



CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CARACTERIZAÇÃO DE *Staphylococcus spp.* ISOLADOS DE MASTITE CAPRINA

DANEELLY HENRIQUE FERREIRA

PATOS-PB

2013



CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CARACTERIZAÇÃO DE *Staphylococcus spp.* ISOLADOS DE MASTITE CAPRINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Mestranda: Daneelly Henrique Ferreira

Orientadora: Prof. Dr^a. Maria das Graças Xavier de Carvalho/ Prof. Dr. Clebert José Alves

Patos-PB

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

F383c	<p>Ferreira, Daneelly Henrique Caracterização de <i>Staphylococcus spp.</i> isolados de mastite caprina./ Dannelly Henrique Ferreira – Patos, 2013. 37f. : tabelas.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2013.</p> <p>"Orientação: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Xavier de Carvalho/ Prof. Dr. Clebert José Alves"</p> <p>Referências.</p> <p>1. Resistência Antimicrobiana. 2. Genes Enterotoxigênicos. 3. Intoxicação Alimentar. 4. Leite Caprino. I. Título.</p> <p>CDU 619:636.9</p>
-------	--

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CARACTERIZAÇÃO DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE MASTITE CAPRINA

Dissertação elaborada por
DANEELLY HENRIQUE FERREIRA

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a. Maria das Graças Xavier de Carvalho
UAMV da UFCG/CSTR – PATOS-PB
(Orientadora científica)

Dr. Clebert José Alves
UAMV da UFCG/CSTR – PATOS-PB
(Orientador Acadêmico)

Prof. Dr.^a. Esmeralda Paranhos dos Santos
1º Membro – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB

Prof. Dr.^a. Márcia Almeida de Melo
2º Membro - UAMV da UFCG/CSTR – PATOS-PB

Dedico

À Deus, minha família, amigos e orientadores pelo apoio, incentivo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

Agradecimentos

À Deus pelo privilégio da vida e por me proporcionar a realização de um sonho, ser mestre, que vem acompanhado de uma dádiva divina, ser mãe.

Agradeço a toda a minha família pelo apoio, em particular meu esposo, Eritéssio Freire Santos, pela compreensão e apoio incondicional durante todo o período do mestrado.

Aos meus orientadores, Prof^ª. Maria das Graças Xavier de Carvalho e Prof^º. Celso José Bruno de Oliveira pelos ensinamentos, orientação, apoio e dedicação prestados.

Às colegas de trabalho na UFPB-Campus de Areia, Candice e Geovânia por toda a paciência e ajuda prestada.

Carinhosamente, às minhas amigas pela amizade que supera a distância.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de quadros	08
Resumo	09
Abstract	10
Introdução	11
Referências	12
Capítulo I. Resistência antimicrobiana de <i>Staphylococcus</i> spp. causadores da mastite caprina na Paraíba	13
Abstract	14
Resumo	15
Introdução	15
Material e métodos	16
Resultados	17
Discussão.....	19
Conclusão	20
Referências	20
Capítulo II. Genes codificadores de enterotoxinas de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de leite caprino	25
Abstract	26
Resumo	26
Introdução	27
Material e Métodos	27
Resultados e Discussão	28
Conclusões	29
Referências	29
Conclusões	33
Anexo I . Normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira	34

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Capítulo I. Resistência antimicrobiana de <i>Staphylococcus</i> spp. causadores da mastite caprina na Paraíba	13
Quadro 1. Espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. isolados de mastite caprina na Paraíba	23
Quadro 2. Resistência de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos e positivos isolados de casos de mastite caprina na Paraíba	23
Quadro 3. Resistência a meticilina e produção de betalactamase em <i>Staphylococcus</i> causadores e mastite caprina na Paraíba	24
Quadro 4. <i>Staphylococcus</i> spp. multi-resistentes isolados de mastite caprina na Paraíba	24
Capítulo II. Genes codificadores de enterotoxinas em <i>Staphylococcus aureus</i> isolados de leite caprino	25
Quadro 1. Sequência de primers e tamanho dos amplificadores de cada reação de PCR uniplex almejando os genes sea-see e seg-sei em <i>S. aureus</i> isolados de leite caprino na Paraíba	32
Quadro 2. Frequência de genes de enterotoxinas encontrados em <i>S. aureus</i> isolados de leite caprino na Paraíba	32

