o ELISA (RISDASCREEN).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Estafilococos provenientes de vacas mastíticas

Das espécies de estafilococos obtidas pelo Nap Gama - USP (Núcleo de Apoio e Pesquisa da Glândula Mamária), localizado no Campus de Pirassunga, e identificadas no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos no Departamento de Ciência dos Alimentos da UFLA (Universidade Federal de Lavras - MG), foram escolhidas 87 para produção e detecção de enterotoxinas.

A identificação das cepas de *Staphylococcus ssp* foi realizada pelo Sistema de Identificação de Estafilococos e Micrococcos API Staph da Biolab-Merieux, que é composto por testes bioquímicos padronizados e miniaturizados em base de dados específica.

A escolha dos isolados baseou-se em características bioquímicas das cepas, na porcentagem de identificação descrita pelo API Staph e na presença e ausência de halo presentes em meio Baird Parker, Baird-Parker (1989).

A produção de enterotoxinas foi realizada no Laboratório de Microbiologia da UFLA e caracterizadas no Laboratório de Microbiologia da FUNED (Fundação Ezequiel Dias), Belo Horizonte, MG.

## **2.2 Procedimento analítico**

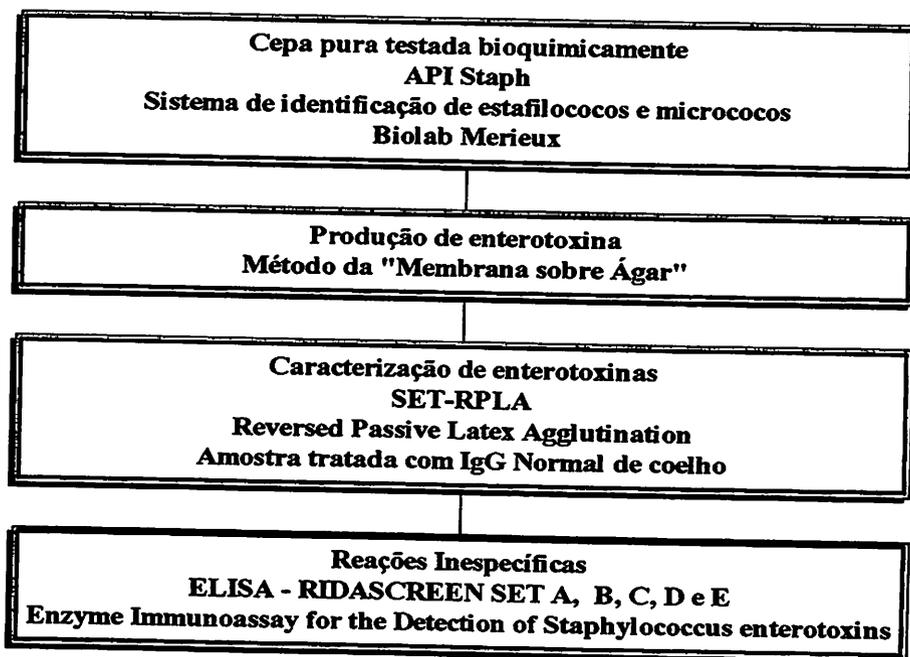
### **2.2.2 Produção de enterotoxinas estafilocócicas - Método da "membrana sobre ágar"**

Após a identificação, os isolados foram incubados em caldo BHI( Biobrás) durante 24 horas a 37°C para posterior inoculação de 0,5 ml em Ágar BHI (Merck) 2x (concentração dupla), acrescidos de 0,5% de extrato de levedura recoberto com membrana de diálise (Spectra/Por membrane dialysis tubing - 6000-8000) e incubados a 37° por 24 horas, de acordo com Hallander (1965), Casman et al (1969) e Darvis & Lawrence (1970).

