

FABÍOLA FONSECA ÂNGELO

**DETECÇÃO DE GENES DE EXOTOXINAS EM *Staphylococcus* spp.
ISOLADOS DE LEITE CRU REFRIGERADO E
DE LEITE DE VACAS COM MASTITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

A584d
2010

Ângelo, Fabiola Fonseca, 1976-

Detecção de genes de exotoxinas em *Staphylococcus* spp.
isolado de leite em refrigerado e leite de vaca com mastite /
Fabiola Fonseca Ângelo. – Viçosa, MG, 2010.
xviii, 70f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Nélcio José de Andrade.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 51-70.

1. Leite - Análise. 2. *Staphylococcus*. 3. Leite -
Contaminação. 4. Mastite. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 637.1277

FABÍOLA FONSECA ÂNGELO

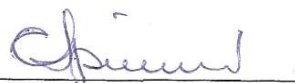
**DETECÇÃO DE GENES DE EXOTOXINAS EM *Staphylococcus* spp.
ISOLADOS DE LEITE CRU REFRIGERADO E
DE LEITE DE VACAS COM MASTITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

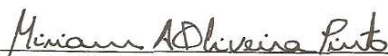
APROVADA EM: 24 de setembro de 2010.



Prof. Antônio Fernandes de Carvalho
(Coorientador)



Profª Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto



Profª Miriam Aparecida de Oliveira Pinto



Prof. Marco Antônio Moreira Furtado



Prof. Nélcio José de Andrade
(Orientador)

Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais e, nesse dia, um crime contra um animal será um crime contra a humanidade.

Leonardo da Vinci

*À minha filha, Julia, amor eterno.
Ao meu marido, José Nélio.
Aos meus pais, Ronaldo e Heloisa.
Aos meus irmãos e sobrinhos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar ao meu lado em todos os momentos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela grande oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), por financiar parte desse trabalho.

À Embrapa Gado de Leite, onde realizei parte desse trabalho.

Ao meu orientador, professor Nélio José de Andrade, pela orientação, pela confiança e por acreditar em meu trabalho

Ao meu coorientador, professor Antônio Fernandes de Carvalho, por diversas contribuições e pelos ensinamentos durante o doutorado.

À pesquisadora e coorientadora, professora Edna Froeder Arcuri, pela grande orientação, pela oportunidade e pela amizade.

Ao professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos pelos grandes ensinamentos.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, por me acompanharem e me auxiliarem no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio, pelo carinho e pelo incentivo.

À Julia, que um dia entenderá os momentos de minha ausência.

Ao José Nélio, pela paciência, pelo carinho e pelo companheirismo.

À Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto, pesquisadora da EPAMIG, ao Marco Antônio Moreira Furtado e à Miriam Aparecida de Oliveira Pinto, professores da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela participação como examinadores e membros da banca de defesa da tese.

A toda minha família, pelo apoio e pelo incentivo.

Aos amigos próximos, presentes e distantes, participativos ou não, mas que torcem pelo meu sucesso.

À Patricia Bernardes e Emiliane, pela grande ajuda prestada no desenvolvimento de parte do meu trabalho.

À Inês e Margarida, da Biblioteca da Embrapa Gado de Leite, pela disponibilização dos artigos científicos, que foram fundamentais durante todo o desenvolvimento de minha tese.

Aos colegas e amigos do Departamento de Alimentos e Toxicologia da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da UFJF, por sempre me compreenderem e me apoiarem.

A todos que, diretamente e indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

FABÍOLA FONSECA ÂNGELO, filha de Ronaldo Ângelo e Heloisa Helena Fonseca Ângelo, nasceu em 15 de junho de 1976, em São Paulo, São Paulo.

Em setembro de 1996, ingressou-se no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Lavras, graduando-se em julho de 2001.

Em 2002, iniciou um projeto como bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), na Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora-MG, ingressando no ano seguinte no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Minas Gerais, em nível de Mestrado.

Em 2005, concluiu o mestrado e foi admitida como professora pela Universidade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC), Juiz de Fora-MG.

Em maio de 2006, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, em nível de Doutorado.

Em 2008 passou a ingressar o quadro de professor substituto do Departamento de Alimentos e Toxicologia da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG.

Atualmente, é professora da Universidade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC), *campus* Juiz de Fora-MG.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE SIGLAS	xii
LISTA DE SÍMBOLOS GREGOS.....	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 <i>Staphylococcus</i> spp.	4
2.2 Características morfológicas de <i>Staphylococcus</i> spp. em ágar BP	5
2.3 Produção de hemolisinas por <i>Staphylococcus</i> spp.	6
2.4 Características bioquímicas de <i>Staphylococcus</i> spp.	6
2.5 Características clínicas e epidemiológicas da mastite bovina.....	7
2.6 Exotoxinas estafilocócicas	10
2.6.1 Toxinas esfoliativas	11
2.6.2 Toxina da síndrome do choque tóxico.....	12
2.6.3 Enterotoxinas estafilocócicas	13
2.6.3.1 Enterotoxinas clássicas e novas enterotoxinas.....	15

	Página
2.7 Atividade superantigênica das enterotoxinas estafilocócicas.....	17
2.8 Intoxicações estafilocócicas	19
2.9 Uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas.....	21
2.10 Hidrofobicidade: fator que influencia a adesão e formação de biofilmes	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Origem dos isolados	25
3.2 Caracterização fenotípica dos isolados.....	26
3.3 Recuperação das culturas bacterianas do estoque	26
3.4 Caracterização morfológica em agar baird-Parker e avaliação da produção de hemolisina em ágar sangue.....	26
3.5 Análise bioquímica pelo sistema ID 32 Staph (<i>bioMerieux</i> [®])	27
3.6 Análises moleculares	27
3.6.1 Genes pesquisados.....	27
3.6.2 Extração e quantificação do DNA molecular	28
3.6.3 Amplificação	28
3.7 Hidrofobicidade da superfície dos isolados	31
3.7.1 Seleção das estirpes avaliadas.....	31
3.7.2 Preparo das suspensões.....	31
3.7.3 Medição do ângulo de contato	31
3.7.4 Análises dos resultados	32
3.8 Análises estatísticas.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Características morfológicas das colônias em agar baird-Parker e produção de hemolisinas em ágar sangue.....	36
4.2 Análise bioquímica pelo sistema ID 32 Staph (<i>bioMerieux</i> [®])	38
4.3 Detecção de gene para a toxina da síndrome do choque tóxico (<i>tst-1</i>)	40
4.4 Detecção de genes para as enterotoxinas estafilocócicas.....	42
4.5 Análise da hidrofobicidade dos isolados	46
5 CONCLUSÕES	50
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Divisão das enterotoxinas em quatro diferentes grupos	17
2 Fotodocumentador Eagle Eye Stratagene Co. onde os geis foram fotografados	30
3 Ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal. As tensões interfaciais da superfície do sólido (γ_s), do líquido em equilíbrio com o vapor (γ_{LV}) e superfície/líquido (γ_{sl}).....	32
4 Detecção do gene <i>femA</i> em <i>Staphylococcus</i> spp. 1 a 4 e 7 a 10 = isolados <i>femA</i> positivos; 5 e 6: controle positivo (<i>S. aureus</i> ATCC 19095); e M marcador de peso molecular 100 pb	35
5 Algumas estirpes de <i>S. aureus</i> portadoras do gene para a TSST-1 (<i>tst-1</i>)	41

LISTA DE TABELAS

	Página
1	Propriedades gerais das enterotoxinas estafilocócicas..... 16
2	<i>Primers</i> para detecção dos genes que codificam enterotoxinas estafilocócicas..... 29
3	Identificação das estirpes utilizadas como controle e seus respectivos genótipos..... 30
4	Componentes da tensão de interfacial de líquidos a 25 °C..... 33
5	Características morfológicas apresentadas por diferentes estirpes de <i>Staphylococcus</i> spp. em agar baird-Parker..... 36
6	Identificação dos isolados utilizando-se o sistema ID 32 Staph (<i>bioMerieux</i> [®])..... 39
7	Distribuição dos genes para as enterotoxinas estafilocócicas dentre os isolados de <i>Staphylococcus</i> spp..... 43
8	Perfis dos genótipos observados para <i>S. aureus</i> , SCN e SCP isolados de leite de vacas com mastite e de <i>S. aureus</i> isolados de leite cru refrigerado (LCR)..... 44
9	Distribuição geográfica dos isolados positivos para genes das exotoxinas 46
10	Ângulo de contato da superfície de isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. com água (Θ_A), formamida (Θ_F) e α -bromonaftaleno (Θ_B)..... 49

11	Valores das componentes apolar ($\Delta G_{\text{sWS}}^{\text{LW}}$) e polar ($\Delta G_{\text{sWS}}^{\text{AB}}$) da energia livre global de interação ($\Delta G_{\text{sWS}}^{\text{TOT}}$) das superfícies de <i>S. aureus</i> toxigênico	49
----	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE SIGLAS

AS	Ágar Sangue
ADP	Adenosina Difosfato
BHI	Brain Heart Infusion
BP	Ágar Baird-Parker
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EE	Enterotoxinas Estafilocócicas
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>femA</i>	Gene codificador do fator FEMA
Kb	Kilobases
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
<i>sea</i>	Gene codificador da enterotoxina A
<i>seb</i>	Gene codificador da enterotoxina B
<i>sec</i>	Gene codificador da enterotoxina C
<i>sed</i>	Gene codificador da enterotoxina D
<i>see</i>	Gene codificador da enterotoxina E
<i>seg</i>	Gene codificador da enterotoxina G
<i>seh</i>	Gene codificador da enterotoxina H
<i>sei</i>	Gene codificador da enterotoxina I
<i>selj</i>	Gene codificador da enterotoxina J
<i>sell</i>	Gene codificador da enterotoxina L
TE	Toxina Esfoliativa
TEA	Toxina Esfoliativa A
TEB	Toxina Esfoliativa B
<i>tst-1</i>	Gene codificador da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico-1
TSST-1	Toxina da Síndrome do Choque Tóxico-1
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

LISTA DE SÍMBOLOS GREGOS

Θ	Ângulo de contato
Θ_W	Ângulo de contato com a água
Θ_F	Ângulo de contato com a formamida
Θ_B	Ângulo de contato com α -bromonaftaleno
Y_s	Tensão interfacial da superfície do sólido
Y_{lv}	Tensão interfacial do líquido em equilíbrio com o vapor
Y_{bs}	Tensão interfacial entre bactéria/ superfície de adesão
Y_{bl}	Tensão interfacial entre bactéria/ líquido
Y_{sl}	Tensão interfacial entre a superfície de adesão/líquido
ΔG_{sws}^{LW}	Componente apolar da energia livre de interação
ΔG_{sws}^{AB}	Componente polar da energia livre de interação
ΔG_{sws}^{TOT}	Energia livre global de interação

RESUMO

ÂNGELO, Fabíola Fonseca, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2010. **Detecção de genes de exotoxinas em *Staphylococcus* spp. Isolados de leite cru refrigerado e de leite de vacas com mastite.** Orientador: Nélio José de Andrade. Coorientadores: Antônio Fernandes de Carvalho e Edna Froeder Arcuri.

Staphylococcus spp. tem sido frequentemente associado a surtos de origem alimentar, em virtude da capacidade de algumas espécies produzirem enterotoxinas, principalmente *Staphylococcus aureus*. A identificação laboratorial dessas espécies, bem como dos genes que codificam as enterotoxinas é um fator importante na elucidação de surtos de intoxicação estafilocócica. Dentre os alimentos envolvidos nessas intoxicações estão o leite e seus derivados, principalmente em decorrência da contaminação por patógenos causadores da mastite bovina, em especial *Staphylococcus aureus*. Assim, para avaliar o potencial toxigênico de isolados de leite, 264 estirpes de *Staphylococcus* spp., sendo 96 isolados de leite cru refrigerado e 168 isolados de leite de vacas com mastite foram usadas neste estudo. Dessas, 237 foram avaliadas também quanto às suas características morfológicas e à produção de hemolisina, 32 identificadas bioquimicamente por meio do sistema ID 32 Staph (*bioMérieux*[®]) e 30 avaliadas quanto ao seu caráter de hidrofobicidade. Todas as estirpes foram analisadas pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para a pesquisa do gene *femA*, específico de *Staphylococcus aureus*,

para dez genes que codificam enterotoxinas estafilocócicas (*sea – sell*) e para o gene *tst-1* que codifica a Toxina da Síndrome do Choque Tóxico. A análise morfológica foi realizada em ágar Baird-Parker (BP) e observando-se os aspectos das colônias quanto à sua cor, ao tamanho, ao brilho e à formação de halo devido à produção de lecitinase. A produção de hemolisinas foi verificada em ágar sangue. A detecção de genes para exotoxinas, incluindo enterotoxinas e toxina da síndrome do choque tóxico foi realizada utilizando-se *primers* descritos na literatura, após extração do DNA bacteriano e sua quantificação em espectrofotômetro (GeneQuant Pro, Amersham Biosciences). A amplificação do DNA foi feita utilizando-se sete reações, sendo cinco com *primers* para dois genes (*seg/femA*, *seh/sei*, *seb/sell*, *sea/sed* e *sec/see*) e duas reações com *primers* para apenas um gene-alvo (*selj* e *tst-1*). As amplificações foram feitas em termociclador GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems). O cálculo de hidrofobicidade foi realizado pela medição do ângulo de contato entre a superfície bacteriana e três líquidos com diferentes polaridades, incluindo água, formamida e α -bromonaftaleno, sobre uma camada de células vegetativas usando-se o aparelho Goniômetro (Kruss, Germany) e pelo resultado da energia livre global de interação ($\Delta G_{\text{sws}}^{\text{TOT}}$). A detecção do gene *femA* indicou que 14 e sete estirpes identificadas previamente como *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN) e *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP), respectivamente, tratavam-se de *S. aureus*. Dentre os isolados avaliados morfológicamente em Agar Baird-Parker e identificados bioquímica e molecularmente como *S. aureus*, apenas 18,7% (38/203) apresentaram colônias típicas. Observou-se que 64,5% (153/237) produziram hemolisina. Quanto às análises realizadas por meio do sistema ID 32 Staph (bioMérieux[®]), 15,6% (5/32) apresentaram identificação diferente daquela realizada por provas bioquímicas tradicionais. Dentre as 264 estirpes analisadas molecularmente, 2,27% eram portadoras do gene *tst-1* e foram isoladas de leite de tanque refrigerado. Os genes que codificam a produção de enterotoxinas estafilocócicas, foram verificados em isolados de leite armazenados em tanque de refrigeração e leite de vacas com mastite, ressaltando-se a presença dos genes que codificam a produção das novas enterotoxinas (*seg-sell*) (96,3%). Todos os isolados (17 isolados de leite proveniente de tanque refrigerado e 13 de leite de vacas com mastite) foram considerados hidrofílicos, tanto em

relação à análise quantitativa ($\Delta G_{adesão} > 0$), quanto para a análise qualitativa ($< 50^\circ$). A presença de genes codificadores das enterotoxinas estafilocócicas demonstra a possibilidade de intoxicações e ressalta a importância no controle da mastite bovina bem como no controle da qualidade do leite.

ABSTRACT

ÂNGELO, Fabíola Fonseca, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2010. **Detection of exotoxin genes in *Staphylococcus* spp. isolates from refrigerated raw milk and milk from cows with mastitis.** Adviser: Nélío José de Andrade. Co-advisers: Antônio Fernandes de Carvalho and Edna Froeder Arcuri.

Staphylococcus spp. has been frequently associated with food-borne outbreaks, due to the capacity some species have to produce enterotoxins, mainly *Staphylococcus aureus*. Laboratory identification of these species, as well as of the genes which codify the enterotoxins, is an important factor in elucidating staphylococcus intoxication outbreaks. Milk and dairy products are among the foods involved in these intoxications, especially due to contamination by pathogens causing bovine mastitis, mainly *Staphylococcus aureus*. Thus, to evaluate the toxigenic potential of milk isolates, 264 strains of *Staphylococcus* spp. were used in this study, i.e., 96 isolates from refrigerated raw milk and 168 isolates from mastitis-infected cows' milk. Out of these, 237 were also evaluated as to their morphological characteristics and hemolysine production, 32 were identified biochemically by means of the ID 32 Staph (bioMérieux®) system and 30 were evaluated as to their hydrophobicity character. All the strains were analyzed by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique to research the gene *femA*, specific of *Staphylococcus aureus*, for ten genes that codify staphylococcal enterotoxins (*sea – sell*) and for the gene *tst-1* that codifies the Toxic Shock Syndrome Toxin.

Morphological analysis was carried out in Baird-Parker (BP) agar, and by observing the colonies' aspect regarding color, size, shine and halo formation as a result of lecithinase production. Hemolysine production was verified in blood agar. Gene detection for the exotoxins, including enterotoxins and toxic shock syndrome toxin, was carried out using primers described in the literature, after extraction of the bacterial DNA and its quantification in spectrophotometer (GeneQuant Pro, Amersham Biosciences). DNA amplification was performed by using seven reactions, five with primers for two genes (*seg/femA*, *seh/sei*, *seb/sell*, *sea/sed* and *sec/see*) and two reactions with primers for only one target-gene (*selj* and *tst-1*). The amplifications were carried out in the GeneAmp[®] PCR thermal cycler System 9700 (Applied Biosystems). Hydrophobicity was calculated by measuring the angle of contact between the bacterial surface and three liquids with different polarities, including water, formamide and α -bromonaphthalene, on a layer of vegetative cells, using the Goniometer apparatus (Kruss, Germany) and by the result of the global free interaction energy ($\Delta G_{\text{sWS}}^{\text{TOT}}$). Detection of the gene *femA* indicated that 14 and seven strains identified previously as *Staphylococcus* Coagulase Negative (SCN) and *Staphylococcus* Coagulase Positive (SCP), respectively, were identified as *S. aureus*. Among the isolates morphologically evaluated in Agar Baird-Parker and biochemically and molecularly identified as *S. aureus*, only 18.7% (38/203) presented typical colonies. It was verified that 64.5% (153/237) produced hemolysine. As for the analyses carried out by the ID 32 Staph (*bioMérieux*[®]) system, 15.6% (5/32) presented identification different from that using traditional biochemical tests. Among the 264 strains analyzed molecularly, 2.27% were carriers of gene *tst-1* and were isolated from refrigerated tank milk. The genes that codify the production of staphylococcal enterotoxins were verified in milk isolates stored in refrigeration tanks and in milk from cows with mastitis, emphasizing the presence of genes that codify the production of the new enterotoxins (*seg-sell*) (96.3%). All isolates (17 isolates from refrigerated tank milk and 13 from mastitis-infected cows' milk) were considered hydrophilic, both in relation to quantitative ($\Delta G_{\text{adhesion}} > 0$), and qualitative ($< 50^\circ$) analysis. The presence of the genes that codify the staphylococcal enterotoxins shows the likelihood of intoxications and emphasizes the importance of controlling bovine mastitis as well as milk quality.

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus inclui, aproximadamente, 40 espécies e subespécies pertencentes à família *Micrococcaceae*. Apresentam-se na forma de cocos, Gram-positivos, não esporulados, produtores de catalase, produtores ou não de coagulase e dividem-se em mais de um plano para formar arranjos em forma de cachos de uva. Crescem em anaerobiose e mostram um metabolismo de anaerobiose facultativo, além de se multiplicarem em alimentos com baixa atividade de água. Dependendo da espécie e das condições de cultivo, as colônias atingem entre 0,5 e 1,5 μm de diâmetro (BURROWS, 1973; EUSEBY, 1997; KWOK; CHOW, 2003).