RESUMO

A resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. bem como a identificação de genes enterotoxigênicos de *S. aureus* de mastite caprina, torna o leite passível de disseminação de cepas potencialmente patogênicas para os consumidores, assumindo destacada importância na saúde pública uma vez que o estado da Paraíba destaca-se com grande produção leiteira caprina no País. Dessa forma, objetivou-se avaliar a resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina e identificar genes produtores de enterotoxinas de *S. aureus*. Os dois trabalhos foram enviados ao Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia. A identificação das espécies e a determinação da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos foram realizadas pelo método de microdiluição em placas através de equipamento semi automatizado (Autoscan4®, Siemens) baseado em painéis colorimétricos, fundamentando-se em critérios definidos pela CLSI (2012). Foram identificados 55 *S. aureus*, 56 *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) e 162 *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN). Os maiores índices de resistência foram observados para ampicilina (100%) e penicilina (42%) e os menores para nitrofurantoína (4%), trimetropin/sulfametaxol (8,8%) e ceftriaxona (8,8%). Quanto a produção de β -lactamase, 131 (48%) cepas foram produtoras e 77 (28%) apresentaram múltipla resistência a quatro ou mais antibiótico. As cepas de *S. aureus* foram analisadas quanto a produção de genes enterotoxigênicos através de PCR (Reação de cadeia em Polimerase) individuais. Verificou-se que 19,5% das cepas foram positivas quanto a presença de genes enterotoxigênicos e dois genótipos foram identificados, *sec* (16,7%) e *sei* (2,8%). Não se observou associação de dois ou mais genes em uma mesma cepa.

PALAVRAS- CHAVE: genes enterotoxigênicos, intoxicação alimentar, leite caprino, mastite caprina, resistência antimicrobiana, *Staphylococcus* spp..

ABSTRACT

Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. and the identification of genes of enterotoxigenic *S. aureus* mastitis in goats, the milk becomes subject to dissemination of potentially pathogenic strains for consumers, assuming outstanding importance in public health as the state of Paraíba stands with large dairy goats in Brazil. Thus, this study aimed to evaluate the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from goat mastitis and identify genes producing enterotoxins *S. aureus*. Both works were sent to the Brazilian Archives of Veterinary Medicine and Animal Science. Species identification and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobials were performed by using microdilution plates using semi automated equipment (Autoscan4 ®, Siemens) based on colorimetric panels, basing on criteria defined by the CLSI (2012). We identified 55 *S. aureus*, 56 coagulase positive *Staphylococcus* (CPS) and 162 coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS). The highest rates of resistance were observed for ampicillin (100%) and penicillin (42%) and lowest for nitrofurantoin (4%), trimethoprim / sulfametaxozol (8.8%) and ceftriaxone (8.8%). As the production of β -lactamase, 131 (48%) strains were producing and 77 (28%) showed multiple resistance to four or more antibiotics. The strains of *S. aureus* were analyzed for the production of enterotoxigenic genes by PCR (Polymerase chain reaction in) individual. It was found that 19.5% of the strains were positive for the presence of genes and enterotoxigenic two genotypes were identified *sec* (16.7%) and *sei* (2.8%). There was no association of two or more genes in the same strain.

KEY WORD: antimicrobial resistance, food poisoning, genes enterotoxigenic, goat milk, goat mastitis, *Staphylococcus* spp.

INTRODUÇÃO

A agropecuária representa a principal fonte de renda para os produtores rurais familiares da Paraíba, destacando-se a caprinocultura leiteira que atualmente tem sido impulsionada por incentivos governamentais e privados com a finalidade de melhorar a qualidade do leite e seus derivados, com vistas à certificação de origem do leite de cabra e como modelo para as demais regiões do país.

A qualidade do leite assume destacada importância sob o ponto de vista de saúde pública. No Brasil são frequentes os casos de doenças associadas ao consumo de leite cru ou de derivados produzidos com leite contaminado com microrganismos patogênicos. Contribui para isto o fato de mais de 35-42% do leite consumido no país ser proveniente do mercado informal (RALL et al, 2008).