Os crescimentos obtidos foram lavados com 2,5ml de solução tampão de NaHPO<sub>4</sub> 0,01M pH 7,4 em três etapas, usando-se 1ml; 1ml; 0,5ml do tampão. O líquido obtido nesta lavagem foi centrifugado durante 15 min, a 12000 rpm, a 4°C e centrifuga refrigerada (Centrifugeur - Br 4i - Jouan).

Após centrifugar, retirou-se o sobrenadante e adicionaram 100µl de Tiomesal-Lilly, Pereira et al (1994).

Após a obtenção do extrato, os mesmos foram encaminhados ao Setor de Anaeróbios e Epidemiologia Molecular (FUNED - Fundação Ezequiel Dias), Belo Horizonte, MG, onde foram caracterizadas as enterotoxinas através de dois kits comerciais, o RPLA e o ELISA (RIDASCREEN) (Figura 1).



**FIGURA 1** Esquema de produção e caracterização de enterotoxinas estafilocócicas de isolados obtidos em leite de vacas mastíticas através de dois kits comerciais (RPLA e ELISA-RIDASCREEN).

## **2.3 Métodos para detecção de "SE"**

### **2.3.1 Método de Aglutinação passiva reversa em látex ("RPLA" ou "SET-RPLA")**

As amostras foram agupadas em "pools" contendo em média três amostras utilizando, para isso, as mesmas espécies com características bioquímicas semelhantes e dentro de uma mesma propriedade. Para este teste, foram realizadas cinco repetições para confirmação de positividade quando presente algum tipo de enterotoxina com o desmembramento dos "pools".

O teste consiste em inocular 25µl da amostra, seguidos de 25µl de partículas de látex pré sensibilizadas com a antitoxina específica em placas de microtítulo, de acordo com Igarashi et al (1986), Sanjeev & Surendran (1992). De acordo com Park & Szabo (1986), não foram utilizadas as filas mais externas das placas, pois as mesmas poderiam interferir nos resultados. Paralelamente à amostra, foram inoculadas látex controle para cada amostra para comparação com amostras positivas.

Com a finalidade de evitar e eliminar possíveis reações específicas, foram acrescentadas ao extrato de toxina inicialmente 5%, seguido de 10 e 20% de IgG Normal de coelho para cada 100µl de extrato de toxina, quando há persistência de reações inespecíficas, de acordo com o rótulo do mesmo, Pereira et al (1997). A IgG normal de coelho foi obtida na FUNED -BH.

Após a inoculação, as placas de microtítulo foram mantidas por 24 horas em temperatura ambiente sem agitação. As leituras dos resultados foram feitas contra a luz ou sob um fundo escuro para melhor percepção dos resultados.

Resultados positivos eram obtidas através de uma precipitação das toxinas estafilocócicas apresentando aspectos "esfumaçados" com escores que variam de 1 a 4, e cepas negativas para produção de "SE" apresentavam um "bóton" róseo semelhante ao controle negativo, como descrito pelo Kit RPLA.

### 2.3.2 ELISA (RIDASCREEN)

Cepas testadas pelo SET-RPLA e mesmo com adição de IgG Normal de Soro de Coelho a 5, 10 e 20% apresentaram reações inespecífica e foram testadas primeiramente sob a forma de "pools" pelo teste de ELISA (RIDASCREEN). Resultados de cepas positivas em "pools" foram desmembradas e testadas separadamente.

Primeiramente as microplacas foram montadas de acordo com o número de linhagens, compostas por uma "fita" ou "tira" feita de "wells" colocados num suporte, ambos pré disponíveis pelo kit. Após, adicionaram-se 100µl da amostra em cada um dos "wells" de A a G, e 100µl de controle positivo no H, incubando-se por uma hora em temperatura ambiente. Cada tira corresponde a uma amostra. Fez-se a retirada desta amostra com papel absorvente e a lavagem com 250µl de tampão de lavagem em três etapas. Adicionaram-se 100µl de enzima-conjugado em cada um dos "wells", seguido de outro período de incubação de uma hora. Repetiu-se a lavagem em três etapas com o tampão de lavagem e a secagem com papel toalha. Adicionaram-se 50µl de substrato e 50µl de cromogênio com incubação por 30 min em ambiente escuro. Para finalizar a reação, adicionaram-se 100µl de reagente de parada em cada um dos "wells". A leitura foi feita em leitor de Elisa (UV-VIS Meritrolab modelo M-980) com