Dentre as espécies pertencentes a esse gênero, *Staphylococcus aureus* é considerado o principal patógeno da mastite bovina, podendo ser transmitido facilmente de um animal para outro dentro de um rebanho. Além disso, é o patógeno mais envolvido em casos de intoxicações estafilocócicas por produzir diversas exotoxinas, entre elas as enterotoxinas estafilocócicas (BRAMLEY *et al.*, 1996; BOEREMA *et al.*, 2006; SRINIVASAN *et al.*, 2006).

A produção de enterotoxinas estafilocócicas (EE) por *S. aureus* está associada a quadros clínicos de intoxicações estafilocócicas. Essas intoxicações têm sido reportadas como uma das principais doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados, sendo o leite e seus derivados os mais envolvidos.

A contaminação do leite por *S. aureus*, pode ocorrer diretamente quando há casos de mastite clínica ou subclínica, ou indiretamente através da contaminação ambiental durante a ordenha ou durante o processamento do leite (JORGENSEN *et al.*, 2005; ZECCONI *et al.*, 2006; PELES *et al.*, 2007; VERAS *et al.*, 2008). Dessa forma, o isolamento de *S. aureus* por meio de técnicas laboratoriais tradicionais e, ou, modernas ou até mesmo a detecção dos genes responsáveis pela produção das EE torna-se de fundamental relevância para que surtos envolvendo os alimentos sejam detectados com mais eficiência.

A identificação de *S. aureus* isolados de alimentos tem sido realizada por meio de técnicas laboratoriais que envolvem meios de culturas seletivos e diferenciais, uso de kits rápidos como o ID 32 Stpah ou ainda pela identificação molecular do gene *femA*, que é específico para essa espécie. Para a detecção do gene *femA* e dos genes produtores das EE, técnicas moleculares desenvolvidas na década de 1990, como a reação em cadeia de polimerase (PCR), têm sido amplamente utilizadas. Essa técnica baseia-se na obtenção de altas concentrações de cópias de um segmento de DNA específico (LONCAREVIC *et al.*, 2005; BOEREMA *et al.*, 2006).

A presença de um segmento de DNA responsável pela produção de uma EE não indica necessariamente que haverá a produção da toxina pelo microrganismo avaliado. No entanto, tem se verificado a associação da produção dessas enterotoxinas com a produção de outros fatores de virulência como as enzimas coagulase e hemolisina, além da capacidade da estirpe enterotóxigena em aderir a superfícies e formar biofilmes.

A produção desses fatores de virulência está envolvida com a patogenicidade do microrganismo, uma vez que contribui para a invasão tecidual e para a resistência a determinados antibióticos (PEREIRA *et al.*, 2009). Dessa forma, identificar o perfil molecular dos isolados causadores da mastite, sua distribuição e as principais fontes de contaminação assume papel fundamental não apenas para o controle da mastite bovina, como também para a prevenção da ocorrência de casos de intoxicações estafilocócicas.

Os objetivos desse trabalho foram:

a) Caracterizar fenotipicamente estirpes de *Staphylococcus* spp. quanto a características morfológicas em Ágar Baird Parker e a produção de hemolisina em Ágar sangue.

b) Detectar, pela técnica de PCR, os genes que codificam as enterotoxinas clássicas (*sea-see*), as novas enterotoxinas (*seg, seh, sei, selj* e *sell*), a toxina da síndrome do choque tóxico (*tst-1*) e o gene *femA*.

c) Observar a presença de genes para a produção de exotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de leite de vacas com mastite e leite cru, refrigerado em fazendas localizadas nos Estados do Rio de Janeiro e de Minas Gerais.

d) Verificar a característica de hidrofobicidade de isolados toxigênicos e não toxigênicos de *Staphylococcus* spp.

e) Fornecer subsídios para a legislação brasileira e para a indústria de alimentos, para o controle de surtos de origem alimentar e para a garantia de qualidade do leite e derivados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Staphylococcus* spp.

Bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae* e apresentam-se na forma de cocos Gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 e 1,5 μm . Quando visualizados ao microscópio apresentam-se isolados ou agrupados aos pares ou tétrades, ou em cadeias curtas com três ou quatro células ou em agrupamento semelhante a um cacho de uva. As espécies são anaeróbias facultativas, exceto *S. saccharolyticus* e *S. aureus* subsp. *anaerobius*. Possuem necessidades nutricionais e ambientais bem específicos, podendo crescer em ambiente com A_w de até 0,86, pH de 4,8 e temperatura mínima de 8 °C, além de possuírem tolerância ao nitrito. São ubiqüitários, presentes na pele do homem e de animais, e são isolados do ambiente (EUZEBY, 1997; KWOK; CHOW, 2003; NORMANNO *et al.*, 2005).

O gênero inclui 38 espécies e 24 subespécies, sendo algumas associadas a casos infecções no homem e em animais (EUZEBY, 1997; KWOK; CHOW, 2003).

Embora, *Staphylococcus aureus* seja o microrganismo mais envolvido em doenças no homem, outras espécies como *S. intermedius* e *S. hyicus* também são associados a diversos tipos de infecções. Nos animais, *S. aureus* tem se destacado como principal patógeno da mastite bovina (EUZEBY, 1997; KWOK; CHOW, 2003).

2.2 Características morfológicas de *Staphylococcus* spp. em ágar BP

O método de escolha para enumeração de estafilococos em leite é o método de contagem em placas em Agar Baird-Parker (BP). Segundo Bergdoll *et al.* (1967), esse meio é considerado o melhor meio de cultura para o isolamento de *Staphylococcus aureus* em alimentos, por permitir o seu isolamento sem a necessidade do uso de meios de enriquecimento. Esse meio de cultura contém em sua composição agentes seletivos e diferenciais, que auxiliam na distinção das colônias típicas e atípicas de *Staphylococcus aureus*. Os componentes telurito de potássio (0,01%), glicina (1,2%) e cloreto de lítio (0,5%) são agentes seletivos, enquanto as reações de redução do telurito de potássio e hidrólise da gema de ovo são agentes diferenciais (BAIRD; LEE, 1995; SILVA *et al.*, 2000; SANTANA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

Colônias típicas de *S. aureus* são pretas, brilhantes, delimitadas com diâmetro aproximado de 1 a 1,5 mm, halo opaco e área clarificada ao redor de cada colônia. A área opaca refere-se à atividade da lipase, enquanto a zona clara à ação proteolítica (LIM *et al.*, 1983; SILVA *et al.*, 2000; SANTANA *et al.*, 2006; MURPHY *et al.*, 2010; VIÇOSA *et al.*, 2010). Apesar de ser amplamente utilizada, a contagem em BP possui algumas limitações: resultados imprecisos e análise demorada. A seletividade do meio é limitada, uma vez que apenas *Staphylococcus aureus* lipolítico e proteolítico podem ser facilmente identificados (BAIRD; LEE, 1995; SILVA *et al.*, 2000; VIÇOSA *et al.*, 2010). No entanto, de acordo com Lancette e Bennet (2001), estirpes não lipolíticas isoladas de leite e derivados ou de leite de vacas com mastite podem ser frequentemente identificadas por formar colônias típicas.

Colônias atípicas podem ocorrer e a sua presença varia com o tipo de alimento analisado. Essas colônias apresentam cor acastanhada ou branca, ausência dos dois halos ou presença de um deles ao redor das colônias e formato irregular. Outras espécies de *Staphylococcus* ou outras bactérias apresentam cor preta com ou sem halos de hidrólise. Essas colônias podem ser testadas quanto à produção de coagulase para a identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) (BAIRD; LEE, 1995; VIÇOSA *et al.*, 2010). Dessa forma, após a seleção de colônias típicas e atípicas em BP, é necessário para a confirmação da espécie *S. aureus* o emprego de provas

bioquímicas, que auxiliam na estimativa do potencial enterotoxigênico dos isolados (VIÇOSA *et al.*, 2010).

2.3 Produção de hemolisinas por *Staphylococcus* spp.

A patogenicidade das espécies do *Staphylococcus*, em especial de *S. aureus* é associada, em parte, à sua capacidade de produzir diferentes exotoxinas, incluindo α e β -hemolisinas. Essas toxinas constituem um grupo de fatores de virulência, cuja produção parece ser necessária para o estabelecimento da mastite bovina (DINGES *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2005). A α -hemolisina, produzida por *S. aureus*, é a mais estudada e considerada um dos principais fatores de virulência pelos seus efeitos hemolítico, neurotóxico e dermonecrótico (DINGES *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2005). Por outro lado, a β -hemolisina, que é uma esfingomielinase, tem amplo efeito sobre hemácias de bovinos e ovinos (LARSEN *et al.*, 2002; SANDEL *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005).

Cifrian *et al.* (1996) sugerem que a produção simultânea de α e β -hemolisina ocasiona o aumento da capacidade de aderência do microrganismo na glândula mamária e, em consequência, a sua multiplicação.

Segundo Aarestrup (1999) e Morandi *et al.* (2009), a maioria dos isolados de *S. aureus* de mastite bovina carrega o gene que codifica a produção da β -hemolisina, diferentemente do que ocorre com os isolados de *S. aureus* de origem humana. Este fato sugere que estirpes de *S. aureus* β -hemolíticas sejam mais virulentas do que aquelas negativas para hemolisina. No entanto, são poucos os estudos sobre este fator de virulência; assim, pouco pode ser afirmado sobre a função desse fator na mastite bovina (LARSEN *et al.*, 2002).

2.4 Características bioquímicas de *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* pode ser dividido, de acordo com a produção da enzima coagulase, em estafilococos coagulase positiva (SCP) e estafilococos coagulase negativa (SCN). O primeiro grupo, segundo proposto por Kloss (1990), é dividido em quatro espécies principais: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus delphini*.

Estafilococos coagulase-negativa são subdivididos em mais de dez espécies, dentre essas, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus warneri*. Diversos testes bioquímicos fundamentados em características fenotípicas podem ser utilizados para diferenciar e identificar essas espécies. Esses testes, no entanto, requerem diversos meios de cultura, e um tempo longo de incubação (SAMPIMON *et al.*, 2009). Métodos bioquímicos efetivos e rápidos são frequentemente utilizados em substituição às provas bioquímicas tradicionais. *Staphylococcus* spp. potencialmente patogênicos podem ser identificados por meio desses testes rápidos (WIESER; BUSSER, 2000).

Os testes rápidos comerciais, a exemplo do kit ID 32 Staph (*bioMérieux*®), indicado para a identificação específica de diferentes espécies de *Staphylococcus* são amplamente utilizados. No entanto, a acurácia desses métodos pode ser reduzida para isolados de origem animal, uma vez que eles são desenvolvidos, em geral, para isolados de origem humana (SAMPIMON *et al.*, 2009).

A identificação de isolados de origem bovina por meio de alguns desses *kits* comerciais não tem sido considerada confiável, principalmente quando são obtidos resultados com baixa probabilidade. Além disso, a grande diversidade de espécies de *Staphylococcus* e o aumento da prevalência de espécies fenotipicamente pouco conhecidas têm levado à utilização de técnicas moleculares modernas para sua identificação (THORBERG; BRANDSTROM, 2000; WIESER; BUSSER, 2000; SAMPIMON *et al.*, 2009).

O sistema ID 32 Staph (*bioMérieux*®) possui 26 cúpulas, que contêm meio desidratado para a realização de testes colorimétricos, que testes incluem a produção de ácido a partir de glicose, frutose, manose, maltose, lactose entre outros açúcares; descarboxilação da arginina e ornitina; produção de urease, β -glicuronidase, acetoína e fosfatase alcalina; hidrólise da esculina, redução de nitrato e susceptibilidade a novobiocina, entre outros testes (RENNERBERG *et al.*, 1995).

2.5 Características clínicas e epidemiológicas da mastite bovina

A mastite bovina é caracterizada por reação inflamatória do parênquima da glândula mamária, causada, predominantemente, por microrganismos patogênicos, embora fatores químicos, físicos ou traumáticos possam também

estar envolvidos (KERRO DEGO *et al.*, 2002; WELLENBERG, 2002; ZSCHOCK *et al.*, 2005; UNNERSTAD *et al.*, 2008; FOX, 2009; WANG *et al.*, 2009).

Vários microrganismos podem causar a mastite, porém as bactérias são as mais comuns (KERRO DEGO *et al.*, 2002; PELES *et al.*, 2007). Mastites de origem microbiana podem ser contagiosas ou ambientais. No primeiro caso, o patógeno envolvido vive e multiplica-se na glândula mamária infectada disseminando-se de animal para animal, e é causada devido aos procedimentos higiênicos inadequados durante a ordenha. No caso da mastite ambiental, a contaminação ocorre após a ordenha (KERRO DEGO *et al.*, 2002; PELES *et al.*, 2007).

Importantes patógenos contagiosos são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e espécies de *Corynebacterium*. Os agentes ambientais mais conhecidos são as bactérias do grupo dos coliformes, especialmente *Escherichia coli* (KHAN *et al.*, 1998; KERRO DEGO *et al.*, 2002; GOMEZ *et al.*, 2007; RADOSTITS, 2007; UNNERSTAD *et al.*, 2008).

Independentemente do agente causador, a mastite pode ainda ser classificada quanto a sua natureza em clínica ou subclínica. Embora os mesmos patógenos possam estar envolvidos nas duas formas da doença, a primeira é caracterizada pela ocorrência de inflamação do úbere, redução na produtividade e alteração na composição do leite e, em casos mais graves, perda de apetite e de peso, febre e depressão. No caso das mastites subclínicas, os sinais clínicos não são visíveis, observam-se apenas alterações físico-químicas e microbiológicas no leite. Desta forma, nesse último caso, trata-se de doença de difícil diagnóstico, uma vez que sua manifestação tende a ser silenciosa e crônica (ISMAIL *et al.*, 2010).

A cronicidade da doença torna o patógeno persistente dentro do rebanho, o que acarreta elevados prejuízos de ordem econômica para a pecuária leiteira. Perdas econômicas com a redução na produção de leite, descarte do leite, queda no valor do animal e custos veterinários e laboratoriais têm sido as mais evidenciadas.

Com o objetivo de minimizar essas perdas, tem-se realizado numerosos trabalhos com a finalidade de desenvolver medidas de controle para diminuir o número de casos nos rebanhos de todo o mundo. Entre essas medidas estão a desinfecção do teto e o tratamento terapêutico fora do período de lactação.

Ainda assim, o que se tem notado é que mesmo com esses cuidados a mastite bovina é um grande problema (KHAN *et al.*, 1998; KERRO DEGO *et al.*, 2002).

Staphylococcus spp. é reconhecido em todo o mundo como uma das principais causas, em especial *Staphylococcus aureus*, que representa o microrganismo de maior ocorrência (PRATTEN *et al.*, 2001; ZECCONI *et al.*, 2006; UNNERSTAD *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009, MARTINS *et al.*, 2010). Estima-se que 19 a 40,7% das vacas são infectadas com *S. aureus* (KHAN *et al.*, 1998; GOMEZ *et al.*, 2007). No Brasil, Sá *et al.* (2004) observaram que 17% das mastites clínicas e 76,5% das mastites subclínicas, são causadas por *Staphylococcus* spp., enquanto Martins *et al.* (2010) constataram 21,5% de *S. aureus* em casos de mastite subclínica e em 44,0% dos casos de mastite clínica.

Além de *S. aureus* outras espécies de *Staphylococcus* produtores de coagulase (SCP) e espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) podem ser causadores da doença. Roberson *et al.* (1998) identificaram 66% de novilhas com mastite causada por SCP e Brito *et al.* (1999) e Oliveira *et al.* (2009) isolaram 12,4 e 11,65%, respectivamente, de SCN de leite de vacas com mastite.

A variação do padrão de infecção observada em diversos estudos parece estar associada a infecções causadas por diferentes estirpes (KERRO DEGO *et al.*, 2002; ZECCONI *et al.*, 2006). Foi observado por alguns autores, em diferentes países, que apenas algumas estirpes de *S. aureus* são responsáveis por muitos casos de mastite bovina, estando elas amplamente distribuídas, o que parece facilitar a difusão do patógeno no rebanho (PICCININI *et al.*, 1999; BALABAN; RASOOLY, 2000; JOO *et al.*, 2001; STEPHAN *et al.*, 2001; KERRO DEGO *et al.*, 2002; ZECCONI *et al.*, 2006).

Além disso, fatores como características do microrganismo e a susceptibilidade do animal parecem influenciar a persistência de um determinado patógeno dentro da propriedade. Dessa forma, a epidemiologia das infecções intramamárias depende do agente etiológico envolvido e da resposta imune do hospedeiro (PICCININI *et al.*, 1999; KERRO DEGO *et al.*, 2002; BANKS *et al.*, 2003).

A principal defesa do animal baseia-se na fagocitose das células invasoras pelos neutrófilos polimorfonucleados. Porém, apenas essa defesa

não é suficiente para prevenir completamente a infecção por duas razões: deficiência na proteção das células hospedeiras e produção de fatores de virulência pelo microrganismo (KERRO DEGO *et al.*, 2002; BANKS *et al.*, 2003). Além disso, Park *et al.* (1993) observaram que a infecção intramamária causada por *S. aureus* apresenta uma resposta linfocitária reduzida, o que sugere que esta redução se deve à produção desses fatores de virulência (PICCININI *et al.*, 1999; STILES *et al.*, 2005a, b; BOYNUKARA *et al.*, 2008). A presença deles tem sido reconhecida por alguns autores (FERRY *et al.*, 2005; VANCRAEYNESTE *et al.*, 2006; ZECCONI *et al.*, 2006), que descrevem a produção de diferentes enzimas extracelulares e exotoxinas estafilocócicas.

2.6 Exotoxinas estafilocócicas

Staphylococcus spp. têm sido extensivamente estudado pela produção de diversos fatores de virulência. Dentre eles, as exotoxinas estafilocócicas. Essas exotoxinas são representadas por enzimas e citotoxinas as quais incluem hemolisinas, nucleases, proteases, lipases, leucocidinas, hialuronidases e collagenases. Adicionalmente, algumas estirpes produzem ainda uma ou mais das seguintes toxinas: toxinas esfoliativas (TE), toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e enterotoxinas (BALABAN; RASOOLY, 2000; DINGES *et al.*, 2000; MICCORMICK *et al.*, 2001; CREMONESI *et al.*, 2005; DEURENBERG *et al.*, 2005; BOYNUKARA *et al.*, 2008).

A TSST-1 e as enterotoxinas pertencem ao grupo das toxinas pirogênicas, conhecidas também como superantígenos. São as toxinas responsáveis pela síndrome do choque tóxico, casos de doenças veiculadas por alimentos, processos alérgicos e doenças autoimunes (DINGES *et al.*, 2000; MICCORMICK *et al.*, 2001).

As toxinas pertencentes à família dos superantígenos apresentam relação filogenética, estrutura, função e sequência homóloga comum, característica esta, estimada pela análise da sequência de nucleotídeos dos genes que as codificam (BALABAN; RASOOLY, 2000; CREMONESI *et al.*, 2005; DEURENBERG *et al.*, 2005).

A atividade desses superantígenos inclui a destruição do tecido e a proteção da bactéria contra a resposta imune do hospedeiro, além do estímulo exagerado de células T e citocinas (KERRO DEGO *et al.*, 2002).

2.6.1 Toxinas esfoliativas

As toxinas esfoliativas (TE) são divididas em quatro sorotipos: A (TEA), B (TEB), C (TEC) e D (TED), sendo seus genes denominados *eta*, *etb*, *etc* e *etd* e associados a elementos genéticos móveis como fagos, plasmídeos e ilhas de patogenicidade (HAYAKAWA *et al.*, 1998; KERRO DEGO *et al.*, 2002; YAMAGUCHI *et al.*, 2002; ALOUF; ALOUF, 2003). Embora antigenicamente diferentes, essas toxinas compartilham as mesmas propriedades fisiológicas e biológicas, sendo responsáveis pela síndrome da pele escaldada em crianças (TEA e TEB), flegmão em equino (TEC) e abscessos cutâneos no homem (TED) (ALOUF; MULLER-ALOUF, 2003; YAMASAKI *et al.*, 2006).