Dentre os diversos tipos de microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos através do leite e derivados, destacam-se os *Staphylococcus spp.* caracterizando um sério problema de saúde pública. Os *S. aureus* estão frequentemente associados a casos de surtos de intoxicação alimentar, devido à habilidade de muitas de suas cepas produzirem vários tipos de enterotoxinas (OMOE et al., 2005).

É necessidade premente a identificação dos agentes causadores da mastite caprina como ferramenta indispensável no controle da qualidade desse alimento. Para combater os agentes causadores dessa enfermidade são utilizados indiscriminadamente antibióticos de amplo espectro de ação, prática que contribui para o surgimento de resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais.

Nesse norte o diagnóstico preciso dos agentes etiológicos causadores da infecção é fundamental para incorporação de medidas eficientes de controle da mastite subclínica. Apesar dos vários projetos em execução na região voltados à melhoria da qualidade do leite como matéria-prima e seus derivados, nenhum foca o isolamento dos agentes causadores da mastite caprina e sua resistência aos antimicrobianos. Desta maneira, este estudo contribuirá para auxiliar a cura com novos protocolos terapêuticos, minimizando as perdas econômicas causadas pela enfermidade em rebanhos caprinos leiteiros na região paraibana, promovendo saúde e aumento na qualidade do leite caprino comercializado.

REFERÊNCIAS

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

OMOE, K. et al. 2005. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.246, n.2, p.191-198.

CAPÍTULO I

Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. causadores da mastite caprina na Paraíba

Enviado à Pesquisa Veterinária Brasileira

Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus spp* causadores da mastite caprina na Paraíba¹

Daneelly H.Ferreira², Maria Júlia Nardelli², Candice M. C. de Leon³, Layze C. A. Silva², Felício Garino Júnior², Celso J. B. Oliveira³, Maria das Graças X. Carvalho^{2*}

ABSTRACT. – Ferreira D. H.², Nardelli M. J.², Candice M. C. de Leon³, Layze C. A. Silva², Garino Júnior F.², Carvalho M. G. X.², Oliveira C. J. B.³. 2013. [**Antimicrobial resistance of *Staphylococcus spp* mastitis in goats Paraíba**] Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus spp* causadores da mastite caprina na Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal, CSTR, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, CEP 58700-000. *autor para correspondência: mgxc@bol.com.br.

Paraíba is highlighted as one of the largest producers of goat milk in the country. This study aimed to determine the species and resistance rate of *Staphylococcus spp* strains isolated from goat milk with mastitis in Paraíba (n = 273). The identification of the species as well as the minimum inhibitory concentration (MIC) were performed with the aid of semi automated equipment (Autoscan4®, Siemens) which is based on the use of panels (Combo PC33; Siemens; Gram Positivo Desidratado) colorimetric biochemical tests, basing on criteria defined by the CLSI (2012). We identified 55 *S. aureus*, 56 coagulase positive *Staphylococcus* (CPS) and 162 coagulase negative *Staphylococcus* (CNS). The highest rates of resistance were observed for ampicillin (100%) and penicillin (42%) and lowest for nitrofurantoin (4%), trimethoprim / sulfametaxozol (8.8%) and ceftriaxone (8.8%). As the production of β -lactamase, 131 (48%) strains were producing and 77 (28%) showed multiple resistance to four or more antibiotics. Comparing the species and antibiotic resistance observed (p <0.05) than the CNS possessed greater resistance than against some antimicrobial CPS.

INDEX TERMS: goat milk, *S. aureus*, MIC

¹Recebido em

Aceito para publicação em

²Universidade Federal de Campina Grande, CSTR, Patos, PB, CEP 58700-000,* autor para correspondência: mgxc@bol.com.br

³Universidade Federal da Paraíba, CCA, Areia, PB, CEP:

RESUMO.- A Paraíba destaca-se como um dos maiores produtores de leite caprino do país. Este estudo objetivou determinar as espécies e taxa de resistência de *Staphylococcus spp.* de cepas isoladas de leite caprino com mastite na Paraíba (n=273). A identificação das espécies e a concentração inibitória mínima (CIM) foram realizadas com o auxílio do equipamento semi automatizado (Autoscan4®, Siemens), que é baseado na utilização de painéis (Combo PC33; Siemens; Gram Positivo Desidratado) colorimétricos de provas bioquímicas, fundamentando-se em critérios definidos pela CLSI (2012). Foram identificados 55 *S. aureus*, 56 *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) e 162 *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN). Os maiores índices de resistência foram observados para ampicilina (100%) e penicilina (42%) e os menores para nitrofurantoína (4%), trimetropin/sulfametaxozol (8,8%) e ceftriaxona (8,8%). Quanto a produção de β -lactamase, 131 (48%) cepas foram produtoras e 77 (28%) apresentaram múltipla resistência a quatro ou mais antibiótico. Comparando as espécies quanto a resistência antimicrobiana observou-se ($p < 0,05$) que os SCN possuíram resistência maior do que SCP frente a alguns antimicrobianos. Os *Staphylococcus spp.* apresentaram altas taxas de resistência em especial para ampicilina e penicilina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: CIM, leite caprino, *Staphylococcus spp.*

INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho caprino com cerca de 10,5 milhões de cabeças e produz anualmente 135 milhões de litros de leite de cabra, sendo o maior produtor do continente americano. A região Nordeste possui um efetivo de cabras superior a 90% do total nacional na produção de leite (IBGE 2010). A caprinocultura leiteira é, historicamente, uma atividade de subsistência familiar característica dessa região e tem sido uma atividade cada vez mais promissora na Paraíba, assumindo um importante papel no agronegócio brasileiro. Em contrapartida há um grande problema enfrentado nesta prática como escassez de suporte técnico e baixo nível educacional dos produtores. Essa situação deve nortear as pesquisas científicas em busca de soluções para melhorar a qualidade do leite produzido.

A mastite caprina é causada principalmente por estafilococos é a responsável por grandes prejuízos econômicos e perda da qualidade do leite, uma vez que os produtores, para combater essa enfermidade, utilizam antimicrobianos de forma indiscriminada. Nesse sentido existe uma preocupação com o surgimento de resistência antimicrobiana

às drogas convencionais, demonstrando a necessidade de realização de testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro*. (Silva et al, 2004). Desta forma o conhecimento dos agentes causadores da mastite bem como a sensibilidade destes frente aos antimicrobianos, é fundamental para a compreensão dos aspectos de resistência em propriedades familiares, podendo incentivar órgãos governamentais à desenvolverem programas regionais voltadas ao uso racional de antibióticos.

Considerando a importância da caprinocultura leiteira no nordeste do Brasil, este estudo objetivou identificar os agentes causadores da mastite caprina assim como determinar a sua resistência antimicrobiana *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos municípios paraibanos produtores de leite de cabra. As coletas foram realizadas em dois períodos do ano (chuvoso e seco), durante os meses de maio de 2010 a maio de 2011. As amostras foram coletadas em 393 propriedades leiteiras do Sertão e Borborema.

Foram coletados 2024 amostras de leite de 1012 cabras em lactação com finalidade de isolamento microbiano. Antes da coleta foram descartados os primeiros jatos de leite e colhidos 10 mL de leite em tubos de ensaio estéreis, acondicionadas em recipientes isotérmicos e transportados ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), campos de Patos.

As amostras de leite foram homogeneizadas e repassadas com alça de platina para o cultivo em placas com meio de cultura agar sangue ovino 5%. Essas foram incubadas em condições de aerobiose em estufa a 37 °C, sendo realizadas leituras com 24, 48 e 72 horas, para observação das características macro e microscópicas. Os microorganismos isolados foram submetidos à prova bioquímica da catalase e ao exame bacterioscópico pelo método de Gram. Os que foram identificados como cocos gram-positivos para melhor crescimento e identificação foram repicados em meio agar manitol, e mantidos na estufa em aerobiose a 37 °C por 24 horas. Posteriormente foi realizado o repique das amostras em caldo BHI (Brain Heart Infusion), seguido o crescimento das mesmas, efetivou-se o seu congelamento em caldo BHI acrescido de glicerol, depois foram transportadas para o Laboratório de Análises de Produtos de

Origem Animal (LAPOA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), campus de Areia.

Das 2024 amostras de leite, foram isoladas 273 amostras com características do gênero *Staphylococcus* spp. Posteriormente as amostras foram submetidas à análise de identificação das espécies com o auxílio do equipamento semi automatizado (Autoscan4®, Siemens) o qual é baseado na utilização de painéis (Combo PC33; Siemens; Gram Positivo Desidratado) colorimétricos de provas bioquímicas.