absorbância de 450nm para o branco, sendo feita até 60 min após a colocação do reagente de parada.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma das características relacionadas à enterotoxicidade dos estafilococos é a presença ou ausência de halo transparente (devido à ação da lecitinase e da lipase) quando inoculados em ágar Baird-Parker, Baird-Parker, 1989. Pereira (1996) relatou um surto envolvendo queijo tipo "Minas Frescal" contaminado com *S. aureus* em concentração de  $2,9 \times 10^8$  UFC/g, que apresentava, em "BP", colônias atípicas com ausência de lecitinase e lipase, com produção de 180 ng de "SEH"/ml de fluido sobrenadante de cultura. Face a isto, os resultados deste trabalho, demonstrando esta característica estafilocócica, estão apresentados na Tabela 1.

**TABELA 1** Característica de presença e ausência de halo das diferentes espécies produtoras de enterotoxinas provenientes de mastite bovina do estado de São Paulo e Minas Gerais.

<i>Staphylococcus</i>	Toxina					Halo
	A	B	C	D	E	
<i>aureus</i>	+	+	-	-	-	P
<i>aureus</i>	+	+	-	-	-	A
<i>aureus</i>	+	+	-	-	-	A
<i>chromogenes</i>	-	-	-	-	+	A
<i>sciuri</i>	+	+	+	-	-	P
<i>sciuri</i>	+	-	-	-	-	P
<i>aureus</i>	-	+	-	-	-	A
<i>aureus</i>	-	+	-	-	-	P
<i>aureus</i>	-	+	-	-	-	P
<i>sciuri</i>	+	-	-	-	-	A
<i>sciuri</i>	+	-	-	-	-	P
<i>sciuri</i>	+	-	-	-	-	P
<i>aureus</i>	-	-	+	-	-	A
<i>aureus</i>	-	-	+	-	-	A
<i>aureus</i>	+	-	+	+	+	P
<i>aureus</i>	+	-	+	+	-	A

A = ausência; P = presença

As enterotoxinas estafilocóciacas são conhecidas como proteínas simples e possuem algumas características importantes, são ricas em lisina, em tirosina, ácido aspártico e glutâmico, sendo constituídas por duas moléculas de cisteína formando uma ponte dissulfeto. Possuem peso molecular variando entre 26.000 e 29.000 Da (Bergdoll, 1980; Arbuthnott, 1990; Su & Wong, 1995).

São conhecidos sete tipos de enterotoxinas sorologicamente diferentes, EEA, EEB, EEC (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>), EED, EEE, EEG e EEH (Su & Wong, 1995; Bergdoll, 1996; Betley et al., 1996). Algumas enterotoxinas apresentam semelhança em sua seqüência de aminoácidos, EEA e EEE, EEB e EEC, a EED é um pouco diferente das demais, apresentando maior semelhança com o grupo EEA e EEE, Bayles e Iandolo (1989).

As enterotoxinas SEA e SED são as que mais estão envolvidas em surtos de toxinfecção, podendo estar isoladas ou combinadas entre si, (Bennett, 1986 In: Varnam, A.H. & Evans, MG, 1991). De acordo com o Manual de Bergey's (1994) a maioria das cepas produzem EEA.