S. aureus produtores de TE são frequentemente encontrados em isolados clínicos humanos, enquanto seu isolamento de amostras animais é pouco relatado (HAYAKAWA *et al.*, 1998; ALOUF; MULLER-ALOUF, 2003). Aproximadamente 5% dos isolados de *S. aureus* de amostras clínicas são produtores dessas toxinas, com algumas variações entre diferentes autores. Em estudos sobre isolados de animais foram observados a predominância de TEA. Adesiyun *et al.* (1991) reportaram a produção de TE (3,9%) por *S. aureus* isolados de animais, sendo 91,1% representado pela TEA. Hayakawa *et al.* (1998) ao estudarem amostras de *S. aureus* isolados de leite de vacas com mastite e leite de tanques, verificaram produção de TEA em 2 e 1% dos isolados, respectivamente, não sendo detectada em nenhum dos isolados TEB.

Essas toxinas embora sejam produzidas por algumas estirpes de *Staphylococcus*, não são associadas a casos de intoxicações alimentares e a mastite bovina. No entanto, nesse último caso, sua atividade como superantígeno pode reduzir a resposta imune do hospedeiro favorecendo a perpetuação da doença.

2.6.2 Toxina da síndrome do choque tóxico

A TSST-1 foi identificada em 1981 por dois grupos de pesquisadores que a caracterizaram como uma proteína secretada por *S. aureus*. Atualmente, é definida como proteína altamente resistente às proteases e à desnaturação térmica e são produzidas por *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Possui massa molar de 22.000 a 30.000 Da e é codificada pelo gene *tst-1* (DINGES *et al.*, 2000; ZSCHOCK *et al.*, 2000; MICCORMICK *et al.*, 2001; STILES *et al.*, 2005a; HALE *et al.*, 2006). Inicialmente, foi descrita como uma enterotoxina, sendo denominada SEF. No entanto, estudos posteriores demonstraram tratar-se de uma toxina homogênea com pequeno efeito enterotoxigênico em primatas e presença de atividade superantigênica (BUONPANE *et al.*, 2005; STILES *et al.*, 2005a; HALE *et al.*, 2006). Pela atividade de superantígeno, sua liberação na corrente sanguínea pode levar a uma variedade de sinais clínicos, como exantema, hipotensão, febre e disfunção multissistêmica, sendo referidos como síndrome do choque tóxico. Esta síndrome foi primeiramente descrita por Todd *et al.* (1978), sendo associada a mulheres em períodos menstruais, que usavam absorventes internos e a crianças contaminadas com cepas toxigênicas de *S. aureus*. Foi reconhecida como uma das maiores doenças sistêmicas não invasivas causadas por *S. aureus* (REISS, 2000; ZSCHOCK *et al.*, 2000; DEURENBERG *et al.*, 2005; STILES *et al.*, 2005a; HALE *et al.*, 2006).

A taxa de casos fatais associados a essa síndrome é de aproximadamente 10 a 15%, sendo que desses a mortalidade associada a toxinas produzidas por *Streptococcus* (30-60%) é ainda maior, comparada com a toxina produzida por *Staphylococcus* (5%) (DINGES *et al.*, 2000; REISS, 2000).

Aproximadamente, 20% dos isolados de *S. aureus* de humanos são produtores dessa toxina. O gene produtor (*tst-1*) é cromossomal e está ligado a um elemento genético acessório, ausente em amostras TSST-1 negativas (NOVICK *et al.*, 2001; WARNER; ONDERDONK, 2004).

O *tst-1* está presente em cerca de 70% de *S. aureus* isolados de pacientes com a síndrome do choque tóxico (DEURENBERG *et al.*, 2005). No entanto, a avaliação da presença de anticorpos no sangue de indivíduos com e sem a síndrome do choque tóxico, demonstra concentração mais baixa de anticorpos em indivíduos com a doença quando comparados com indivíduos

que não desenvolveram a doença. As concentrações inferiores de anticorpos contra a toxina pode ser um fator que favorece o desenvolvimento do choque tóxico naqueles pacientes (HAYAKAWA *et al.*, 2000).

Embora os principais trabalhos tenham demonstrado a presença de *tst-1* em isolados humanos (TSEN *et al.*, 1998; DEURENBERG *et al.*, 2005), a presença desse gene foi verificada também em isolados animais, incluindo isolados de leite de vacas com mastite e leite cru. Nestes isolados, verificou-se a associação desse gene com os genes das enterotoxinas estafilocócicas, em especial com os genes *sea* e *sec* (JONES; WIENEKE, 1986; HAYAKAWA *et al.*, 2000; SCHERRER *et al.*, 2004; KATSUDA *et al.*, 2005; ZSCHOCK *et al.*, 2005; CHAPAVAL *et al.*, 2006; NADER FILHO *et al.*, 2007).

2.6.3 Enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas (EE) foram inicialmente descritas em 1959, e foram definidas como uma série de proteínas extracelulares produzidas primariamente por algumas estirpes de *S. aureus*. Atualmente, são caracterizadas como proteínas de baixo peso molecular (26.900 a 29.600 Da), resistentes a inativação por proteases intestinais, como a pepsina, além de serem termorresistentes. Alguns estudos já demonstraram a resistência térmica e a persistência de atividade biológica quando submetidas aos tratamentos térmicos: 121 °C/3 min., 121 °C/8 min., 121 °C/11 min. e 121 °C/28 min. Portanto, podem ser detectadas nos alimentos na ausência do microrganismo. Trata-se do maior grupo sorológico de exotoxinas termoestáveis (DINGES *et al.*, 2000; CREMONESI *et al.*, 2005; PELES *et al.*, 2007). Esta estabilidade térmica parece ser dependente das características do meio em que a toxina está presente, ou seja, pH, concentração de sal e outros fatores ambientais relacionados à desnaturação das toxinas (BALABAN; RASOOLY, 2000).

O termo enterotoxina é associado à capacidade em produzir êmese. Porém, enterotoxinas recentemente descritas possuem baixa capacidade emética, o que aumentou a discussão se realmente essas substâncias podem ser incluídas na classe das enterotoxinas (LINA *et al.*, 2004; BOEREMA *et al.*, 2006). Lina *et al.* (2004) e Argudin *et al.* (2010) afirmaram que apenas as exotoxinas que provocam êmese podem ser denominadas como enterotoxinas.

Aquelas enterotoxinas que não possuem essa capacidade ou que ainda não foram testadas quanto à capacidade emética devem ser referidas como superantígenos semelhantes às enterotoxinas estafilocócicas. Esses autores recomendaram que para as novas enterotoxinas descritas e que ainda não foi comprovado seu potencial emético, inclua-se na sua denominação a letra “L”, por exemplo: SELQ; caso seu potencial emético seja comprovado retira-se a letra “L”, ficando então classificada como SEQ.

As EE são divididas em enterotoxinas clássicas (SEA-SEE) e novas enterotoxinas (SEG-SEU), cujos genes já foram descritos (BALABAN; RASOOLY, 2000; STEPHAN *et al.*, 2001; ZSCHOCK *et al.*, 2005; EL-HUNEIDI *et al.*, 2006; PELES *et al.*, 2007; BOYNUKARA *et al.*, 2008). Esses genes podem ser carregados por plasmídeos (*sed* e *selj*), fagos (*sea* e *see*), cromossomos (*seb*, *sec*, *seh*, *sei*, *selk*, *sell*, *selm*, *seln*, *selo*, *selp* e *selq*) ou estarem presentes em ilhas de patogenicidade, como ocorre com *sec*, *seb*, *selk* e *selq*. Além disso, os genes codificadores de *seg*, *sei*, *selm*, *seln* e *selo* estão agrupados em um *cluster* denominado *egc* (*cluster* genômico de enterotoxinas) (JARRAUD *et al.*, 2001; LETERTRE, 2003; BANIA *et al.*, 2005; GOMEZ *et al.*, 2007).

As ilhas de patogenicidade e a maioria dos elementos genéticos codificadores de enterotoxinas podem ser transmitidos horizontalmente entre as estirpes de *S. aureus*, embora, segundo El-Huneidi *et al.* (2006), os genes para as EE não estejam distribuídos uniformemente entre as estirpes.

Em um estudo da distribuição de *seg* e *sei*, os quais codificam SEG e SEI, respectivamente, foi verificado que esses genes são detectados associados em *S. aureus* (ROSEC; GIGAUD, 2002). Em outros trabalhos foi detectado *seg* e *sei*, juntos com *selm*, *seln* e *selo*, os quais codificam respectivamente SELM, SELN e SELO. Em alguns *egc*, a região intergênica localizada entre *sei* e *seln* pode codificar outro superantígeno, denominado SEIU (BANIA *et al.*, 2005).

Segundo Chen *et al.* (2004), a sequência do espaço intergênico das enterotoxinas SEG e SEI indicam três enterotoxinas relacionadas aos genes *seg* e *sei*, denominadas SELK, SELL e SELM. Embora as enterotoxinas e seus respectivos genes tenham sido descritos, seu papel nas doenças de origem alimentar ainda não está bem clara (CHEN *et al.*, 2004; CREMONESI *et al.*,

2005; STILES; KRAKAUER, 2005; MORANDI *et al.*, 2007). Sabe-se, no entanto, que sua ação no trato digestório provoca intoxicações e ainda podem agir como superantígenos por promover a estimulação não específica de células T. Apesar de essas atividades estarem localizadas em domínios diferentes e atuarem em diferentes tecidos no hospedeiro, observa-se uma alta correlação entre elas e, em muitos casos, a perda da atividade de superantígeno resulta na perda da atividade enterotoxigênica (BALABAN; RASOOLY, 2000; STILES *et al.*, 2005a; GOMEZ *et al.*, 2007).

2.6.3.1 Enterotoxinas clássicas e novas enterotoxinas

Dentre as enterotoxinas clássicas, a EEA é mais frequentemente associada a doenças de origem alimentar. Trata-se de toxina cujo gene (*sea*) é composto de 771 pares de bases, responsável pela síntese de 257 aminoácidos. Seu gene é carregado por um bacteriófago e análises de hibridização do DNA do fago transportador sugere que este fago esteja integrado ao cromossomo bacteriano por circularização e cruzamento recíproco. Há três isoformas de EEA com três diferentes pontos isoelétricos, o que sugere variação e modificação após a tradução (SOARES *et al.*, 1997; BALABAN; RASOOLY, 2000).

A produção de EEB deve-se à presença de *seb*, o qual é cromossomal em amostras clínicas e plasmidial em outros isolados. Neste caso, o gene é carregado por um plasmídeo com 750 kb (SOARES *et al.*, 1997). O gene *sec* também é cromossomal e codifica a produção de uma toxina (EEC) formada por um grupo de proteínas altamente conservadas, com uma significativa reatividade imunológica cruzada. Possui três subtipos distintos antigenicamente: EEC₁, EEC₂ e EEC₃. O *sec*₃ contém 801 pares de bases e codifica uma proteína com 267 aminoácidos. EEC₃ difere das EEC₁ e EEC₂ em quatro e nove aminoácidos, respectivamente (SOARES *et al.*, 1997, DINGES *et al.*, 2000).

EED é considerada a segunda toxina mais comum associada a doenças de origem alimentar, sendo o gene (*sed*) localizado em um plasmídeo, que também carrega genes de resistência para penicilina e cádmio. Esse gene codifica uma proteína com 258 aminoácidos (SOARES *et al.*, 1997).

O gene para EEE codifica uma proteína com 29 kDa e compartilha uma sequência homóloga com EEA. Além disso, a sequência de DNA indica que EEE, EED e EEA possuem relação próxima, cuja homologia é de 53 a 84% (BALABAN; RASSOLY, 2000; DINGES et al., 2000; STILES et al., 2005a). Para EEB e EECs foi observado de 50 a 66% de homologia (STILES *et al.*, 2005a).

As novas enterotoxinas, descritas mais recentemente, são também caracterizadas como moléculas pequenas de natureza protéica e que compartilham com as enterotoxinas clássicas características bioquímicas e estrutural semelhantes (Tabela 1).

Tabela 1 – Propriedades gerais das enterotoxinas estafilocócicas

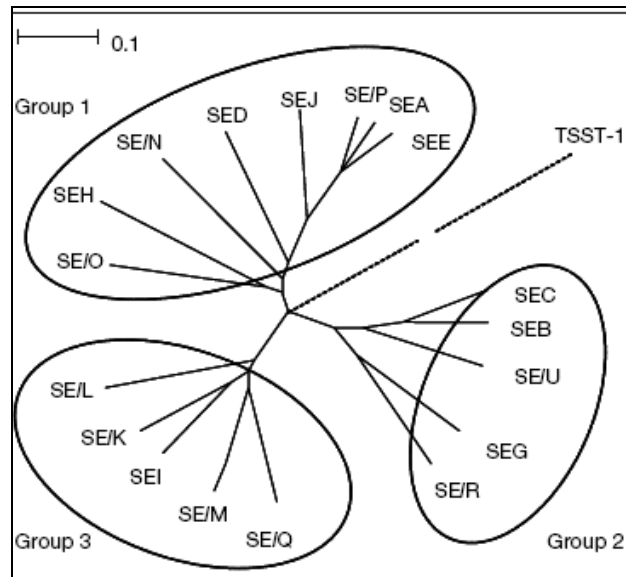
Toxina	Massa Molar (Da)	Ponto Isoelétrico	Atividade emética
EEA	27.100	6,8-7,3	Sim
EEB	28.336	8,6	Sim
EEC	27.496	7,0	Sim
EED	26.900	7,2	Sim
EEE	26.425	8,5	Sim
EEG	27.042	8,4	Sim
EEH	25.145	5,7	Sim
EEI	24.928	8,7	Fraca
EELJ	28.500	8,8	Não determinada
EELK	26.000	7-7,5	Não determinada
EELL	26.000	8,2	Não
EELM	24.800	6,0	Não determinada
EELN	26.100	6,2	Não determinada
EELO	26.700	5,8	Não determinada
EELP	27.000	6,6	Não determinada
EELQ	25.000	6,7	Não
EER	27.000	8,6	Sim
EELU	27.000	6,2	Não determinada

Fonte: adaptado de THOMAS *et al.* (2007).

As novas enterotoxinas localizadas no cluster *egc* apresentam atividade superantigênica e as EELK, EELL, EELM, EELN, EELO e EELP possuem importante função tanto nas intoxicações alimentares como nas síndromes clínicas (CHIANG *et al.*, 2008). Para essas novas enterotoxinas, foi observada

homologia variável: EEG possui 37 a 40% de homologia com EEB e EEC; e EEI 26 a 28% de homologia com EEA, EED e EEE (DINGES *et al.*, 2000).

As EE e a TSST-1 compartilham homologia em sua sequência de aminoácidos primários, e com base nesta homologia essas exotoxinas podem ser divididas em quatro grupos, o quarto formado apenas pela TSST-1 (Figura 1).



Fonte: Thomas *et al.* (2007).

Figura 1 – Divisão das enterotoxinas em quatro diferentes grupos.

2.7 Atividade superantigênica das enterotoxinas estafilocócicas

As proteínas extrabacterianas que contribuem para a virulência de *Staphylococcus* podem ser divididas em cinco grupos: proteínas de adesão, superantígenos, toxinas formadoras de poros, proteases e proteínas com atividade ADP ribosil. Podem ser consideradas também como participantes desse grupo, as hemolisinas, as leucocidinas, as toxinas exfoliativas e as toxinas superanti-gênicas (BRONNER *et al.*, 2004; ZECCONI *et al.*, 2006; TAPONEM; PYORALA, 2009).

Os superantígenos estafilocócicos são descritos como um grupo de proteínas pirogênicas de alto peso molecular e que possuem em comum a capacidade de ativar os linfócitos T CD4 e CD8. Vários desses superantígenos vêm sendo descritos, dentre eles as enterotoxinas, a toxina associada à síndrome do choque tóxico, as leucotoxinas e a proteína A, sendo os dois primeiros os

mais bem caracterizados quanto à sua capacidade em causar doenças e suas características estruturais e imunológicas (FRASER *et al.*, 2000; D'SOUZA *et al.*, 2003; PETERSON *et al.*, 2004).

As enterotoxinas, assim como qualquer outro superantígeno, afetam uma variedade de células inflamatórias e do sistema imune, como, macrófagos, eosinófilos, células epiteliais, além dos linfócitos T e B. Em vários estudos foi demonstrada a capacidade dessas moléculas em promover a proliferação de células T, causarem apoptose e produzirem citocinas (BACHERT *et al.*, 2002; ALOUF; MULLER-ALOUF, 2003).

A liberação de grandes quantidades de interleucina 2 (IL-2), interfeon γ (IF- γ) e fator de necrose tumoral (TNF) por esses superantígenos levou ao uso de algumas enterotoxinas como agentes terapêuticos no tratamento de neoplasias. Seu uso torna-se, porém, restrito pelo fato de provocar êmese, sendo essa atividade em decorrência da estrutura circular formada por meio de pontes dissulfídicas (JOHNSON; MAGAZINE, 1988; KRAKAUER, 1999; BOYNUKARA *et al.*, 2008; HUI *et al.*, 2008). Outro fator que parece contribuir para esta atividade emética é a ativação de mastócitos e a liberação de leucotrienos (KRAKAUER, 1999; STILES; KRAKAUER, 2005).

A febre observada com a ingestão de alimentos contaminados com enterotoxinas resulta da liberação massiva de interleucina-1 (IL-1) e TNF liberados pelos macrófagos. Essas citocinas são pirógenos endógenos e induzem febre por ação no hipotálamo (KRAKAUER, 1999). Os efeitos observados pela ação das enterotoxinas, no entanto, dependem não apenas da colonização bacteriana, uma vez que nem todas as espécies de *Staphylococcus* são produtoras de enterotoxinas, mas também do hospedeiro, do microrganismo e das condições ambientais (ULRICH, 2000).

Dentre as enterotoxinas estafilocócicas, Dauwalder *et al.* (2009), observaram que as enterotoxinas A e G são capazes de induzir a liberação de fator de necrose tumoral em 24 horas. Já Balaban e Rasooly (2000) e Novick *et al.* (2001) afirmaram que a atividade mitogênica das enterotoxinas estafilocócicas depende da indução de interleucinas que estão intimamente envolvidas com o mecanismo de toxicidade dessas toxinas. Além disso, essas enterotoxinas possuem atividade citotóxica em células endoteliais, capazes de causarem coagulação intravascular disseminada e trombocitopenia (NOVICK *et al.*, 2001).

Tem sido atribuída à EEA uma grande afinidade com os receptores de células T. Esta afinidade deve-se, em parte, à associação estável entre a toxina e o MHC (complexo maior de histocompatibilidade), classe II, presente nas células apresentadoras de antígenos, por meio de dois sítios de ligação (D'SOUZA *et al.*, 2003).

Em outros estudos foi observada a correlação entre o aumento das concentrações séricas de IL-1, IL-2, TNF e IF- γ com a presença de enterotoxina B (KRAKAUER, 1999). Além disso, a produção dessas enterotoxinas parece contribuir para a persistência e patogenicidade do microrganismo (BOYNUKARA *et al.*, 2008).

2.8 Intoxicações estafilocócicas

As doenças associadas à ingestão de alimentos contaminados são definidas, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), como doenças de natureza infecciosa ou tóxica causadas por microrganismos e, ou, suas toxinas presentes nos alimentos. Possuem um grande impacto quando envolvem a inocuidade alimentar, os fatores econômicos e a exportação e importação de alimentos entre os países (LE LOIR *et al.*, 2003; GLYNN *et al.*, 2006).

Atualmente, mais de 250 doenças de origem alimentar são descritas como causadas por diferentes patógenos e que ocasionam prejuízos econômicos na ordem de bilhões de dólares (LE LOIR *et al.*, 2003). Nos Estados Unidos, cerca de seis a 80 milhões de pessoas são acometidas por ano, com a ocorrência de óbitos de nove mil pessoas e um gasto de cinco bilhões de dólares. Nesse mesmo país, estima-se que cerca de 25% das doenças veiculadas por alimentos sejam causadas por intoxicações estafilocócicas, e são a segunda causa principal de doenças de origem alimentar (BALABAN; RASOOLY, 2000). Neste caso, toxinas microbianas estão envolvidas, destacando-se as enterotoxinas estafilocócicas. *Staphylococcus* spp. mais predominantemente *S. aureus*, estão mais comumente envolvidos, ou por ser o de maior incidência nos alimentos, ou por ter como habitat mucosas dos hospedeiros humanos e animais (STAMFORD *et al.*, 2006; MORANDI *et al.*, 2007).

Sua capacidade em crescer e produzir toxinas em uma ampla variedade de alimentos é evidenciada pela presença de vários casos envolvendo as

enterotoxinas estafilocócicas. Dentre os alimentos envolvidos destacam-se o leite e a carne e os derivados (CHEN *et al.*, 2004; STILES *et al.*, 2005a; STAMFORD *et al.*, 2006; MORANDI *et al.*, 2007).

A concentração de enterotoxina necessária para causar a doença é muito pequena, sendo a dose para promover vômitos em macacos de cerca de 5 a 20 µg/animal. Além de vômitos, observam-se também náuseas, dores abdominais e diarreia. Esses sinais podem surgir após quatro horas de ingestão e permanecer por até 48 horas. Trata-se de intoxicação não letal, e os casos mais graves envolvem idosos, crianças e imunossuprimidos (BERGDOLL, 1967; BALABAN; RASOOLY, 2000; STILES *et al.*, 2005a).

A severidade da doença depende também do tipo de enterotoxina presente, com variação de acordo com diferentes autores (CARMO *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2004; FUJIKAWA *et al.*, 2006; MORANDI *et al.*, 2007).

Segundo Cremonesi *et al.* (2005), 95% das intoxicações estafilócocicas se devem à presença de enterotoxinas clássicas (EEA – EEE) e 5% a presença das novas enterotoxinas.

Balaban e Rasooly (2000) e Stiles *et al.* (2005b) verificaram a presença da EEA como sendo a mais comum em diversos alimentos analisados. Já Normano *et al.* (2005) verificaram a presença tanto da EEA e da EED, sendo a quantidade de EEA necessária para causar uma intoxicação de, aproximadamente, 100 ng. Chen *et al.* (2004) observaram a predominância dos genes *seg*, *seh* e *sei*, e a não identificação de nenhum gene para as enterotoxinas clássicas em doenças alimentares investigadas.

Em Minas Gerais, Brasil, Carmo *et al.* (2004) detectaram a presença apenas da EEA em um surto que envolveu oito mil pessoas. Neste surto, observou-se predominância de indivíduos acima de 65 anos e crianças menores de cinco anos, observando-se em alguns casos os sinais clínicos de gastroenterite aguda em poucas horas, após o consumo dos alimentos contaminados. Embora as enterotoxinas e seus respectivos genes tenham sido descritos, seu papel nas doenças alimentares ainda não está bem claro para muitas delas.

2.9 Uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de genes de enterotoxinas estafilocócicas

O diagnóstico das intoxicações estafilocócicas é realizado a partir dos sinais clínicos e da presença das enterotoxinas nos alimentos. Além disso, a análise microbiológica do alimento associado a testes bioquímicos para as bactérias isoladas, produção de coagulase, hemólise em ágar sangue ou produção de termonuclease são frequentemente utilizados. No entanto, essas técnicas apresentam desvantagens quando se considera a dinâmica natural das infecções, resíduos de tratamento com antibiótico e alta concentração de leucócitos que inibem o crescimento bacteriano *in vitro* (CREMONESI *et al.*, 2005).

Por isso, técnicas mais rápidas e sensíveis vêm sendo desenvolvidas ao longo dos últimos anos. Dentre essas técnicas destacam-se os testes imunoenzimáticos como o teste de Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) e o teste de aglutinação em látex e mais recentemente as técnicas moleculares (CREMONESI *et al.*, 2005; LONCAREVIC *et al.*, 2005).

Os testes de imunoensaio são os mais utilizados para detectar a presença das enterotoxinas em um alimento. Porém, o fato desses testes detectarem apenas as enterotoxinas clássicas, tem levado ao uso crescente das técnicas moleculares, as quais permitem amplificar genes em estirpes potencialmente enterotoxigênicas (JORGENSEN *et al.*, 2005; NORMANNO *et al.*, 2005; MORANDI *et al.*, 2007; CHIANG *et al.*, 2008).

Assim, as técnicas moleculares, como a técnica de PCR, fundamentadas na detecção do ácido nucleico tem sido bastante útil para a identificação de genes de enterotoxinas estafilocócicas (EEs).

Métodos de PCR baseiam-se na amplificação e detecção de uma sequência de ácidos nucleicos específica para o patógeno de interesse ou mesmo para um gênero bacteriano específico (GLYNN *et al.*, 2006).

O desenvolvimento da PCR na década de 1980 possibilitou a síntese de fragmentos de DNA pelo uso da enzima DNA-polimerase. Esta enzima sintetiza uma sequência complementar de DNA, a partir de um pequeno fragmento, denominado *primer* ligado ao DNA no ponto escolhido para o início da síntese.

O resultado final é a amplificação de uma determinada sequência de DNA com bilhões de cópias (NOVAIS; ALVES, 2004).

O uso do DNA como molécula-alvo para testes moleculares se deve ao fato de se tratar de molécula estável, além de ser isolada de forma relativamente simples de uma variedade de amostras biológicas. Já a molécula de RNA, embora seja uma alternativa para testes envolvendo ácidos nucleicos, trata-se de molécula facilmente degradada, particularmente quando o microrganismo está morto, o que faz com que a manipulação com este alvo seja mais difícil comparado com a molécula de DNA (GLYNN *et al.*, 2006).

O teste de PCR vem sendo descrito em numerosos trabalhos para a identificação de genes de alguns patógenos e das enterotoxinas estafilocócicas em amostras de alimentos (AIKENEDEN *et al.*, 2001; ROSEC; GIGAUD, 2002; BOEREMA *et al.*, 2007; PELES *et al.*, 2007; RALL *et al.*, 2008; BENDAHOU *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2009; ERTAS *et al.*, 2010; RALL *et al.*, 2010). É um teste rápido, que pode ser realizado em horas, com alta sensibilidade e acurácia. Permite detectar não apenas os microrganismos viáveis, mas também aqueles que se encontram injuriados ou mortos após tratamento térmico durante o processamento do alimento. Porém, trata-se de um teste que permite demonstrar a presença de um ou mais genes para as EEs e não a sua expressão (CREMONESI *et al.*, 2005; BOEREMA *et al.*, 2006).

Para a detecção de genes para as enterotoxinas estafilocócicas, um grande número de PCR multiplex vem sendo. Porém, em muitos desses estudos reações distintas têm sido utilizadas para identificar fragmentos desses genes desenvolvidos (ROSEC; GIGAUD, 2002; CREMONESI *et al.*, 2005; ARCURI *et al.*, 2006; ERTAS *et al.*, 2010).

2.10 Hidrofobicidade: fator que influencia a adesão e formação de biofilmes

A formação de biofilmes, em decorrência da adesão microbiana em equipamentos envolvidos com a produção de alimentos, é uma grande preocupação para as indústrias de alimentos e coloca em risco a qualidade do produto (OLIVEIRA *et al.*, 2007; OULAHAL *et al.*, 2008).

Os biofilmes representam uma camada multicelular de bactérias aderidas a uma superfície por uma matriz extracelular formada principalmente de polissacarídeos. Sua formação inclui muitos passos, mas um pré-requisito é a adesão das células microbianas à superfície. As características físico-químicas da superfície da célula bacteriana contribuem no processo de adesão. Esses fatores incluem a hidrofobicidade, presença de polímeros extracelulares e carga superficial bacteriana (AZEVEDO; OLIVEIRA, 2000; OULAHAL *et al.*, 2008).

Além disso, outros mecanismos parecem estar envolvidos com a adesão e formação de biofilmes por *Staphylococcus*, por exemplo, a presença de um operon denominado *ica* e que representa o gene *ica* ADBC. Porém, apenas o fator genético não pode ser avaliado isoladamente, deve-se considerar também os fatores físico-químicos, as características do meio onde a bactéria se encontra, como pH, temperatura e presença de matéria orgânica, a fase de crescimento do microrganismo, o tempo de exposição e a concentração de microrganismos (POMPERMAYER; GAYLARDE, 2000; CHAVES, 2004; HERRERA *et al.*, 2007; RODE *et al.*, 2007). Dentre todos esses fatores, a hidrofobicidade da superfície bacteriana é a análise físico-química mais fácil de realizar e permite avaliar o grau de interação entre superfície e meio aquoso.

Segundo van Oss e Giese (1995), a hidrofobicidade é expressa como energia hidrofóbica de atração e estabelece o grau de interação entre as moléculas de um material imerso em água. A hidrofobicidade é definida em termos de energia livre de interação entre as moléculas das superfícies imersas em água (ΔG_{sas}^{TOT}). Quando a energia livre global de interação entre as moléculas imersas em água é atrativa, ou seja, o valor de ΔG_{sas}^{TOT} é negativo, significa que as moléculas do sólido têm maior afinidade entre si do que pela água. Assim, uma superfície hidrofóbica apresenta valores de ΔG_{sas}^{TOT} negativos. Quando a energia livre global de interação entre as moléculas de um sólido imerso em água é suficientemente repulsiva, ou seja, o valor de ΔG_{sas}^{TOT} é positivo, a superfície é considerada hidrofílica.

Uma superfície que não possui grupos polares ou iônicos ou locais de ligação de hidrogênio, e não tem afinidade pela água é considerada hidrofóbica. Para que uma adesão entre duas superfícies ocorra em meio aquoso, é preciso que o filme de água que as separa seja removido e a hidrofobicidade

contribui para essa remoção. A hidrofobicidade é considerada de forma qualitativa, significando que a superfície não pode ser molhada pela água.

van Oss e Giese (1995) definiram um critério quantitativo que permite avaliar a hidrofobicidade de minerais, a partir da energia de coesão entre as moléculas da superfície imersa em água. Dentre os vários métodos usados para determinar a hidrofobicidade, incluem-se a adesão microbiana a hidrocarbonetos, a cromatografia de interação hidrofóbica, a adesão a superfícies hidrofóbicas, agregação por adição de sais, partição hidrofóbica num sistema aquoso bifásico e a medida do ângulo de contato. No entanto, o único método que permite determinar um valor quantitativo da hidrofobicidade é a medida do ângulo de contato, pois os demais fornecem apenas um valor relativo para comparação entre microrganismos ou superfícies (CHAVES, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do Leite da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)-Gado de Leite, Juiz de Fora-MG e no Laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

3.1 Origem dos isolados

Foi utilizado neste um total de 96 isolados de *S. aureus* de leite cru refrigerado e 168 *Staphylococcus* spp. de leite de vacas com mastite, sendo 104 *S. aureus*, 47 *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e 17 *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), pertencentes ao Banco de Culturas do Laboratório de Micro-biologia do Leite da Embrapa Gado de Leite. Os isolados bacterianos foram obtidos de diferentes rebanhos, localizados nos Estados de Minas Gerais e do Rio de Janeiro. A seleção das estirpes, oriundas de leite de vacas com mastite, foi realizada de forma a contemplar entre dois e 20 isolados por rebanho, perfazendo um total de 46 propriedades. Já as estirpes de leite cru refrigerado foram isoladas de leite armazenado em tanques refrigerados individuais selecionando-se entre duas e nove estirpes por tanque, totalizando 22 propriedades.

3.2 Caracterização fenotípica dos isolados

A caracterização em *Staphylococcus* spp. ocorreu conforme suas características morfológicas e bioquímicas (ROBERSON *et al.*, 1998; MARSHALL, 1992). Foram classificados como *S. aureus* os microrganismos que se apresentaram na forma de cocos, reação positiva na coloração de Gram, produção de catalase, acetoína e produção de coagulase em plasma de coelho. Estirpes com essas mesmas características, porém negativas para a produção de acetoína, foram caracterizadas como *Staphylococcus* coagulase positiva e aquelas que não apresentaram produção de coagulase e nem de acetoína classificadas como *Staphylococcus* coagulase negativa.

3.3 Recuperação das culturas bacterianas do estoque

As amostras bacterianas da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Leite eram mantidas em frascos pequenos, contendo 1,0 mL de meio à base de leite desnatado, com 10% de glicerol (BRASIL, 2000). As culturas-estoque estavam estocadas entre -20 e -80 °C, e identificadas de acordo com a ordem de entrada no laboratório. A recuperação das estirpes selecionadas para todas as análises foi realizada em tubos com 3,0 mL de caldo infusão de cérebro e coração (caldo BHI) (DIFCO), com incubação por 24 horas, a 35 °C. Após essa recuperação, as bactérias foram isoladas em ágar infusão de cérebro e coração (ágar BHI) (DIFCO), pela técnica de semeadura em estrias por esgotamento, de modo a garantir a obtenção de colônias puras. Sempre que necessário as bactérias eram reinoculadas e reincubadas às mesmas condições descritas acima.

3.4 Caracterização morfológica em Ágar Baird Parker e avaliação da produção de hemolisina em ágar sangue

Uma caracterização quanto ao aspecto das colônias em um meio seletivo e diferencial e quanto à produção de hemolisinas não havia ainda sido realizada, por isso, neste trabalho foi proposta a sua realização. Para isso, as bactérias recuperadas do estoque (n = 237) foram reisoladas em meio de

cultura seletivo e diferencial para *Staphylococcus* – Agar Baird Parker (BP) (DIFCO), para análise morfológica das colônias e, simultaneamente, em ágar sangue para avaliar a possível produção de hemolisinas.

Na análise morfológica em BP observaram-se as características das colônias quanto ao seu tamanho, sua coloração, seu brilho e suas atividades lipolítica e proteolítica. Para avaliar a produção de hemolisinas, considerou-se a produção de β -hemolisina e de α -hemolisina, onde se observou, respectivamente, uma halo clara completa e um halo claro parcial ao redor das colônias isoladas em ágar sangue.

3.5 Análise bioquímica pelo sistema ID 32 Staph (*bioMerieux*[®])

Utilizando-se o sistema ID 32 Staph (*bioMerieux*, França), avaliaram-se 32 isolados de *Staphylococcus*, sendo 22 *S. aureus*, seis SCN e quatro SCP. As análises foram conduzidas de acordo com as instruções do fabricante. As leituras das provas bioquímicas das galerias ID 32 Staph (*bioMerieux*[®]) foram reveladas após 24 horas de incubação, a 35 °C. Este método é um sistema padronizado para a identificação dos gêneros *Micrococcus*, *Staphylococcus* e gêneros relacionados. Compreende 26 testes bioquímicos miniaturizados e uma base de dados específica. Suas interpretações são realizadas pelo *software* em sistema automatizado.

3.6 Análises moleculares

3.6.1 Genes pesquisados

As análises moleculares incluíram a avaliação da presença de genes para as seguintes exotoxinas: enterotoxina A (EEA), enterotoxina B (EEB), enterotoxina C (EEC), enterotoxina D (EED), enterotoxina E (EEE), enterotoxina G (EEG), enterotoxina H (EEH), enterotoxina I (EEI), enterotoxina J (EELJ), enterotoxina L (EELL) e para a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), além de avaliar a presença para *femA*, de maneira a confirmar os isolados caracterizados bioquimicamente como *S. aureus*.

3.6.2 Extração e quantificação do DNA molecular

Após a recuperação dos isolados, foi realizada a extração do DNA extraído, pela técnica descrita por Rosec; Gigaud (2002), com modificações. Essa técnica consiste na extração do DNA a partir de culturas bacterianas, inoculadas em 3,0 mL de caldo BHI e incubação a 35 °C por 24 horas. Após crescimento, 1,0 mL da cultura é centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante formado foi então descartado e o sedimento lavado com 500 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM), sendo a suspensão em seguida homogeneizada no vortex. Uma nova centrifugação foi feita nas mesmas condições e o sobrenadante descartado. O sedimento formado foi ressuspenso em 200 µL de TE agitando-o no vortex. À suspensão formada acrescentou-se 15 µL de lysostafina (1 mg/mL), seguindo-se sua incubação a 37 °C. Após 30 minutos de incubação, adicionou-se 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) e realizou-se uma nova incubação a 60 °C por 20 minutos. Em seguida, procedeu-se o aquecimento do material a 100 °C por 10 minutos. Após dois minutos de centrifugação a 12.000 x g, o sobrenadante foi transferido para um tubo identificado e estocado a -20 °C.

O DNA extraído e mantido armazenado a -20 °C foi quantificado em espectrofotômetro (GeneQuant Pro, Amersham Biosciences) e as concentrações ajustadas em 100 ng/µL para a realização da técnica de PCR.

3.6.3 Amplificação

As reações foram conduzidas como descrito por Arcuri *et al.* (2006): para o gene *femA*, foram utilizados os *primers* descritos por Mehrotra *et al.* (2000); para o gene *sell*, os *primers* descritos por Cremonesi *et al.* (2005), para os demais genes (*sea* a *sei*) foram utilizados aqueles descritos por Rosec e Giraud (2002) e para o *tst-1* utilizaram-se os *primers* descritos por Schmitz *et al.* (1998) (Tabela 2). Cada amplificação foi conduzida em um volume de 50 µl contendo 1 x PCR *buffer*, 2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 2,0 U de enzima Ampliteq DNA polimerase, 40 pmol de cada *primer* para *femA* e *seb*, 20 pmol de cada *primer* para os demais genes (*sea*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *sell* e *tst-1*), 100 ng de DNA bacteriano e água MilliQ para completar o

Tabela 2 – *Primers* para detecção dos genes que codificam enterotoxinas estafilocócicas

Genes	Primers	Sequências (5' – 3')	Produtos (pb)	Tm
<i>sea</i>	ESA1	ACG ATC AAT TTT TAC AGC	544	46,9 °C ^{*1}
	ESA2	TGC ATG TTT TCA GAG TTA ATC		52 °C
<i>seb</i>	ESB1	GAA TGA TAT TAA TTC GCA TC	416	49,1 °C ^{*1}
	ESB2	TCT TTG TCG TAA GAT AAA CTT C		52,8 °C
<i>sec</i>	ESC1	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	257	49,1 °C ^{*1}
	ESC2	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CCA		50,1 °C
<i>sed</i>	ESD1	TTA CTA GTT TGG TAA TAT CTC CTT	334	54,2 °C ^{*1}
	ESD2	CCA CCA TAA CAA TTA ATG C		50,2 °C
<i>see</i>	ESE1	ATA GAT AAA GTT AAA ACA AGC AA	170	50 °C ^{*1}
	ESE2	TAA CTT ACC GTG GAC CC		52,8 °C
<i>seg</i>	ESG1	ACG TCT CCA CCT GTT GAA GG	400	59,4 °C ^{*1}
	ESG2	TGA GCC AGT GTC TTG CTT TG		57,3 °C
<i>seh</i>	ESH1	TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG	357	55,9 °C ^{*1}
	ESH2	TAG CAC CAA TCA CCC TTT CC		57,3 °C
<i>sei</i>	ESI1	TGG AAC AGG ACA AGC TGA AA	467	55,3 °C ^{*1}
	ESI2	TAA AGT GGC CCC TCC ATA CA		57,3 °C
<i>sej</i>	ESJ1	CAGCGATAGCAAAAATGAAAC A	426	54,7 °C ^{*1}
	ESJ2	TCT AGC GGA ACA ACA GTT CTG A		58,4 °C
<i>sell</i>	SEL-F	CAC CAG AAT CAC ACC GCT TA	240	59,7 °C ^{*3}
	SEL-R	CTG TTT GAT GCT TGC CAT TG		60,2 °C ^{*4}
<i>tst-1</i>	TSST-1	AAGCCCTTTGTTGCTTGCGAC		
	TSST-2	AGCAGGGCTATAATAAGGACTC		
<i>femA</i>	FEMA1	AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG	132	51,1 °C ^{*2}
	FEMA2	GAT AAA GAA GAAACC AGC AG		53,2 °C

*¹ Rosec e Giraud (2002); *² Mehrotra *et al.* (2000); *³ Cremonesi *et al.* (2005); *⁴ Schmitz *et al.* (1998).

volume de 50 µl. A amplificação do DNA foi feita utilizando-se sete reações, cada uma com dois pares de *primers* (*seg* e *femA*, *seh* e *sei*, *seb* e *sell*, *sea* e *sed*, *sec* e *see*), com exceção da *sej* e da toxina da síndrome do choque tóxico, que foram analisadas isoladamente.