Os fluidos sobrenadantes dos isolados de estafilococos proveniente de cinco propriedades do estado de São Paulo e Minas Gerais foram obtidos pelo Método da "Membrana sobre Ágar", Pereira et al (1994). Foram agrupados em "pools" e submetidos ao teste comercial SET-RPLA. Para evitar reações inespecíficas que se manifestam sob forma de nuvens, foram adicionados 5 a 20% de IgG normal e purificada de soro coelho, como recomendação por Pereira et al (1997). De acordo com os autores em (1996), estas reações ocorrem devido à baixa quantidade de toxinas presente no fluido, interferindo nos resultados, bloqueando a informação de presença ou ausência de "SE" na amostra testada. Amostras que mesmo acrescentando IgG normal purificada de coelho em concentrações de 10 a 20% continuaram apresentando reações inespecíficas foram submetidas ao teste ELISA (RIDASCREEN), primeiramente sob a forma de "pools", e em caso positivo eram separadas e testada a cepa individualmente.

Atualmente os ensaios RPLA e ELISA têm proporcionado melhores resultados, os quais são baseados no uso de anticorpos específicos. A diferença entre estes dois testes é o número e as quantidades de toxinas detectadas pelos mesmos. O SET-RPLA detecta a toxinas SEA, SEB, SEC e SED e a sensibilidade deste teste é de quantidades de toxinas superiores a 0,5ng/ml (SET-RPLA Staphylococcal Enterotoxin Test Kit). O ELISA (RIDASCREEN) detecta as mesmas toxinas que o RPLA, incluindo a toxinas SEE, com sensibilidade para detecção de 0,2 a 0,7 ng/ml, podendo perceber concentrações à partir de 0,1 ng/ml em alguns casos (RIDASCREEN SET A, B, C, D e E).

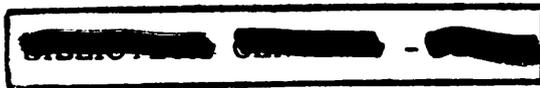
### 3.1 SET-RPLA

Os tipos de toxinas detectadas pelo sistema SET-RPLA/OXOID por propriedade estão demonstradas na Tabela 2.

Em relação às enterotoxinas detectadas, somente 10 (19,6%) das 51 cepas de *S.aureus* coagulase positivas testadas mostraram produção de enterotoxina A, B, C e D. Destas, 3 (30%) produziram simultaneamente toxinas do tipo A, B; 3 (30%) produziram toxina tipo B; 2 (20%) produziram toxina tipo C e 2 (20%) produziram simultaneamente toxinas do tipo A, C e D.

Também aqui pode-se notar a alta taxa detectada da enterotoxina A (30%) pelos isolados estudados.

A importância da detecção destas toxinas deve-se ao fato das mesmas serem responsáveis por intoxicações alimentares graves e, como citado por Crass e Bergdoll em 1986, já foram detectadas até em pacientes com quadro de síndrome de choque tóxico.



A produção de toxinas pelas outras espécies de *Staphylococcus* é citada com frequência na literatura (Bergdoll, 1990), principalmente as espécies *S. hyicus* e *S. intermedius*.

**TABELA 2** Tipos de toxinas detectadas pelo SET-TPLA/OXOID em propriedade de São Paulo e Minas Gerais

<i>Staphylococcus</i>	Toxinas RPLA				Propriedade
	A	B	C	D	
<i>aureus</i>	+	+	-	-	B
<i>aureus</i>	+	+	-	-	B
<i>aureus</i>	+	+	-	-	B
<i>sciuri</i>	+	+	+	-	C
<i>sciuri</i>	+	+	+	-	C
<i>aureus</i>	-	+	-	-	C
<i>aureus</i>	-	+	-	-	C
<i>aureus</i>	-	+	-	-	C
<i>sciuri</i>	+	-	-	-	D
<i>sciuri</i>	+	-	-	-	E
<i>sciuri</i>	+	-	-	-	E
<i>aureus</i>	-	-	+	-	E
<i>aureus</i>	-	-	+	-	E
<i>aureus</i>	+	-	+	+	E
<i>aureus</i>	+	-	+	+	E

As enterotoxinas A e D são as que mais aparecem envolvidas em surtos de toxinfecção, podendo estar isoladas ou em combinação como citado por Bennett, 1986 In; Varnam, A.H. & Evans, MG, 1991, e segundo o Manual de Bergey's (1994), a maioria das cepas produzem EEA.