Todas as amplificações foram feitas em termociclador GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems), programado para um ciclo inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos (desnaturação a 94 °C/30seg. - anelamento a 57 °C/30 s - extensão a 72 °C/30seg.), com o término da reação a 72 °C por 10 minutos.

Como controles positivos para as reações de PCR foram utilizadas estirpes-padrão, com genótipo conhecido (Tabela 3), e como controle negativo utilizou-se água bidestilada.

Tabela 3 – Identificação das estirpes utilizadas como controle e seus respectivos genótipos

Controles Positivos	Genótipos conhecidos
<i>S. aureus</i> ATCC 19095	<i>sec, seh, seg, sei e sell</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 23235	<i>sed, seg, sei, selj</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	<i>sea</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	<i>seb</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 27664	<i>see</i>
<i>S. aureus</i> 95-4776B	<i>sea</i>
<i>S. aureus</i> 91-2415D	<i>seb</i>
<i>S. aureus</i> 92-2221	<i>sed, selj</i>
<i>S. aureus</i> 95-2806	<i>seh</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 51651	<i>tst-1</i>

Os produtos resultantes da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,8%), após coloração com brometo de etídio. Os geis foram fotografados sob luz ultravioleta em fotodocumentador Eagle Eye Stratagene Co. (Figura 2).



Figura 2 – Fotodocumentador Eagle Eye Stratagene Co. onde os geis foram fotografados.

3.7 Hidrofobicidade da superfície dos isolados

3.7.1 Seleção das estirpes avaliadas

Dentre as 264 estirpes de *Staphylococcus* spp. avaliadas para a presença de genes de enterotoxinas (EE) e do *tst-1*, 30 foram analisadas quanto à sua hidrofobicidade. Para isso, selecionaram-se estirpes com ausência ou presença de genes para as exotoxinas. A escolha dos isolados com presença para genes de exotoxinas foi feita de maneira a abranger todas as diferentes exotoxinas presentes, o que resultou na seleção de 17 isolados de leite de tanque refrigerado e 13 de leite de vacas com mastite. Além disso, o número de rebanhos contemplados foi de 27.

3.7.2 Preparo das suspensões

Para cada uma das 30 estirpes escolhidas, preparou-se suspensão de células contendo $1,0 \times 10^7$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL, as quais foram produzidas em duas repicagens consecutivas em caldo BHI (Merck), com incubação a 32 °C por 24 horas. O número de microrganismos nas suspensões foi determinado pela técnica de espalhamento em superfície, em Agar-padrão para contagem (PCA) (Merck), seguido de incubação por 32 °C por 24 horas.

3.7.3 Medição do ângulo de contato

A medição do ângulo de contato entre a superfície bacteriana e três líquidos com diferentes polaridades (água, formamida e α -bromonaftaleno) foi realizada sobre uma camada de células vegetativas usando-se o aparelho Goniômetro (Kruss, Germany), conforme metodologia proposta por Busscher *et al.* (1984).

Após a ativação das estirpes selecionadas em caldo BHI de forma a obter $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, 30 mL dessa suspensão foram centrifugados a 12.000 g por 10 minutos, sendo em seguida lavada por três vezes em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M. A massa celular foi ressuspendida no mesmo

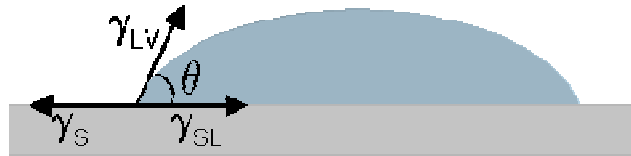
tampão, sendo depositada sobre um filtro de membrana de acetato celulose de 0,45 µm de poro e 47 mm de diâmetro, usando-se uma bomba de vácuo para filtração. Foram adicionados 30 mL de água ultrapura no momento da filtração. Para padronizar o conteúdo de umidade, os filtros foram transferidos para placas de Petri contendo 1% de ágar (p/v) e 10% de glicerol (v/v). As Membranas foram cortadas em três partes sendo cada usada para medição do ângulo de contato com cada líquido diferente.

3.7.4 Análises dos resultados

Os componentes da tensão interfacial da superfície bacteriana nas condições avaliadas foram determinados pela seguinte equação (Equação 1):

$$(1 + \cos \theta) \gamma_1 = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + \sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+}) \quad \text{Equação 1}$$

Para determinar as três componentes da tensão interfacial da superfície bacteriana foi necessário determinar o ângulo de contato (θ), formado entre a superfície bacteriana, e cada um dos três líquidos de polaridades diferentes (Figura 3).



Fonte: van Loosdrecht *et al.* (1987).

Figura 3 – Ângulo de contato (θ) entre uma gota líquida e uma superfície plana e horizontal. As tensões interfaciais da superfície do sólido (γ_s), do líquido em equilíbrio com o vapor (γ_{LV}) e superfície/líquido (γ_{sl}).

Com os valores contidos na Tabela 4 aplicando-se a equação 1 para cada um dos líquidos usados chega-se ao seguinte sistema de equações:

$$a) \gamma_s^{LW} = 11,1(1 + \cos \theta_B)^2 \quad \text{Equação 2}$$

$$b) 5,049\sqrt{\gamma_s^+} + 5,049\sqrt{\gamma_s^-} = 36,4(1 + \cos \theta_W) - 15,55(1 + \cos \theta_B) \quad \text{Equação 3}$$

$$c) 6,293\sqrt{\gamma_s^+} + 1,510\sqrt{\gamma_s^-} = 29(1 + \cos \theta_F) - 20,806(1 + \cos \theta_B) \quad \text{Equação 4}$$

Tabela 4 – Componentes da tensão de interfacial de líquidos a 25 °C

Líquido	Tensão Interfacial (mJ/m ²)			
	γ_i^{Tot}	γ_i^{LW}	γ_i^+	γ_i^-
α -Bromonaftaleno	44,4	44,4	0,0	0,0
Água	72,8	21,8	25,5	25,5
Formamida	58,0	39,0	2,28	39,6

Pela resolução destas três últimas equações (2, 3 e 4), obtém-se as três componentes da tensão interfacial da superfície, γ_s^{LW} , γ_s^+ e γ_s^- , que permitem calcular a tensão interfacial global de uma superfície, γ_s^{TOT} :

$$\gamma_s^{\text{TOT}} = \gamma_s^{\text{LW}} + \gamma_s^{\text{AB}} \quad \text{Equação 5}$$

$$\gamma_s^{\text{AB}} = 2 \times \sqrt{\gamma_s^+ \times \gamma_s^-} \quad \text{Equação 6}$$

A energia livre global de interação $\Delta G_{\text{sws}}^{\text{TOT}}$ entre as moléculas da superfície bacteriana imersa em água (w) é calculada pelo somatório das componentes apolar e polar da energia livre de interação, $\Delta G_{\text{sws}}^{\text{LW}}$ e $\Delta G_{\text{sws}}^{\text{AB}}$ respectivamente.

$$\Delta G_{\text{sws}}^{\text{TOT}} = \Delta G_{\text{sws}}^{\text{TLW}} + \Delta G_{\text{sws}}^{\text{AB}} \quad \text{Equação 7}$$

$$\Delta G_{\text{sws}}^{\text{LW}} = -2 \times \left(\sqrt{\gamma_s^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_w^{\text{LW}}} \right)^2 \quad \text{Equação 8}$$

$$\Delta G_{\text{sws}}^{\text{AB}} = -4 \times \left[\left(\sqrt{\gamma_s^+} \times \gamma_s^- \right) + \left(\sqrt{\gamma_w^+} \times \gamma_w^- \right) + \left(\sqrt{\gamma_s^+} \times \gamma_w^- \right) + \left(\sqrt{\gamma_w^+} \times \gamma_s^- \right) \right] \quad \text{Equação 9}$$

Os valores dos componentes da tensão interfacial da água (γ_w^{LW} , γ_w^+ e γ_w^-) encontram-se na Tabela 4.

Quando o $\Delta G_{\text{sws}}^{\text{TOT}}$ foi negativo a superfície da bactéria foi considerada hidrofóbica ($\Delta G_{\text{sws}}^{\text{TOT}} < 0$). Ao contrário, quando o $\Delta G_{\text{sws}}^{\text{TOT}}$ foi positivo a superfície foi considerada hidrofílica ($\Delta G_{\text{sws}}^{\text{TOT}} > 0$).

3.8 Análises estatísticas

Os dados foram analisados de forma descritiva utilizando-se o sistema de análises estatísticas para Windows SAS (SAS, 2001). As variáveis avaliadas

foram as características morfológicas das colônias em ágar BP, produção de hemolisinas em ágar sangue, identificação bacteriana pelo sistema ID32 Staph (*bioMerieux*[®]), presença de genes para as exotoxinas e hidrofobicidade dos isolados. As taxas foram calculadas pelo procedimento FREQ do SAS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pela análise de detecção do gene *femA* verificou-se que o número de *S. aureus*, SCN e SCP isolados de leite de vacas com mastite foi de 125, 33 e 10, respectivamente. Isto porque os resultados indicaram que 14 SCN e sete SCP isolados de leite de vacas com mastite eram *S. aureus* pela presença do gene *femA*, que é específico para essa espécie. Na Figura 4, observa-se a presença de banda específica para o gene *femA* em alguns isolados de *S. aureus*. A presença do gene é reconhecida pelo número de pares de bases (pb) que compõem o gene. Dessa forma, observamos a presença de 125 pb que é característico para o *femA*.

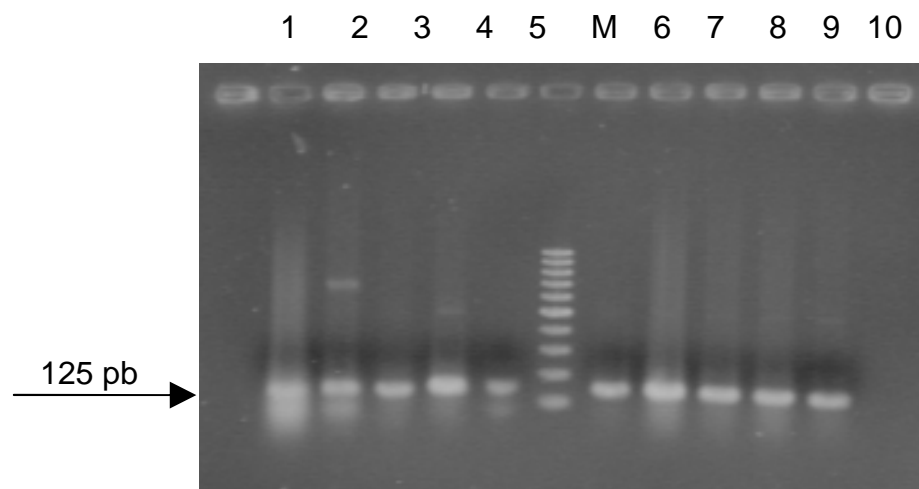


Figura 4 – Detecção do gene *femA* em *Staphylococcus* spp. 1 a 4 e 7 a 10 = isolados *femA* positivos; 5 e 6: controle positivo (*S. aureus* ATCC 19095); e M marcador de peso molecular 100 pb.

4.1 Características morfológicas das colônias em ágar Baird-Parker e produção de hemolisinas em ágar sangue

As colônias típicas de *S. aureus* apresentam-se pretas, brilhantes, com diâmetros inferiores à 1,5 mm, delimitadas e com dois halos ao seu redor. Essas características se devem à capacidade do microrganismo em reduzir telurito de potássio em telureto de potássio e produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas. Considerando esses aspectos associado ao fato de que o ágar BP possui fatores seletivos para essa espécie bacteriana, além de conter os agentes diferenciais telurito de potássio e gema de ovo, a enumeração de *S. aureus* isolados de leite, usando esse meio de cultura, é considerada uma metodologia padrão (BAIRD-PARKER, 1962).

No presente trabalho, o número de estirpes que apresentou as características acima descritas está demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5 – Características morfológicas apresentadas por diferentes estirpes de *Staphylococcus* spp. em ágar Baird-Parker

	Características coloniais								
	Cor			Tamanho		Brilho		Presença de Dois Halos	
	Preta	Cinza	Verde	<1,5 mm	>1,5 mm	Sim	Não	Sim	Não
Número de estirpes	169	60	8	205	32	233	04	39	198

Dentre os 237 isolados estudados (95 *S. aureus* de LCR e 108 *S. aureus*, 24 SCN e 10 SCP de leite de vacas com mastite), quanto às características morfológicas, observou-se que 205 (86,5%) apresentaram colônias com medidas típicas de *S. aureus* (< 1,5 mm). Desses, dez isolados (4,9%) eram SCP e 14 (6,8%) SCN. Em relação ao aspecto brilhante, 98,3% (233/237) apresentaram brilho típico, incluindo-se oito (3,3%) SCP e 22 (9,3%) SCN.

A presença de halos em BP indicadores da produção de lecitinase e atividade proteolítica ocorreu em apenas 16,4% (39/237) dos isolados. Embora seja considerada típica das colônias de *S. aureus*, essa característica foi verificada para um isolado (0,42%) de SCN. A coloração preta das colônias deve-se à redução do telurito de potássio em telureto de potássio. Essa

capacidade foi observada em 71,3% (169/237) dos isolados, sendo 96,4% (163/169) *S. aureus*, 4,7% (8/169) SCP e 4,7% (8/169) SCN. Os resultados referentes às características das colônias em ágar BP demonstraram que embora bioquimicamente caracterizados como *S. aureus* (coloração de Gram, produção de catalase, acetoina e coagulase, e confirmados pela presença do gene *femA*), 165 isolados (81,3%) apresentaram pelo menos uma característica não típica, enquanto 18,7% (38/203) formaram colônias típicas. Resultados semelhantes foram relatados por Santana *et al.* (2006), os quais verificaram que 24,4% das estirpes de *Staphylococcus* isoladas de leite, além das características morfológicas típicas em ágar BP apresentadas, produziram também a enzima coagulase. Por outro lado, Silva *et al.* (2000), Gomanó *et al.* (2009) e Viçosa *et al.* (2010) observaram que *S. aureus* isolados de leite formaram colônias típicas em 41, 53,8 e 59,3% dos casos, respectivamente. Nenhum isolado de SCP apresentou formação de colônias típicas em ágar BP. Este fato poderia ser em decorrência do alimento de origem, uma vez que Capita *et al.* (2001) verificaram uma maior correlação para SCP em vegetais e carne de frango.

Considerando-se que todos os isolados haviam sido submetidos a provas bioquímicas prévias e que dentre essas provas incluiu-se o teste de produção de coagulase, uma correlação entre morfologia típica em ágar BP e produção de coagulase foi realizada. Entre as 213 estirpes de *Staphylococcus* produtoras de coagulase, observou-se que 38 (17,8%) eram típicas em BP e 175 (82,1%) atípicas. Já para *Staphylococcus* não produtores de coagulase, apenas uma (4,1%) das 24 estirpes testadas apresentou características típicas em ágar BP.

Dentre as 38 estirpes coagulase positivas típicas em BP, 25 (65,8%) eram *S. aureus* isolados de leite de tanque e 13 (34,2 %) isolados de leite de vacas com mastite, não sendo observada característica típica para nenhum isolado SCP. Uma vez que a produção de coagulase é oficialmente considerada como parâmetro de segurança microbiológico de *Staphylococcus* em alimentos, o fato de apenas 17,8% das estirpes produtoras de coagulase apresentarem-se típicas em ágar BP sugere a necessidade de considerar colônias atípicas como estirpes potencialmente associadas a surtos de intoxicação alimentar. Isso porque existe correlação entre a capacidade de

microrganismo de produzir coagulase e sintetizar enterotoxina. Além disso, a baixa porcentagem de isolados típicos em BP implica no fato de que essa característica não é um indicador confiável para a identificação de estirpes de *S. aureus* isolados de leite.

Quanto à produção de hemolisinas, 64,5% (153/237) dos isolados produziram hemólise em ágar sangue. Destes, três eram *Staphylococcus* coagulase negativa (2,0%) e quatro *Staphylococcus* coagulase positiva (2,6%). Os demais (n = 146) foram produzidos por *S. aureus* (95,4%), sendo 78 (53,4%) isolados de leite de vacas com mastite e 68 (46,5%) de leite de tanque refrigerado. Embora *S. aureus* seja caracterizado como microrganismo predominantemente hemolítico e que segundo Boerlin *et al.* (2003), a produção de coagulase e hemólise represente um ótimo critério para a identificação de *S. aureus*, nem todos os isolados identificados molecularmente pela presença de gene *femA* como *S. aureus* produziram hemolisina. Dentre as 203 estirpes de *S. aureus* avaliadas, 146 (71,9%) foram hemolíticas em ágar sangue. A alta porcentagem de *Staphylococcus* hemolítico encontrado nesse trabalho assemelha-se a de outros estudos. Morandi *et al.* (2010) detectaram produção de hemólise em todos *Staphylococcus* isolados de leite, e observaram a produção de β -hemólise em 54% das amostras, α -hemólise em 40% e α/β -hemólise em 6% dos isolados. Pereira *et al.* (2009) encontraram produção de hemólise em 89% dos isolados de alimentos diversos, sendo observado resultados semelhantes por El Jakee *et al.* (2008). Por outro lado, Salasia *et al.* (2004) encontraram baixa porcentagem (28,5%) de *S. aureus* hemolíticos em isolados de mastite bovina.

4.2 Análise bioquímica pelo sistema ID 32 Staph (*bioMerieux*[®])

Dentre as 32 estirpes avaliadas por meio do sistema ID 32 Staph (*bioMerieux*[®]) não foi possível identificar corretamente 15,6% (5/32) das amostras (Tabela 6). Desses, dois foram confirmados por meio da detecção do gene *femA* como *S. aureus*, sendo classificado pelo sistema ID 32 Staph (*bioMerieux*[®]) um como *Staphylococcus crapaie* e o outro como *Staphylococcus chromogenes*. Além disso, em outros dois isolados classificados como *S. aureus* pelo sistema, não se observou a presença do gene *femA* para

Tabela 6 – Identificação dos isolados utilizando-se o sistema ID 32 Staph (*bioMerieux*[®])

Amostras	femA	Sistema ID 32 Staph (<i>bioMerieux</i>[®])	Probabilidade (%)
<i>S. aureus</i> (4712)	+	<i>S. aureus</i>	99,8
<i>S. aureus</i> (4752)	+	<i>S. aureus</i>	97,6
<i>S. aureus</i> (4927)	+	<i>S. aureus</i>	99,1
<i>S. aureus</i> (5229)	+	<i>S. aureus</i>	99,8
<i>S. aureus</i> (5278)	+	<i>S. aureus</i>	98,6
<i>S. aureus</i> (5279)	+	<i>S. aureus</i>	99,8
<i>S. aureus</i> (7730)	+	<i>S. chromogenes</i>	97,7
<i>S. aureus</i> (7734)	+	<i>S. aureus</i>	99,9
<i>S. aureus</i> (7736)	+	<i>S. aureus</i>	99,9
<i>S. aureus</i> (7914)	+	<i>S. aureus</i>	99,8
<i>S. aureus</i> (2014)	+	<i>S. aureus</i>	99,9
<i>S. aureus</i> (2242)	+	<i>S. aureus</i>	99,9
<i>S. aureus</i> (2332)	+	<i>S. aureus</i>	99,8
<i>S. aureus</i> (3006)	+	<i>S. aureus</i>	99,8
<i>S. aureus</i> (3007)	+	<i>S. aureus</i>	99,8
<i>S. aureus</i> (5481)	+	<i>S. crapaе</i>	99,5
<i>S. aureus</i> (5482)	+	<i>S. aureus</i>	81,7
<i>S. aureus</i> (5560)	+	<i>S. aureus</i>	-
<i>S. aureus</i> (5561)	+	<i>S. aureus</i>	99,5
<i>S. aureus</i> (5595)	+	<i>S. aureus</i>	99,5
<i>S. aureus</i> (5607)	+	<i>S. aureus</i>	99,5
<i>S. aureus</i> (4195)	+	<i>S. aureus</i>	99,7
SCN (2482)	-	<i>S. chromogenes</i>	36,2
SCN (2666)	-	<i>S. chromogenes</i>	99,3
SCN (2718)	-	<i>S. chromogenes</i>	99,1
SCN (2720)	-	<i>S. chromogenes</i>	-
SCN (4478)	-	<i>S. chromogenes</i>	95,3
SCN (5471)	-	<i>S. intermedius</i>	99,7
SCP (5157)	-	<i>S. hyicus</i>	87,9
SCP (5590)	-	<i>S. aureus</i>	-
SCP (5933)	-	<i>S. aureus</i>	98,7
SCP (6883)	-	<i>S. chromogeness</i>	95,6

nenhum deles. Em outro isolado, obteve-se identificação diferente da obtida em provas bioquímicas tradicionais. Nessas, o microrganismo foi produtor da enzima coagulase, enquanto para o sistema o mesmo microrganismo foi identificado como *S. chromogenes*, espécie não produtora de coagulase.

Embora nem todos os isolados tenham obtido a mesma identificação recebida pelos métodos tradicionais e moleculares, verificou-se alta probabilidade de identificação (> 80%) para a maioria das amostras (87,5%), baixa probabilidade (< 80%) para uma amostra (3,1%), não sendo observado o cálculo de probabilidade para três amostras (9,4%). Tem se notado em alguns estudos, uma alta correlação entre provas bioquímicas tradicionais e sistemas rápidos tipo ID 32 Staph e API para a identificação de *S. aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *S. chromogenes*, *S. caprae*, *S. epidermidis* e *S. xylosus* (MATTHEWS *et al.*, 1990; SAMPIMON *et al.*, 2009). No entanto, o fato de não ter sido realizada, no presente trabalho, uma identificação para espécie em SCN e SCP, por meio de provas bioquímicas tradicionais e, ou, moleculares, sugere-se que a eficiência do sistema ID 32 Staph possa ser menor. Dessa forma, alguns autores, têm sugerido o uso de técnicas moleculares para confirmação de resultados obtidos por meio de sistemas rápidos, principalmente quando o resultado apresenta baixa probabilidade de identificação (RENNEBERG *et al.*, 1995; WIESER; BUSSE, 2000).

Quanto ao fato de duas amostras coagulase negativas apresentarem o gene *femA* isto também já foi verificado por Veras *et al.* (2008) e pode ser justificado pelo teste de coagulase, embora específico e sensível, estar sujeito a variações das amostras ou não expressão gênica.

4.3 Detecção de gene para a toxina da síndrome do choque tóxico (*tst-1*)

O primeiro relato da produção da TSST-1 produzida por *Staphylococcus* de origem animal foi feito por Jones e Wieneke (1986). Outros estudos mais recentes, realizados com *S. aureus*, isolados de casos clínicos e subclínicos de mastite bovina, demonstraram que entre 20% e 77% dos isolados produziram a toxina (KENNY *et al.*, 1993; MATSUNAGA *et al.*, 1993; ICHIKAWA *et al.*, 1996; TAKEUCHI *et al.*, 1998, WANG *et al.*, 2009).

Embora a presença do gene não indique obrigatoriamente a produção da toxina e consequentemente sua presença no leite, este fato indica a possibilidade da estirpe avaliada produzir a toxina. No presente trabalho foi avaliada a presença de *tst-1*. Constatou-se, a presença desse gene isoladamente (6/7) (Figura 5), ou em associação com um gene da enterotoxina (*sei-tst-1*) (1/7). Dentre as estirpes avaliadas, o gene foi detectado respectivamente, em 0 e 2,27% (6/264) dos isolados de mastite e de leite cru refrigerado.

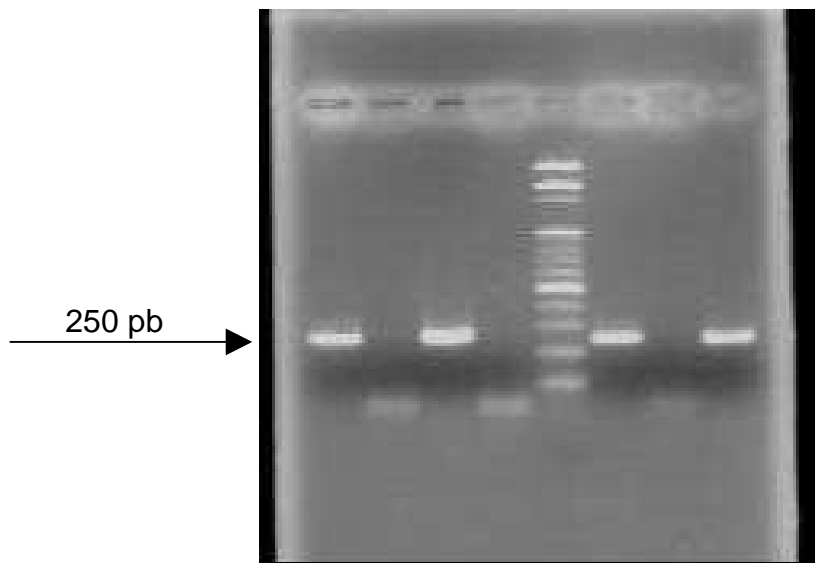


Figura 5 – Algumas estirpes de *S. aureus* portadoras do gene para a TSST-1 (*tst-1*).

Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores. Peles *et al.* (2007) não constataram *tst-1* em nenhum isolado de mastite e Sidhu *et al.* (2006) constataram *tst-1* em 0,01% dos isolados avaliados. Por outro lado, resultados diferentes foram observados por Stephan *et al.* (2000), os quais verificaram que 64,7% dos *S. aureus* isolados de mastite produziam TSST-1, por Takeuchi *et al.* (1998), os quais quantificaram TSST-1 em 75,4% das amostras de *S. aureus* isoladas de leite cru refrigerado e por Zschock *et al.* (2000), Salasia *et al.* (2004) e Srinivasan *et al.* (2006), que embora tenham encontrado resultados semelhantes entre si (20,2, 31,4 e 25,6%, respectivamente) também difere dos encontrados nesse estudo.

Embora o gene *tst-1* não esteja envolvido em casos de intoxicações alimentares, o monitoramento de estirpes bacterianas potencialmente produtoras torna-se importante como forma de realizar um levantamento epidemiológico e o controle dos rebanhos brasileiros, uma vez que esse gene está associado com elementos genéticos móveis, o que implica uma possível

transferência horizontal desse gene para outras bactérias (CHIANG *et al.*, 2008). Além disso, alguns autores constataram uma associação de *tst-1* com os genes que codificam as enterotoxinas (HO *et al.*, 1989; KENNY *et al.*, 1993; ZSCHOCK *et al.*, 2000; SALASIA *et al.*, 2004).

Stephan *et al.* (2000) e Zschock *et al.* (2000) ao estudarem essa associação, verificaram a presença simultânea do *tst-1* e *sec*. No entanto, essa associação não foi encontrada nem por Karahan *et al.* (2009) e nem no presente trabalho, no qual a presença de *sec* foi detectada apenas em um isolado, sendo o mesmo ausente para *tst-1*.

A associação do gene *tst-1*, com a presença de genes para as enterotoxinas estafilocócicas, indica na possibilidade desse gene estar ligado à patogênese da mastite, bem como com o aumento da patogenicidade dos isolados bacterianos (MATSUNAGA *et al.*, 1993; TAKEUCHI *et al.*, 1996; CARDOSO *et al.*, 2000; ZSCHOCK *et al.*, 2005; SIDHU *et al.*, 2006; KARAHAN *et al.*, 2009).

4.4 Detecção de genes para as enterotoxinas estafilocócicas

Dentre os 264 isolados de *Staphylococcus* spp., 60 (22,7%) apresentaram um ou dois genes para as enterotoxinas estafilocócicas. Genes para as enterotoxinas clássicas em combinação com outras enterotoxinas (33,3%) ou isoladamente (66,7%) foram detectados em três isolados (1,1%), sendo dois *S. aureus* isolados de leite cru refrigerado (*seb* e *sec*) e um isolado de leite de vacas com mastite (*seb*). Os demais genes encontrados foram aqueles associados à codificação das novas enterotoxinas (*seg-sell*), sendo 23 isolados de leite de vacas com mastite e 35 de leite de tanques (Tabela 7).

A análise de detecção dos genes que codificam as enterotoxinas, demonstrou predominância daqueles associados às novas enterotoxinas (95%). Essa predominância também foi observada por outros autores em isolados de leite e derivados (ROSEC; GIGAUD, 2002; LONCAREVIC *et al.*, 2005; BOEREMA *et al.*, 2006; HUNEIDI *et al.*, 2006; RALL *et al.*, 2008; ZOUHAROVA; RYSANEK, 2008).

Tabela 7 – Distribuição dos genes para as enterotoxinas estafilocócicas dentre os isolados de *Staphylococcus* spp.

Genes	Origem e Número (%) de Isolados				
	<i>S. aureus</i> de Matite n = 125	<i>S. aureus</i> de LCR ¹ n = 96	SCP n = 33	SCP n = 10	Total n = 224
<i>sea</i>	-	-	-	-	-
<i>seb</i>	1 (0,8)	1 (1,0)	-	-	2 (0,7)
<i>sec</i>	-	1 (1,0)	-	-	1 (0,4)
<i>sed</i>	-	-	-	-	-
<i>see</i>	-	-	-	-	-
<i>seg</i>	9 (7,2)	16 (14,5)	4 (12,1)	-	29 (10,2)
<i>seh</i>	2 (1,6)	19 (19,8)	1 (3,0)	-	22 (8,3)
<i>sei</i>	5 (4,0)	13 (13,5)	3 (9,0)	-	21 (7,9)
<i>selj</i>	2 (1,6)	1 (1,0)	-	1 (10,0)	4 (1,5)
<i>sell</i>	3 (2,4)	-	-	-	3 (1,1)

¹Leite cru refrigerado.

Gonano *et al.* (2009) também verificaram em isolados de animais predominância de genes para as novas enterotoxinas, não sendo observado *sea* e nem *see*. No entanto, em outros trabalhos é relatada a presença de genes para as enterotoxinas clássicas em maior frequência (SIDHU *et al.*, 2006; BOYNUKARA *et al.*, 2008; VERAS *et al.*, 2008; BENDAHOU *et al.*, 2009; PROIETTI *et al.*, 2010).

O fato de EEA e EED estarem mais associadas em casos de intoxicações alimentares (OMOE *et al.*, 2002; CHAPAVAL *et al.*, 2006), e nos resultados do presente estudo não serem encontrados nenhum gene para essas toxinas, não exclui a possibilidade de intoxicações por estirpes carreadoras de outros genes. Isso pode ser afirmado, uma vez que em alguns estudos têm sido verificado o envolvimento de isolados que expressam *seg*, *sei* e *selj* em surtos alimentares (McLAUHLIN *et al.*, 2000; GONANO *et al.*, 2009).

Quatorze diferentes genótipos para os genes das enterotoxinas foram encontrados (Tabela 8). Para os isolados de leite de vacas com mastite observaram-se oito genótipos diferentes *seg*, *seh*, *sei*, *selj*, *sell*, *seb-seh*, *seg-sei*, *seg-sel*, enquanto para os isolados de leite refrigerado verificou-se a presença de nove genótipos *seb*, *sec*, *seg*, *seg-sei*, *seg-seh*, *seh*, *sei*, *selj* e *sei-tst-1*. Observou-se prevalência de *seh*, seguido do *seg-sei*.

Tabela 8 – Perfis dos genótipos observados para *S. aureus*, SCN e SCP isolados de leite de vacas com mastite e de *S. aureus* isolados de leite cru refrigerado (LCR)

Genótipos	Número dos Isolados				
	<i>S. aureus</i> de Mastite	<i>S. aureus</i> de LCR	SCN	SCP	Total
Total dos isolados	125	96	33	10	264
Isolados positivos	17	37	5	1	60
<i>seb</i>	-	1	-	-	1
<i>sec</i>	-	1	-	-	1
<i>seg</i>	5	2	1	-	8
<i>seh</i>	1	14	1	-	16
<i>sei</i>	2	3	-	-	5
<i>selj</i>	2	1	-	1	4
<i>sell</i>	2	-	-	-	2
<i>sei-tst-1</i>	-	1	-	-	1
<i>seg-sei</i>	3	9	3	-	15
<i>seg-seh</i>	-	5	-	-	5
<i>seb-seh</i>	1	-	-	-	1
<i>seg-sell</i>	1	-	-	-	1

De acordo com o exposto na Tabela 8, pode-se verificar que combinações de genes foram encontradas para 23 (38,3%) das estirpes toxigênicas, sendo que a combinação *seg-sei* (65,2%) foi predominante sobre as demais associações [*seg-seh* (21,7%), *sei-tst-1* (4,3%), *seb-seh* (4,3%) e *seg-sell* (4,3%)].

Combinações de genes foram encontrados por Huneidi *et al.* (2006), que observaram um total de 39% de amostras de *S. aureus* com um ou mais genes associados às novas enterotoxinas (*seg*, *seh* e *sei*), nenhuma amostra apresentou *selj*, todos os isolados que continham *sei* apresentavam também *seg* e em dois dos isolados que continham *seh* foram também positivos para *seg* e *sei*. Estes autores constataram predominância de *seg* (37%), seguido de *sei* (24%) e *seh* (4%).

Coexistência para *seg-sei* foi verificada por Zhang *et al.* (1998), Rosec e Gigaud (2002), Omoe *et al.* (2005) e Fernandez *et al.* (2006). Enquanto diferentes combinações desses genes foram verificadas por Loncarevic *et al.* (2005), Katsuda *et al.* (2005), Freitas *et al.* (2008) e Zouharova e Rysanek (2008) e nenhuma correlação observada por Jorgensen *et al.* (2005).

A associação de *seg-sei* observada no presente trabalho e em outros estudos, pode ser atribuída à sua localização dentro do *cluster egc* na ilha de patogenicidade Tipo II vSaβ. Enquanto a ocorrência de *seg* e *sei* isoladamente, pode ser explicada pela existência de variações no *cluster egc*, pela combinação de elementos móveis genéticos codificadores de genes para as enterotoxinas, como, por exemplo, plasmídeos e ilhas de patogenicidade presentes na mesma amostra (BLAIOTTA *et al.*, 2004) ou ainda a existência de um elemento genético móvel diferente (OMOE *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2009) .

Observou-se predominância para a presença de estirpes toxigênicas (n = 37) e para a presença de genótipos (n = 9) para os isolados de leite cru refrigerado (Tabelas 7 e 8). Os resultados para o número de estirpes toxigênicas em leite de tanque (38,5%) e de vacas com mastite (21,6%) são semelhantes, respectivamente, aos observados por Mork *et al.* (2003), que observaram a produção de pelo menos uma enterotoxina (EEA-EED) em 38% dos isolados e Valle *et al.* (1990), que encontraram aproximadamente 19%.

Dentre as propriedades contempladas nesse estudo (n = 68), 29 (42,6%) apresentaram um ou dois genes para as enterotoxinas (Tabela 9). Além disso, verificou-se que o gene que codifica a toxina da síndrome do choque tóxico foi mais encontrado em rebanhos localizados em municípios do Estado do Rio de Janeiro.

Embora os trabalhos descrevam a detecção de genes para as enterotoxinas de *Staphylococcus* isolados de mastite bovina e de leite cru refrigerado, os resultados observados pelos diferentes autores apontam grande variação. Em estudo desenvolvido por Jorgensen *et al.* (2005) foi demonstrado que diferentes regiões apresentaram incidências diferentes quanto a presença das EE ou dos genes que as codificam. Essa variação pode ser em decorrência da distribuição geográfica das estirpes enterotoxigênicas (LARSEN *et al.*, 2000; STEPHAN *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2005).

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

Tabela 9 – Distribuição geográfica dos isolados positivos para genes das exotoxinas

Origem das Amostras	Gene	Município
Fazenda 1	<i>sei, tst-1</i>	Matias Barbosa, MG
Fazenda 2	<i>seg, sei</i>	Juiz de Fora, MG
Fazenda 3	<i>seg, sei</i>	Não identificado
Fazenda 4	<i>seg, sei</i>	Guarará, MG
Fazenda 5	<i>seb</i>	Engenheiro Paulo de Frontin, RJ
Fazenda 6	<i>tst-1</i>	Itaperuna, RJ
Fazenda 7	<i>tst-1</i>	Conservatória, RJ
Fazenda 8	<i>tst-1</i>	Itaperuna, RJ
Fazenda 9	<i>selj, tst-1</i>	Itaperuna, RJ
Fazenda 10	<i>seg, sei</i>	Rio Preto, MG
Fazenda 11	<i>tst-1</i>	Não identificado
Fazenda 12	<i>seh, sei</i>	Não identificado
Fazenda 13	<i>sec</i>	Não identificado
Fazenda 14	<i>seg, seh, sei</i>	Viçosa, MG
Fazenda 15	<i>seb, seg, seh, sei</i>	Coronel Pacheco, MG
Fazenda 16	<i>seg, selj</i>	Não identificado
Fazenda 17	<i>selj</i>	Não identificado
Fazenda 18	<i>seg</i>	Não identificado
Fazenda 19	<i>seg, sei</i>	Pequeri, MG
Fazenda 20	<i>seg, sei</i>	Leopoldina, MG
Fazenda 21	<i>seg</i>	Não identificado
Fazenda 22	<i>seg, seh</i>	Matosinhos, MG
Fazenda 23	<i>sel, selj</i>	Matosinhos, MG
Fazenda 24	<i>sei</i>	Ouro Branco, MG
Fazenda 25	<i>seg, sell</i>	Não identificado
Fazenda 26	<i>seb, seg, sei</i>	Juiz de Fora, MG
Fazenda 27	<i>seg, sei</i>	Guarani, MG
Fazenda 28	<i>seg, sei</i>	Patos de Minas, MG
Fazenda 29	<i>seh</i>	Belmiro Braga, MG

4.5 Análise da hidrofobicidade dos isolados

A capacidade de adesão dos microrganismos depende de vários fatores. Entre eles, destacam-se as características da superfície a ser aderida, as características do meio de crescimento, as condições ambientais e as

características da célula bacteriana (SHENG *et al.*, 2010). Quanto aos fatores ambientais, para *Staphylococcus* verifica-se influência da osmolaridade, concentração de glicose, condições atmosféricas e temperatura (KOUIDHI *et al.*, 2010). Além disso, propriedades microbiológicas, como carga superficial, apêndices celulares e hidrofobicidade podem aumentar a capacidade de adesão (BUSSCHER; WEERKAMP, 1987; HAMADI; LATRACHE, 2008; SHENG *et al.*, 2010).