**TABELA 3** Tipos de enterotoxinas produzidas por *S. aureus* isolado de vacas mastísticas.

<b>Tipo de Toxina</b>	<b>Número</b>	<b>Cepas %</b>
A e B	3	30
B	3	30
C	2	20
A, C e D	2	20
<b>TOTAL (A, B, C e D)</b>	<b>10</b>	<b>100</b>

### 3.2 ELISA (RIDASCREEN)

O ELISA (RIDASCREEN) SET A, B, C e E é um teste "sanduíche" de enzimas imunosensibilizadas para a detecção de toxinas produzidas por estafilococos em extratos de alimento sólido e também de fluidos sobrenadantes de cultura. Baseia-se na reação de antígeno-anticorpo, cada "well" é provido da toxina pré-sensibilizada com as toxinas (um em cada "well").

As cepas que apresentaram reações inespecíficas pelo SET-RPLA foram submetidas ao ELISA (RIDASCREEN). Das 12 cepas submetidas a este kit, apenas duas apresentaram produção de enterotoxina. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos das cepas provenientes de vacas mastísticas do estado de São Paulo e Minas Gerais.

**TABELA 4** Toxinas obtidas pelo kit comercial ELISA (RIDASCREEN) em cepas provenientes de vacas mastíticas isoladas de São Paulo e Minas Gerais.

<i>Staphylococcus</i>	Toxinas					Propriedade
	A	B	C	D	E	
<i>chromogenes</i>	-	-	-	-	+	B
<i>aureus</i>	-	-	+	-	+	D

Um dos métodos para detecção de enterotoxinas foi citado por Robbins & Bergdoll (1984), que aplicavam enterotoxinas em coelhos para a produção de um soro contendo anticorpos contra as toxinas. Outro experimento avaliou o isolamento e purificação através do Método de proteína A estafilocócica usando membrana encapsulada de IgG-agarose de coelho.

Park et al (1992, 1993 e 1996) estudaram a eficiência do método para detecção de enterotoxinas estafilocócicas, o TECRA-SE com relação a reações inespecíficas, falso positivas e suas possíveis soluções e concluíram que as reações inespecíficas podem ocorrer devido a contaminações por outros microrganismos como o *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*. Com relação às soluções, os autores propõem tratar o extrato de toxinas com IgG normal de soro de coelho, tratar o substrato com temperatura 70°C por 3min e conjugar o uso com outros Kits comerciais como o RPLA e o ELISA (RIDASCREEN).

Atualmente existem kits comerciais mais sensíveis para a detecção de enterotoxinas. Mathieu et al, em 1992, avaliaram o SET-ELISA (policlonal tipo "sanduíche") como sendo um teste conveniente por ser de fácil interpretação de

resultados. Conclusão também citada por Windermann et al (1989) e Kuo & Silverman (1980).

Oliveira et al (1996a e 1996b) avaliaram métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas, concluindo que o RPLA e ELISA (RIDASCREEN) são os melhores métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas e que ambos apresentam benefícios em relação à especificidade. Os autores comentam ainda os problemas de reações inespecíficas que ocorrem com o RPLA, sendo corrigidos com a adição de IgG Normal de soro de coelho na concentração de 5% (Pereira et al, 1997) recomendam ainda que, em alguns casos, as reações persistem à utilização do ELISA. Recomendam ainda utilizar o RPLA quando o número de amostras for muito grande.

Park & Szabo avaliaram o kit RPLA e concluíram que sua especificidade em detectar enterotoxinas estafilocócicas é alta, 0,75 ng/g de alimento avaliado. De acordo com dados contidos no mesmo, esta especificidade aumentou para 0,5 ng/g de alimento, Rose et al (1989), Sanjeev & Surendran (1992).