O caráter hidrofóbico ou hidrofílico das superfícies bacterianas pode ser estimado a partir da energia livre global de interação e do ângulo de contato da superfície bacteriana com a água. Dessa maneira, a partir de análise qualitativa, ou seja, conforme a medida do ângulo de contato da superfície bacteriana com a água (θ_w), todos os isolados toxigênicos avaliados foram considerados hidrofílicos (Tabela 10). Isto porque, segundo critérios adotados por Azeredo (1998), pode-se avaliar o caráter hidrofóbico ou hidrofílico de uma superfície pelo valor do ângulo de contato da superfície com a água (θ_w). Assim, para ângulos superiores a 50° a superfície é considerada hidrofóbica, caso contrário, a superfície deverá ser considerada hidrofílica.

Quantitativamente também todas as estirpes de *Staphylococcus* spp. avaliadas foram confirmadas como sendo hidrofílicas, uma vez que todos os isolados apresentaram energia livre global de interação $\Delta G_{sas}^{TOT} > 0$ (Tabela 11). Esses valores permitem quantificar a hidrofobicidade e foram calculados de acordo com as equações apresentadas no item 3.5.

Dessa forma, o que se nota nesse trabalho é a presença de uma correlação entre o critério quantitativo e qualitativo de avaliação da hidrofobicidade para todos os isolados, verificada também por Hamadi *et al.* (2005), Hamadi e Latrache (2008) e Kouidhi *et al.* (2010).

Vale ressaltar, no entanto, que apenas o caráter de hidrofobicidade não pode ser levado em consideração para avaliar o potencial de adesão de uma bactéria. Primeiro, porque a medição do ângulo de contato com a água é uma técnica que indica qualitativamente apenas a natureza hidrofóbica ou não da superfície celular e que, além disso, tem gerado discussão entre diferentes autores, pelo fato de tratar-se de uma metodologia, que, em geral, não tem boa correlação com outros testes (HAMADI; LATRACHE, 2008)

Tabela 10 – Ângulo de contato da superfície de isolados de *Staphylococcus* spp. com água (Θ_A), formamida (Θ_F) e α -bromonaftaleno (Θ_B)

Amostras	Θ_A	Θ_F	Θ_B
5834	20,55	24,95	67,10
7914	20,10	22,18	47,70
7920	20,95	18,25	74,60
5561	16,75	18,45	67,80
7735	16,85	18,30	85,00
5161	14,85	17,25	71,40
7734	17,50	18,70	53,50
5931	30,30	27,25	63,20
4478	19,45	16,70	73,40
5475	18,30	20,25	57,00
5175	18,45	18,75	54,70
7864	18,85	17,70	49,50
2221	20,00	24,35	70,00
5607	18,45	23,35	73,20
4606	16,60	19,05	79,10
2482	18,7	18,35	74,40
4779	13,75	17,10	68,60
4712	15,85	17,20	79,80
7157	21,10	19,60	61,70
7922	18,15	18,10	74,90
4427	24,20	21,20	68,10
7917	19,20	14,90	54,90
7736	15,30	16,55	53,10
7915	17,90	20,85	47,70
5037	10,65	16,45	60,30
4687	13,95	14,10	61,90
3007	15,65	17,50	66,10
4799	15,80	16,25	53,20
4725	15,95	15,70	72,90
5995	17,80	19,15	61,60

Dessa forma, para estudar os aspectos que facilitam a formação do biofilme é necessário conhecer também outras características físico-químicas da superfície bacteriana, como a presença de lipopolissacarídeos, proteínas e exopolímeros que variam em quantidade com as condições de crescimento e de estirpe para estirpe (STREVETT; CHEN, 2003). Assim, torna-se interessante um estudo mais aprofundado desses fatores, para uma possível correlação entre formação de biofilmes e patogênese da mastite, já que, segundo Vasudevan *et al.* (2003), a formação de biofilmes por *S. aureus* favorece a virulência do microrganismo.

Tabela 11 – Valores das componentes apolar ($\Delta G_{\text{sWS}}^{\text{LW}}$) e polar ($\Delta G_{\text{sWS}}^{\text{AB}}$) da energia livre global de interação ($\Delta G_{\text{sWS}}^{\text{TOT}}$) das superfícies de *S. aureus* toxigênico

Energia livre global de interação (mJ/m ²)			
Amostras	$\Delta G_{\text{sWS}}^{\text{LW}}$	$\Delta G_{\text{sWS}}^{\text{AB}}$	$\Delta G_{\text{sWS}}^{\text{TOT}}$
5834	-0,004	22,592	22,588
7914	-1,638	29,926	28,288
7920	-0,410	14,197	13,787
5561	-0,013	19,933	19,919
7735	-2,192	11,035	8,842
5161	-0,154	18,334	18,180
7734	-0,830	26,633	25,803
5931	-0,053	17,680	17,627
4478	-0,297	14,821	14,523
5475	-0,455	25,545	25,090
5175	-0,691	25,426	24,735
7864	-1,358	26,663	25,304
2221	-0,078	20,978	20,900
5607	-0,280	19,457	19,177
4606	-1,001	14,528	13,527
2482	-0,395	15,529	15,134
4779	-0,031	20,219	20,188
4712	-1,126	13,526	12,400
7157	-0,117	20,824	20,707
7922	-0,446	15,430	14,984
4427	-0,018	16,666	16,648
7917	-0,669	22,439	21,770
7736	-0,879	26,851	25,971
7915	-1,638	30,636	28,998
5037	-0,193	20,567	25,374
4687	-0,108	22,007	21,900
3007	-0,000	20,852	20,852
4799	-0,867	26,300	25,433
4725	-0,260	16,295	16,035
5995	-0,122	22,877	22,755

5 CONCLUSÕES

- *Staphylococcus aureus* nem sempre apresentam características típicas em Agar Baird-Parker.
- Há uma predominância de *Staphylococcus* spp. hemolíticos isolados de leite.
- Sugere-se que o gene para TSST-1 não esteja envolvido com a patogênese da mastite.
- Houve uma maior frequência na identificação de genes que codificam as novas enterotoxinas (seg – sell).
- As superfícies de estirpes toxigênicas e não toxigênicas apresentaram caráter hidrofílico, indicando que em contato com superfícies hidrofóbicas possuem maior capacidade de adesão do que em contato com superfícies hidrofílicas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M.; ANDERSEN, J. K.; JENSEN, N. E. Lack of staphylococcal enterotoxin production among strains of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Denmark. **Acta Veterinary Scandinavian**, v. 36, p. 273-275, 1995.

AARESTRUP, F. M.; LARSEN, H. D.; ERIKSEN, N. H. R.; ELSBERG, C. S.; JENSEN, N. E. Frequency of α - and β -hemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. **APMIS**, v. 107, p. 425-430, 1999.

AKINEDEN, O.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A. A.; LAMMLER, C.; WOLTER, W.; ZSCHOCK, M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 959-964, 2001.

ALOUF, J. E.; MULLER-ALOUF, H. *Staphylococcal* and *Streptococcal* superantigens: molecular, biological and clinical aspects. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, p. 429-440, 2003.

ARCURI, E. F.; PAULA, G. B.; BORGES, M. F.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F. PCR multiplex para identificação de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 2., 2006. Goiânia-GO. **Anais...** Goiânia-GO: SBQL, 2006. 3 p. CD.

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 1751-1773, 2010.

AZEVEDO, J.; OLIVEIRA, R. The role of exopolymers in the attachment of *Sphingomonas paucimobilis*. **Biofouling**, v. 16, p. 59-67, 2000.

BACHERT, C.; GEVAERT, P.; CAUWENBERGE, van P. *Staphylococcus aureus* superantigens and airway disease. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 2, n. 2, p. 252–258, 2002.

BAIRD-PARKER, A. C. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive *staphylococci*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 25, p. 12-19, 1962.

BAIRD, R. M.; LEE, W. H. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 15-24, 1995.

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

BANIA, J.; DABROWSKA, A.; BYSTRON, J.; KORZEKWA, K.; CHRZANOWSKA, J.; MOLEND, J. Distribution of newly described enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* from food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 36-41, 2006.

BANKS, M. C.; KAMEL, N. S.; ZABRISKIE, J. B.; LARONE, D. H.; URSEA, D.; POSNETT, D. N. *Staphylococcus aureus* express unique superantigens depending on the tissue source. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p. 77-86, 2003.

BECKER, R.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2548-2533, 1998.

BENDAHO, A.; ABID, M.; BOUTELDOUN, N.; CATELEJINE, D.; LEBBADI, M. Enterotoxigenic coagulase positive *Staphylococcus* in milk and milk products, lben and jben, in northern Morocco. *Journal of Infection. Developing Countries*, v. 3, n. 3, p. 169-176, 2009.

BERGDOLL, M. S.; WEISS, K. F.; MUSTER, M. J. The production of staphylococcal enterotoxins by a coagulase-negative microorganism. **Bacteriology Procedures**, v. 12, 1967.

BERNAL, A.; PROFT, T.; FRASER, J. D.; POSNETT, D. N. Superantigens in Human Disease. **Journal of Clinical Immunology**, v. 19, n. 3, 1999.

BLAIOTTA, G.; ERCOLINE, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of *Staphylococcal* enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence

for new variants of *seg* and *sel* in *S. aureus* AB-08802. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.719-730, 2004.

BOEREMA, J. A.; CLEMENS, R.; BRIGHTWELL, G. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 192-201, 2006.

BOERLIN, P.; KUHNERT, P.; HUSSY, D.; SCHAEFFELBAUM, M. Methods for identification of *Staphylococcus aureus* isolates in cases of bovine mastitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 767-771, 2003.

BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J.; FOX, L. K.; HARMON, R. J.; HOGAN, J. S.; NICKERSON, S. C.; OLIVER, S. P.; SMITH, K. L.; SORDILLO, L. M. **Current concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison: National Mastitis Council, 1996. 64 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Métodos de análises microbiológicas para alimentos**. Brasília-DF: Ministério da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento; 2000. (cap. 4 – Materiais de Referência). Disponível em: <<http://www.extranet.agricultura.gov.br/sislegis/consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em: 4 mar. 2009.

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

BURROWS, T. W. **Text of book microbiology**. 2. ed. WD Saunders Company: Washington. 1973. 1035 p.

BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H.; VAN DER MEI, H. C.; VAN PELT, A. W.; DE JONG, H. P.; ARENDS, J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surface and its relevance for adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 980-983, 1984.

BUSSCHER, H. J.; WEERKAMP, A. H. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, p. 165-173, 1987.

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

BRONNER, S.; MONTEIL, H.; PREVOST, G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 183-200, 2004.

BROUILLETTE, E.; MALOUIN, F. The pathogenesis and control of *Staphylococcus aureus*-induced mastitis: study models in the mouse. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 560-568, 2005.

BUONPANE, R. A.; MOZA, B.; SUNDBERG, E. J.; KRANZ, D. M. Characterization of T cell receptors engineered for high affinity against toxic shock syndrome toxin-1. **Journal Molecular Biology**, v. 353, p. 308-321, 2005.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, K. C.; MORENO, B.; GARCÍA-FERNANDEZ, M. C. Assessment of baired-Parker agar as screening test for determination of *Staphylococcus aureus* in poultry meat. **Journal of Microbiology** v. 39, p. 321-325, 2001.

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

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazillian. **Food Microbiology**, v.19, p. 9-14, 2002.

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

CARMO, G. M. I.; ALVES, M. R. S.; ALMEIDA, M. G.; DIMECH, C. P. N.; OLIVEIRA, A. A.; CARMO, E. H. **Perfil epidemiológico dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004**. Brasília-DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, 2005. 2 p.

CIFRIAN, E.; GUIDRY, A. J.; BRAMLEY, A. J.; NORCROSS, N. L.; BASTITA-CORCUERA, F. D.; MARQUARDT, W. W. Effect os staphylococcal β toxin on the cytotoxicity, proleferation and adherence os *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, v. 48, p. 187-198, 1996.

CHAPAVAL, L.; MONN, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M. Use of PCR to detect classical enterotoxins genes (ENT) and toxic shock syndrome toxin-1 gene (TST) in *Staphylococcus aureus* isolated from crude milk and determination of toxin productivities of *S. aureus* isolates harboring these genes. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 165-169, 2006.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética da formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. 2004. 156 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Universidade do Minho, Minho-Braga, 2004.

CHEN, T. R.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. Use of novel PCR primers specific to the genes os staphylococcal enterotoxina G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, 189-197 p., 2004.

CHEN, T. R. *et al.* Development and use of PCR primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 63-70, 2001.

CHIANG, Y. C.; LIAO, W. W.; FAN, C. M.; PAI, W. Y.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. PCR detection of *Staphylococcal* enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U e survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, 66-73 p., 2008.

CHYE, F. Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M. K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, v. 21, p. 535-541, 2004.

CREMONESI, P.; LUZZANA, M.; BRASCA, M.; MORANDI, S.; LODI, R.; VIMERCATI, C.; AGNELLINI, D.; CARAMENTI, G.; MORONI, P.; CASTIGLIONI, B. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 299-305, 2005.

DAUWALDER, O.; PACHOT, A.; CAZALIS, M. A.; PAYE, M.; FAUDOT, C.; BADIOU, C.; MOUGIN, B.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J.; LINA, G.; MONNERET, G. Early kinetics of the transcriptional response of human leukocytes to staphylococcal superantigenic enterotoxins A and G. **Microbiology Pathogenesis**, 2 Jul., 2009.

DEURENBERG, R. H.; NIEUWENHUIS, R. F.; DRIESSES, C.; LONDON, N.; STASSEN, F. R.; van TIEL, F. H.; STOBBERINGH, E. E.; VINK, C. The prevalence of the *Staphylococcus aureus* *tst* gene among community and hospital acquired strains and isolates from Wegener's Granulomatosis patients. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p. 185-189, 2005.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 16-34, 2000.

D'SOUZA, S.; McGRATH, H.; RAFICK, P. SEKALY. Early activation events differentiate the reactivity of two T-cell families to *Staphylococcus enterotoxin A*. **Cellular Immunology**, v. 223, p.113-119, 2003.

EL-HUNEIDI, W.; BDOUR, S.; MAHASNEH, A. Detection of enterotoxin genes seg, seh, sei, and sej and of a novel genotype in Jordanian clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2006 [In press].

EL-JAKEE, J.; NAGWA, A. S.; BAKRY, M.; ZOUELFAKAR, S. A.; ELGABRY, E.; EL-SAID, W. A. G. Characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from human and animal sources. **American-Eurasian Journal of Agricultura & Environmental Sciences**, v. 4, p. 221-229, 2008.

ERTAS, N.; GONULALAN, Z.; YILDIRIM, Y.; KUM, E. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 74-77, 2010.

EUZEBY, J. P. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 590-592, 1997.

FERENS, W. A.; DAVIS, W. C.; HAMILTON, M. J.; PARK, Y. H.; DEOBALD, C. F.; FOX, L.; BOHACH, G. Activation of bovine lymphocyte subpopulations by staphylococcal enterotoxina C. **Infection and immunity**, v. 66, n. 3, p. 573-580, 1998.

FERNANDEZ, M. M.; MARZI, M. C.; BERGUER, P.; BURZYN, D.; LANGLEY, R. J.; PIAZZON, I.; MARIUZZA, R. A.; MALCHIODI, E. L. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC classe II molecule. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 927-938, 2006.

FERRY, T.; PERPOINT, T.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Virulence Determinants in *Staphylococcus aureus* and Their Involvement in Clinical Syndromes. **Current Infectious Disease Reports**, v. 7, p. 420-428, 2005.

FITZGERALD, J. R.; MEANEY, W. J.; HARTIGAN, P. J.; SMYTH, C. J.; KAPUR, V. Fine structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. **Epidemiology Infection**, v. 119, p. 261-269, 1997.

FOX, L. K. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 82-88, 2009.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo-SP: Atheneu, 2003.

FRASER, J.; ARCUS, V.; KONG, P.; BAKER, E.; PROFT, T. Superantigens: powerful modifiers of the immune system. **Molecular Medicine Today**, v. 6, p. 125-132, 2000.

FREITAS, M. F. L.; LUZ, I. S.; SILVEIRA-FILHO, V. M.; JUNIOR, J. W. P.; STAMFORD, T. L. M.; MOTA, R. A.; SENA, M. J.; ALMEIDA, A. M. P.; BALBINI, V. Q.; LEAL-BALBINO, T. C. *Staphylococcal* toxin genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 617-621, 2008.

FUJIKAWA, H.; MOROZUMI, S. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxina production in milk. **Food Microbiology**, v. 23, p. 260-267, 2006.

GLINN, B.; LAHIFF, S.; WERNWCKE, M.; BARRY, T.; SMITH, T. J.; MAHER, M. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 2, p. 126-139, 2006.

GONANO, M.; HEIN, I.; ZANGERL, P.; RAMMELMAYR, A.; WAGNER, M. Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* strains of veterinary, dairy and human origin. **Epidemiology and Infection**, v. 137, p. 688-699, 2009.

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

HAEGHEBAERT, S.; Le QUERREC, F.; VAILLANT, V.; ASTAGNEAU, E.D.; BOUVET, P. Les toxiinfections alimentaires en France en 1997. **Bull. Epidemiol. Hebd.**, v. 41, p. 177-183, 1998.

HALE, M. L.; SWIETNICKI, W. Model systems to study a superantigen-induced disease: Toxic shock syndrome. **Infections Diseases**, v. 3, n. 1, p. 121-126, 2006.

HAMADI, F.; LATRACHE, H.; MABRROUKI, M.; EL GHMARI, A.; OUTZOURHIT, A.; ELLOUALI, M. Effect of pH on distribution and adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass. **Journal of Adhesion Science Technology**, v. 19, p. 73-85, 2005.

HAMADI, F.; LATRACHE, H. Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor-electron acceptor (acid-base) properties of bacterial surface. **Colloids and Surfaces B**, v. 65, p. 134-139, 2008.

HAYAKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SHIMANO, T.; KOMAE, H.; TAKEUCHI, K.; ENDOU, M.; IGARASHI, H.; HASHIMOTO, N.; TAKEUCHI, S. Production of exfoliative toxin A by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cow's milk and farm bulk milk. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 11, p. 1281-1283, 1998.

HAYAKAWA, Y.; AKAGI, M.; HAYASHI, M.; SHIMANO, T.; KOMAE, H.; FUNAKI, O.; KAIDOH, T.; TAKEUCHI, S. Antibody response to toxic shock syndrome toxin-1 of *Staphylococcus aureus* in dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v. 72, p. 321-327, 2000.

HERRERA, J. J. R.; CABO, M. L.; GONZALEZ, A.; PAZOS, I.; PASTORIZA, L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. aureus under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, v. 24, p. 585-591, 2007.