De acordo com Park et al (1994), a especificidade do ELISA (RIDASCREEN) é de 0,3 a 0,35ng/ ml de fluido sobrenadante de enterotoxina, confirmando sua maior especificidade.

Estudos de 93 isolados provenientes de casos de mastite causadas por *Staphylococcus aureus* foram estudados por Freitas & Magalhães (1990). Quanto à enterotoxigenidade, concluíram que apenas uma cepa foi produtora de enterotoxina tipo A, a mais envolvida em surtos de toxinfecções alimentares, como comprovado por este trabalho.

## 4 CONCLUSÕES

- Das 87 cepas testadas, apenas 16 (18%) apresentaram produção de enterotoxinas, sendo 10 cepas (62,5%) identificadas como *S. aureus*, cinco cepas (31,25%) como *S. sciuri* e uma como (6,25%) *S. chromogenes*.
- Dentre as 26 toxinas produzidas, 10 (38%) foram identificadas como "SEA", sete (27%) como "SEB", cinco (20%) como "SEC", duas (7,5%) como "SED" e duas (7,5%) "SEE".
- Das 16 cepas produtoras de enterotoxinas, seis cepas (37,5%) apresentaram produção de mais de uma toxina simultaneamente, três cepas (50%), SEA e SEB; uma (16,7%) SEA, SEB e SEC; uma (16,7%) SEA, SEC, SED e SED; uma (16,7%) produziu SEA, SEC, SED.
- Apenas 13,79% de reações inespecíficas ocorreram quando da avaliação do ensaio RPLA, que não puderam ser eliminadas com a adição de 5, 10 e 20% de IgG normal de soro de coelho, desaparecendo quando avaliadas pelo ELISA (RIDASCREEN)
- O teste de ELISA (RIDASCREEN) foi empregado para fluidos sobrenadantes de cultura que apresentaram reações inespecíficas pelo RPLA, sendo observadas as toxina tipo "SEB", "SEC" e "SEE".

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARBUTHNOTT, J.P.; COLEMAN, D.C.; AZAVEBO, J.S. Staphylococcal human disease. In: JONES, D.P.; BOARD, K.G.; SUSSUMAN, M.S. *Staphylococci*. **Journal of Applied Bacteriology**, Baltimore, v.19, p.101-107, 1990.
- BAIRD-PARKER, A.C. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. In: HALPIN-DOHNALEK, M.I.; MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: Production of Extracellular Compounds and Behavior in Foods - A Review. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.52, n.4, p.267-282, 1989.
- BAUTISTA, L. et al. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. **Applied and Environmental Microbiology**, USA, v.54, n.2, p.566-569, 1988.
- BAYLES, K.W.; IANDOLO, J.J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal Bacteriology**, USA, v.171, n.9, p.4799-4806, 1989.
- BERGDOLL, M.S.; REISER, R. Application of radioimmunoassay for detection staphylococcal enterotoxins in foods. **Journal of Food Protect**, Iowa, v.43, n.1, p.68-72, 1980.
- BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.10, n.2, p.91-99, 1990.
- BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In: BONETTI, F.B. *Caracterização de Staphylococcus aureus enterotoxigênicos utilizando as técnicas de RAPD e SDS-PAGE*. Campinas: UNICAMP. 1996. 79p. (Dissertação - Mestrado em Microbiologia de Alimentos).