HO, G.; CAMPBELL, W. H.; BERGDOLL, M. S.; CARLSON, E. Production of a toxic shock syndrome toxin variant by *Staphylococcus aureus* strains associated with sheep, goats and cows. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1946-1948, 1989.

HUI, J.; CAO, Y.; XIAO, F.; ZHANG, J.; LI, H.; HU, F. *Staphylococcus aureus* enterotoxin C2 mutants: biological activity assay in vitro. **Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 975-980, 2008.

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

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

JABLOSNIKI, L. M.; BOHACH, G. A. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. (Ed.). **Food microbiology fundamentals and frontiers**. 1997, p. 353-375.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, v. 166, p. 669-677, 2001.

JONES, T. O.; WIENEKE, A. A. *Staphylococcal* toxic shock syndrome. **The Veterinary Record**, v. 119, p. 435-436, 1986.

JOO, Y. S.; FOX, L. K.; DAVIS, W. C.; BIHACH, G. A.; PARK, Y. H. *S. aureus* associated with mammary glands of cow: genotyping to distinguish different strains among herds. **Veterinary Microbiology**, v. 80, p. 131-138, 2001.

JOHNSON, H. M.; MAGAZINE, H. I. Potent mitogenic activity of staphylococcal enterotoxin A requires induction of interleukin 2. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 87, p. 87-90, 1988.

JORGENSEN, H. J.; MORK, T.; HOGASEN, H. R.; RORVIK, L. M. **Journal Applied of Microbiology**, v. 99, p. 158-166, 2005.

KAEMPFER, R. Peptide antagonists of superantigen toxins. **Molecular Diversity**, v. 8, p. 113-120, 2004.

KARAHAN, M.; AÇIK, M. N.; ÇETINKAYA, B. Investigation of Toxin Genes by Polymerase Chain Reaction in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine Mastitis in Turkey. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 8, p. 1029-1035, 2009

KATSUDA, K.; HATA, E.; KOBAYASHI, H.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; TSUNEMITSU, H.; EGUCHI, M. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. **Veterinary Microbiology**, v. 105, p. 301-305, 2005.

KENNY, K., REISER, R.F., BASTIDA-CORCUERA, F.D. *et al.* Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical of Microbiology**, v. 31, p. 706-707, 1993

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

KHAN, M. A.; KIM, C. H.; KAKOMA, I.; MORIN, E.; HANSEN, R. D.; HURLEY, W. L. Detection of *Staphylococcus aureus* in milk by use of polymerase chain reaction analysis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 59, p. 807-813, 1998.

KLOSS, W. E. Systematics and natural history of staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement**, v. 69, n. 19, p. 25S-37S, 1990.

KRAKAUER, T. Immune Response to *Staphylococcal* Superantigens. **Immunologic Research**, v. 20, n. 2, p. 163-173, 1999.

KOUIDHI B, *et al.* Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular. **Microbial Pathogenesis**, 2010 [in press].

KWOK, A. Y. C.; CHOW, A. C. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 87-92, 2003.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* enterotoxins. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. American Public Health Association (APHA), 2001. p. 387-400.

LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 67, 127-141, 1999.

LARSEN, H. D.; HUDA, A.; ERIKSEN, N. H. R.; JENSEN, N. E. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. **Veterinary Microbiology**, v. 76, p. 153-162, 2000.

LARSEN, H. D.; AARESTRUOE, F. M.; JENSEN, N. E. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and β -hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. **Veterinary Microbiology**, v. 85, p. 61-67, 2002.

LARSEN, H. D.; HUDAB, A.; ERIKSENC, N. H. R.; JENSEN, N. E.. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. **Veterinary Microbiology**, v. 76, p. 153-162, 2002.

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

LIM, Y. S.; JEGATHESAN, M.; PATH, M. R. C.; KOAY AIMHLT, A. S.; KANG, S. H. A comparison of six selective media for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods. **The Malaysian Journal of Pathology**, v. 6, p. 35-38, 1983.

LINA, G.; BOHACH, G. A.; NAIR, S. P.; HIRAMATSU, K.; MARCHE, E. J.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. **The Journal of Infections Diseases**, v. 184, p. 2334-2336, 2004.

LE LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LOPES, C A.M.; MORENO, G.; CURI, P.R.; GOTTSCHALK, A.F.; MONDOLO, J.R.; HORACIO, A.; CORRÊA, A.; PAVAN, C. Characteristics of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Brazil. **British Veterinary Journal**, v. 146, p. 443-446, 1990.

LONCAREVIC, S.; JORGENSEN, H.J.; LOVSETH, A.; MATHISEN, T.; RORVIK, L.M. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 340-350, 2005.

LUES, J. F. R.; VENTER, P.; WESTHUIZEN, H. V. D. Enumeration of potencial microbiological hazards in milk from a marginal urban settlement in central south Africa. **Food Microbiology**, v. 20, p. 321-326, 2003.

MARSHALL, R. T. (Ed.) **Standard methods for the examination of dairy products**. 16. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 1992, 546 p.

MARTIN, M. C.; FUEYO, J. M.; GONZALES-HEVIA, M. A.; MENDOZA, M. C.; Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 279-286, 2004.

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

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

MATTHEWS, K. R.; OLIVER, S. P.; KING, S. H. Comparison of Vitek Gram-Positive Identification system with API Staph-Trac system for species identification of staphylococci of bovine origin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 1649-1651, 1990.

MCLAUCHLIN J. *et al.* The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 470-488, 2000.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in United States. **Emerging Infectious Disease**, v.5, p. 607-625, 1999.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock

syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p.1032-1035, 2000.

MICCORMICK, J. K.; YARWOOD, J. M.; SCHLIEVERT, P. M. Toxic shock syndrome and bacterials. **Annual Review Microbiology**, v. 55, p. 77-104, 2001.

MIDDLETON, J. R.; FOX, L. K.; GAY, J. M.; TYLER, J. W.; BESSER, T. E. Use of pulsed-field gel electrophoresis for detecting differences in *Staphylococcus aureus* strain populations between dairy herds with different cattle importation practices. **Epidemiology and Infection**, v. 129, p. 387-395, 2002.

MITCHELL, D. T.; LEVITT, D. G.; SCHLIEVERT, P. M.; OHLENDORF. Structural evidence for the evolution of pyrogenic toxin superantigens. **Journal of Molecular Evolution**, v. 51, p. 520-531, 2000.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 66-72, 2007.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; LODI, R. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains from Italian dairy products. **International of. Journal Microbiology**, v. 2009, p. 1-7, 2010.

MUNGUBE, E. O.; TENHAGEN, B. A.; REGASSA, F.; KYULE, M. N.; SHIFERAW, Y.; KASSA, T.; BAUMANN, M. P.O. Reduced milk produced in udders quarters with subclinical mastitis and associated economic losses in crossbred dairy cows in Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 37, p. 503-512, 2005.

MURPHY, B. P.; MAHONY, E. O.; BUCKLEY, J. F.; O'BRIEN, S.; FANNING, S. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Dairy Animals in Ireland. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p. 249-257, 2010.

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

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO,S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISII,A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food

products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 73-79, 2005.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo Real: Uma nova Tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v, 33, p. 10-13, 2004.

NOVICK, R.P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. **Microbiology Infections**, v.3, p. 585-594, 2001.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L.M.; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Microbiology**, v. 118, p. 133-140, 2006.

OLIVEIRA, M.; NUNES, S.; CARNEIRO, C.; BEXIGA, R.; BERNARDO, R. F.; VILELA, C. L. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 187-191, 2007.

OLIVEIRA, A. A.; MELO, C. B.; AZEVEDO, H. C. Diagnóstico e determinação microbiológica da mastite em rebanhos bovinos leiteiros nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 226-230, jan./mar., 2009.

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

OMOE, K.; HU, D.L.; TAKANASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by to kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6088-6094, 2003.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OME, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 246, p. 191-198, 2005.

OULAHAL, N.; BRICE, W.; MARTIAL, A.; DEGRAEVE, P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**, v. 19, p. 178-185, 2008.

PARK, Y. H.; FOX, L. K.; HAMILTON, M. J.; DAVIS, W. C. Suppression of proliferative response of BoCD4+ T lymphocytes by activated BoCD8+ T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 36, p. 137-151, 1993.

PARK, J. Y.; FOX, L. K.; SEO, K. S.; MCGUIRE, M. A.; PARK, Y. H.; RURANGIRWA, F. R.; SISCHO, W. M.; BOHACH, G. A. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the species identification of coagulase-negative staphylococcal isolates from bovine intramammary infections. **Veterinary Microbiology**, 2010 [in press].

PRATTEN, J.; FOSTER, S. J.; CHAN, P. F.; WILSON, M.; NAIR, S. P. *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 633-637, 2001.

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

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, p. 278-282, 2009.

PETERSON, K.; FORSBERG, G.; WALSE, B. Intereplay between superantigens and immunoreceptors. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, p. 345-355, 2004.

PICCININI, R.; BRONZO, V.; MORONI, P.; LUZZAGO, C.; ZECCONI, A. Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 501-510, 1999.

POMPERMAYER, D.M. C. e GAYLARDE, C.C. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. **Food Microbiology**, v. 17, p. 361-365, 2000.

PROIETTI, P. C.; COPPOLA, G.; BIETTA, A.; MARENZONI, M. L.; HYATT, D. R.; COLETTI, M.; PASSAMONTI, F. Characterization of genes encoding virulence determinants and toxins in *Staphylococcus aureus* from bovine milk in Central Italy. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 2010 [in press].

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W.; CONSTABLE, P. D. **A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats veterinary medicine**. 10. ed. Saunders Ltd., Philadelphia, PA, USA. 2007.

RALL, V. L. M.; VIEIRA F. P.; RALL, R.; VIEITIS, R. L.; FERNANDES JR., A.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; ARAUJO JR J. P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**, v. 132, p. 408-413, 2008.

RALL, V. L. M.; SFORCIN, J. M.; DE DEUS, M. F. R.; SOUSA, D. C.; CAMARGO, C. H.; GODINHO, N. C.; GALINDO, L. A.; SOARES, T. C. S.; ARAÚJO, J. P. Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* Isolated from Brazilian Minas cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 9, 2010

REISS, A. A. Toxic shock syndrome. **Infectious Diseases Update**, v. 7, n. 3, p. 85-90, 2000.

RENNEBERG, J.; RIENECK, K.; GUTSCHIK, E. Evaluation of Staph ID 32 system and Staph-Zym system for Identification of coagulase-negative *staphylococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1150-1153, 1995.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; BESSER, T. E. Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive *staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 3217–3219, 1992.

ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 687-693, 1998.

RODE, T. M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 372-383, 2007.

ROSEC, J. P.; GUIGAUD, J. P.; DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 213-221, 1997.

ROSEC, J.P.; GUIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 61-70, 2002.

SÁ, M. E. P.; CUNHA, M. L. R. S.; ELIAS, A. O.; LANGONI, C. V. H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 320-326, 2004.

SABIONE, J. G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J. L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo “Minas” em Ouro Preto, Minas Gerais, 1992. **Revista Higiene Alimentar**, v. 8, p. 22-23, 1994.

SALASIA, S. I. O.; KHUSNAN, Z.; LÄMMLER, C.; ZSCHÖCK, M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n. 2, p. 103-109, 2004.

SAMPIMON, O. C.; ZADOKS, R. N.; DE VliegHER, S.; SUPRE, K.; HAESBROUCK, F.; BARKEMA, H. W.; SOL, J.; LAM, T. J. G.M Performance of API Staph ID 32 and Staph-Zym for identification of coagulase-negative *staphylococci* isolated from bovine milk samples. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 300-305, 2009.

SANDEL, M. K.; MCKILLIP, J. L. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. **Food Control**, v. 15, p. 5-10, 2004.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; MORAES, L. B.; TAMANINI, R.; SILVA, W. P. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina-PR, v. 27, n. 4, p. 639-646, out./dez. 2006.

SCHERRER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J. E.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 101-107, 2004.

SCHMITZ, F. J.; STEIERT, M.; HOFMANN, B.; VERHOEF, . HADDIING, U.; HEINZ, H. P.; KOHRER, K. Development of a multiplex PCR for direct detection of the genes for enterotoxin B and C, and toxic shock syndrome toxin-1 in *Staphylococcus aureus* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 335-340, 1998.

SIDHU, M.; GURJAR, A.; HEGDE, N.; LOVE, B.; JAYARAO, B. Detection of enterotoxigen strains of *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. **NMC Annual Meeting of Procedures**, p. 248-249, 2006.

SILVA, W. P.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. G. M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, 2000.

SILVA, E.R.; CARMO, L.S.; SILVA, S. Detection of the enterotoxins A, B, and C genes in *Staphylococcus aureus* from goat and bovine mastitis in Brazilian dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 106, p. 103-107, 2005.

SCHUBERTH, H. J.; KRUEGER, C.; ZERBE, H.; BLECKMANN, E.; LEIBOLD, W. Characterization of leukocytotoxic and superantigen-like factors produced by *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 187-199, 2001.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological 3 wastewater treatment systems: A review. **Biotechnology Advances**, 2010 [in press].

SKOV, L.; BAADSGAARD, O. The potential role of *Staphylococcus aureus* superantigens in atopic eczema. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 7, p. S8-S11, 1996 (Suppl. 1).

SLAMA, P.; SLADEK, Z.; RYSANEK, D.; LANGROVA, T. Effect of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* on apoptosis of bovine mammary gland lymphocytes. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 2, p. 233-238, 2009.

STEPHAN, R.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A. A.; LAMMLERB, C. H. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 373-382, 2001.

STILES, B. G.; KRAKAUER, T. Staphylococcal enterotoxins: a purging experience in Review, Part 1. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 27, n. 23, p. 179-186, 2005a.

STILES, B.G.; KRAKAUER, T. *Staphylococcal* enterotoxins: a purging experience in Review, Part 2. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 27, n. 24, p. 187-193, 2005b.

STREVETT, K. A.; CHEN, G. Microbial surface thermodynamics and applications. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 329-335, 2003.

SOARES, M. J. S.; TOKUMARU-MIYZAKI, N. H.; NOLETO, A. L. S.; FIGUEIREDO, A. M. S. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of Brazilian epidemic MRSA clone (III:B:A) among isolates from food handlers. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, p. 214-221, 1997.

SRINIVASAN, V., SAWART, A. A.; GILLERPIE, B. E.; HEADRICK, S. I.; CEASARIS, L.; OLIVER, S.P. Characterization of enterotoxin and toxic shock syndrome genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. **NMC Annual Meeting Proceedings**, 2006.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. P.; NETO, A. C. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L.; Identification and purification of a new *Staphylococcal* enterotoxina H. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1438-1443, 1995.

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

TAPONEN, S.; PYORALA, S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis – Not so different from *Staphylococcus aureus*? **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 29-36, 2009.

THOMAS, D.; CHOU, S.; DAUWALDER, O.; LINA, G. Diversity in *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 93, p. 24-41, 2007.

THORBERG, B. M.; BRANDSTROM, B. Evaluation of two commercial systems and a new identification scheme based on solid substrates for identifying coagulase-negative *Staphylococci* from bovine mastitis. **Journal Veterinay Medical**, v. 47, p. 683-691, 2000.

TIRADO, C.; SCHIMDT, K. WHO surveillance programme for control of food-borne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. **Journal of Infection**, v. 43, p. 80-84, 2001.

TODD, J. M.; FISHAUT, M.; KAPRAL, F.; WELCH, T. Toxic-shock syndrome associated with phage-group-I *Staphylococci*. **Lancet ii**: p. 1116-1118, 1978.

TSE, H. Y.; YU, G. K.; WANG, K. C.; WANG, S. J.; CHANG, M. Y.; LIN, L. Y. Comparison of the enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin 1 (TST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. **Food Microbiology**, v. 15, p. 33-41, 1998.

ULRICH, R. G. Evolving superantigens of *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 27, p. 1-7, 2000.

UNNERSSTAD, E. H.; LINDBERG, A.; WALLER, K. P.; EKMAN, T.; ARTURSSON, K.; NILSSON-OST, M.; BENGTSSON, B. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. **Veterinary Microbiology**, v. 12, p. 1-21, 2009.

VALLE, J.; GOMEZ-LUCIA, E.; PIRIZ, S.. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1323-1326, 1990.

VANCRAEYNEST, D.; HERMANS, K.; HAESEBROUCK, F. Prevalence of genes encoding exfoliative toxins, leucotoxins and superantigens among high and low virulence rabbit strains. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 211-218, 2006.

VAN LOOSDRECHT, M.C.M.; LYKLEMA, J.; NORDE, W.; SCHRAA, G.; ZEHNDER, A.J.B. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 1893-1897, 1987.

van OSS, C. J.; GIESE, R. F. The hidrophilicity and hidrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**, v. 43, p. 474-477, 1995.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, A.; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 179-185, 2003.

VAUTOR, E.; MAGNONE, V.; RIOS, G.; LE BRIGAND, K.; BERGONIER, D.; LINA, G.; MEUGNIER, H.; BARBRY, P.; THIERY, R.; PEPIN, M. Genetic differences among *Staphylococcus aureus* isolates from dairy ruminant species: A single-dye DNA microarray approach. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 105-114, 2009.

VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; TONG, L. C.; SHUPP, J. W.; CUMMINGS, C.; SANTOS, D. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CANTINI, A.; NICOLI, J. R.; JETT, M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase negative and coagulase-positive *staphylococcal* isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, p. 410-415, 2008.

VIÇOSA, G. N.; MORAES, P. M.; YAMAZI, A. K.; NERO, L. A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. in raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, rabbit plasma fibrinogen agar and the Petrifilm™ staph express count system. **Food Microbiology**, v. 27, p. 447-452, 2010.

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

ZECCONI, A.; CESARIS, L.; LIANDRIS, E.; DAPRA, V.; PICCINI, R. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. **Microbial Pathogenesis**, v. 40, p. 177-183, 2006

ZELL, C.; RESCH, M.; ROSENSTEIN, R.; ALBRECHT, T.; HERTEL, C.; GOTZ, F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, p. 246-251, 2008.

ZOUHAROVA, M.; RYSANEK, D. Multiplex PCR and RPLA identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains from bulk tank milk. **Zoonoses Public Health**, v. 55, p. 313-319, 2008.

ZSCHOK, M.; BOTZLER, D.; BLOCHER, S.; SOMMERHAUSER, J.; HAMANN, H. P. Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 569-574, 2000.

ZSCHOCK, M.; KLOPPERT, B.; WOLTER, W.; HAMANN, H. P.; LAMMLER, C. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 243-249, 2005.

WANG, S. C.; WU, C. M.; XIA, S. C.; HUA, Y.; XIA, L. N.; SHEN, J. Z. Distribution of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples of bovine subclinical mastitis cases in two major dairy production regions of China. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 276281, 2009.

WELLENBERG, G. J.; VAN DER POEL, W. H. M.; VAN OIRSCHOT, J. T. Viral infections and bovine mastitis: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 88, p. 27-45, 2002.

WIESER, M.; BUSSE, H. J. Rapid identification of *Staphylococcus Epidermidis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1087-1093, 2000.

YAMAGUCHI, T.; NISHIFUJI, K.; SASAKI, M.; FUDABA, Y.; AEPFELBACHER, M.; TAKATA, T.; OHARA, M.; KOMATSUZAWA, H.; AMAGAI, M.; SUGAI, M. Identification of the *Staphylococcus aureus* *etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 5835-5845, 2002.

YAMASAKI, O., TRISTAN, A., YAMAGUCHI, T., SUGAI, M., LINA, G., BES, M., VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Distribution of the exfoliative toxin D in clinical *Staphylococcus aureus* isolates in France. **Clin. Microbial. Infect.**, v. 12, p. 585-588, 2006.