- BETLEY, M.J.; BORST, D.W.; REGASSA, L.B. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. In: BONETTI, F.B. **Caracterização de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos utilizando as técnicas de RAPD e SDS-PAGE.** Campinas: UNICAMP. 1996. 79p. (Dissertação - Mestrado em Microbiologia de Alimentos).
- BRECKINRIDGE, J.C.; BERGDOLL, M.S. Outbreak of food-borne gastroenteritis due to a coagulase-negative enterotoxin producing *Staphylococcus*. **Medical Intelligence**, v.284, n.10, p.542-543, 1971.
- BRITO, J. R. F.; CALDEIRA, G. A V.; VERNEQUE, R. S.; BRITO, M. A V. P. Sensibilidade e Especificidade do "California Mastitis Test" como recurso diagnóstico da Mastite Subclínica em relação à Contagem de Células Somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v.2, n.17, p.49-53, 1997.
- CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. Staphylococcal Food Poisoning in Belo Horizonte (BRAZIL). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.21, n.4, p.320-323, 1990.
- CARMO, L.S. et al. *Staphylococcus aureus* e *Salmomella enteritidis* present in food implicated in food poisoning. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.27, p.122-125, 1996.
- CASMAN, E.P.; BENNETT, R.W. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. **Applied Microbiology**, USA, v.13, p.181-189, 1965.
- COSTA, E. O.; COUTINHO, S. D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C. M. Etiologia Bacteriana da Mastite Bovina no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.17, n.2, p.107-112, 1986.
- CRASS, B.A.; BERGDOLL, M.S. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v.23, p.43-45, 1986.

- CRUZ, A S.; LOPES, C. A M.; MODOLO, J.R.; GOTTSCHALK, A F. Comparative "in vitro" study on the susceptibility and emergence of mutants resistant to danofloxacin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.28, p.61-64, 1997.
- DE OLIVEIRA, T.C.R.M.; HIROOKA, E.Y. Atualidades sobre a detecção de enterotoxinas estafilocócicas. **Boletim SBCTA**, São Paulo, v.30, n.2, p.121-131, 1996.
- DONNELLEY, C.B.; LESLIE, J.E.; BLACK, L.A. Production of enterotoxin A in milk. **Applied Microbiology**, USA, v.16, p.917-924, 1968.
- EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S.; BERGDOLL, M.S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. In: DE OLIVEIRA, T.C.R.M.; HIROOKA, E.Y. Atualidades sobre a detecção de enterotoxinas estafilocócicas. **Boletim SBCTA**, São Paulo, v.30, n.2, p.121-131, 1996.
- FREITA, M.A.Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia: São Paulo**, v.21, n.4, p.315-319, 1990.
- GOMES, H.A.; GALLO, C.R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo "C" e queijo "Minas Frescal" comercializados em Piracicaba - SP. **Ciência e Tecnologia de alimentos**. São Paulo, v.2, n15, p.158-161, 1995.
- HALPIN-DOHNALEK, M.I.; MARTH, E.H. *Staphylococcus aureus*: Production of Extracellular Compounds and Behavior in Foods - A Review. **Journal of Food Protection**, USA, v.52, n.4, p.267-282, 1989.

IGARASHI, H.; FUJIKAWA, H.; SHIGAKI, M.; BERGDOLL, M.S. Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome. **Journal Clinical Microbiology**, USA, v.23, n.3, p.509-512. 1986.

KUO, J.K.; SILVERMAN, G.J. Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Staphylococcal Enterotoxin in Food. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.43, n.5, p.404-407, 1980.

MARSHALL, V. MERCK. Inoculated ecosystems in a milk environment. **Journal of Applied Bacteriology**. Oxford, vol73, p.127S - 135SYNTH, 1992.

MATHIEU, A.M.; ISIGIDI, B.K.; DEVRIESE, L.A. Comparison of two commercial kits for the detection of enterotoxin produced by *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 14, p.247-249, 1992.

MORETTI, A.; PASQUALI, P.; MENGARONI, G.; BONCIO, L.; FIORETTI, D.P. Relationship Between Cell Counts in Bovine Milk and the presence of Mastitis Pathogens (Yeasts and Bacteria). **Journal Veterinary Medical**, Berlin, v.45, n.3, p.129-132, 1998.

OLIVEIRA, T. C. R. M.; HIROOKA, E. Y. Avaliação de Métodos de extração e concentração de enterotoxina estafilocócica em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.16, n.2, p.120,125, 1996.

OLIVEIRA, T. C. R. M.; HIROOKA, E. Y. Atualidades sobre a Detecção de Enterotoxinas Estafilocócicas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.30, n.2, p.121-131, 1996b.

- PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K. Nonspecific Reactions of a Commercial enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit (TECRA) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins in Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, USA, v.58, n.8, p.2509-2512, 1992
- PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K. Simple Solutions to False-Positive Staphylococcal Enterotoxin Assays with Seafood Tested with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit (TECRA). *Applied and Environmental Microbiology*, USA, v.59, n.7, p.2210-2213, 1993.
- PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K. Evaluation of Commercial Enzyme Immunoassay Kit (RIDASCREEN) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A, B, C,D and E in Foods. *Applied and Environmental Microbiology*. USA, v.60, n.2, p.677-681, 1994.
- PARK, C.E.; SZABO, R. Evaluation of reversed passive latex agglutination (RPLA) test kits for detection of staphylococcal enterotoxin A, B, C, and D in foods. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, v.32, p.723-727, 1986.
- PARK, C. E.; WABURTON, D.; LAFFEY, P. J. A Collaborative Study on the Detection of Staphylococcal Enterotoxin in Foods with an Enzyme Immunoassay Kit (TECRA). *Journal of Food Protection*, Iowa, v. 59,n.4, p.390-397, 1996.
- PEREIRA, M.L. **Estafilococos Coagulase Negativos Pauciprodutores de Enterotoxinas Estafilocólicas e Relato de um Surto Por Espécie Coagulase Positiva**. Campinas: Unicamp, 1996. 143p. (Tese - Doutorado em Ciência dos Alimentos).
- PEREIRA, M.L.; CARMO, L.S.; LARA, M.A.; DIAS, R.S.; BERGDOLL, M.S. Enterotoxigenic staphylococci from food handlers working in an industrial kitchen in Belo Horizonte, MG (Brazil). *Revista de Microbiologia: São Paulo*, v.25, n.3, p.161-165, 1994.

- PEREIRA, M. L.; HENEINE, L. G. D.; PEREIRA, J. L.; BERGDOLL, M. S.** Control of nonspecific reactions on reversed passive latex agglutination assay (RPLA) for detecting nanogram quantities of staphylococcal enterotoxins. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.49, n.4, p.493-497, 1997.
- REA, M. C.; COGAN, T.M.; TOBIN, SYNTH.** Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v4, n73, p.331-335, 1992.
- ROBBINS, R.; BERGDOLL, M.S.** Production of Rabbit Antisera to the Staphylococcal Enterotoxin. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.47, n.3, p.172-176, 1984.
- ROSE, S. A.; BANKES, P.; STRINGER, M.F.** Detection of staphylococcal enterotoxins in dairy products by the reversed passive latex agglutination (SET-RPLA) kit. **Journal of Food Microbiology**. Amsterdam. v. 8, p.65-72, 1989.
- SAKODA, A.; WANG, H.Y.** A new isolation and purification method for staphylococcal protein A using membrane encapsulated rabbit IgG-Agarose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p.1098-1103, 1989.
- SANJEEV, S.; SURENDRAN, P.K.** Evaluation of Reversed Latex Agglutination Test Kits for the Detection of Staphylococcal Enterotoxin A, B, C and D in Fishery Products. **Journal of Food Science Technology**, v.29, n.5, p.311-312, 1992.
- SU, Y.C.; WONG, A.C.L.** Identification and purification of new staphylococcal enterotoxin H. **Applied and Environ. Microbiology**, USA, v.61, n.4, p.1438-1443, 1995.
- VARNAM, A.H.; EVANS, M.G.** **Foodborne Pathogens. An Illustrated text.** London: Mosby Year Book, 557p., 1991.

WINDERMANN, H.; LÜTHY, J.; MAURER, M. ELISA with enzyme amplication for sensitive detection of staphylococcal enterotoxin in food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdan, v.8, p.25-34, 1989.