A determinação da resistência antimicrobiana foi realizada pelo método de microdiluição em placas através de equipamento semi automatizado (Autoscan4®, Siemens) baseado em painéis colorimétricos, fundamentando-se em critérios definidos pela CLSI (2012), contendo os seguintes antibioticos e seus respectivos pontos de corte ($\mu\text{g.mL}^{-1}$): ampicilina/sulbactam ($\geq 32/16$), ampicilina (≥ 0.5), amoxicilina/Clavuranato de K ($\geq 8/4$), ceftriaxona (≥ 64), clindamicina (≥ 4), ciprofloxacina (≥ 4), daptomicina (≥ 2), eritromicina (≥ 8), gentamicina (≥ 16), nitrofurantoína (≥ 128), sinercid (≥ 4), levofloxacina (≥ 8), linezolid (> 4), moxifloxacina (≥ 8), oxacilina (≥ 0.5 para SCN e ≥ 4 para *S.aureus/S.lugdunensis*), penicilina G (≥ 0.25), rifampina (≥ 4), trimetoprim/sulfametoxazol ($\geq 4/76$), tetraciclina (≥ 16), vancomicina (≥ 32 para SCN e ≥ 16 para *S. aureus*). Como controle, foi utilizado *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

O teste exato de Fisher ($p > 0,05$) foi usado para identificar a possibilidade de associação entre as espécies de *Staphylococcus* (Coagulase positiva e negativa) com a resistência para os antimicrobianos investigados. Os demais resultados foram usados estatística descritiva para determinar as porcentagens.

RESULTADOS

Das 2024 amostras de leite coletadas, foram obtidos 273 isolados de *Staphylococcus* spp apresentada no Quadro 1, destes 162 (59%) eram SCN e 111 (41%) SCP. As espécies de SCN identificadas foram *S. epidermidis* (48), *S.simulans* (43), *S. haemolyticus* (18), *S. sciuri* (16), *S. xylosus* (8), *S. warneri* (5), *S. hominis* (5), *S. saprophyticus* (5), *S. auricularis* (5), *S. schleiferi* (4), *S. cohnii* (3) e *S. lugdunensis* (2). Dentre as espécies de SCP *S. aureus* (55), *S. hycus* (23), *S. intermedius* (21), *S. schleiferi coagulans* (12).

No Quadro 2 estão demonstrados os resultados de resistência bem como os valores da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos. Verificou-se que os SCP apresentaram resistência principalmente para ampicilina (100%), ampicilina/sulbactam (20%) e eritromicina (18%). Esses isolados apresentaram baixa resistência para nitrofurantoína (2%), ceftriaxone (2%), rifampina (4%) e sinercid (4%).

Altas taxas de resistência para os isolados de *S. aureus* foram observadas para ampicilina (100%), eritromicina (42%) e penicilina G (35%), no entanto todos foram susceptíveis a nitrofurantoína. Baixas taxas de resistência foram observadas para trimetoprim/sulfametoxazol (4%) e ampicilina/sulbactam (5,5%).

Nas espécies de SCN foram constatadas altas taxas de resistência contra o grupo dos β -lactâmicos, principalmente para ampicilina (100%), Penicilina G (56%) e Oxacilina (27%), conforme demonstrada na Quadro 3. Elevadas taxas de resistência foram também observadas para eritromicina (43%), clindamicina (35%), tetraciclina (34%). Baixa resistência foi observada para ceftriaxone (3%), nitrofurantoína (6%) e gentamicina (10%).

Comparando a espécie de *Staphylococcus* spp. e a resistência antimicrobiana observou-se resistência maior frente aos antimicrobianos clindamicina, eritromicina, nitrofurantoína, oxacilina, penicilina G, tetraciclina, vancomicina e meticilina.

A Nitrofurantoína apresentou o maior grau de susceptibilidade frente aos antibióticos testados com mais de 90% das amostras susceptíveis e com concentrações menores do que o ponto de corte desse antimicrobiano ($CIM_{90} \leq 32$).

No Quadro 3 observa-se a quantidade de cepas produtoras da enzima beta lactamase e as cepas resistentes a meticilina. Dos 55 *S. aureus* isolados 25 (45,5%) possuíam resistência a pelo menos dois tipos de antimicrobianos β -lactâmicos e 23 (42%) isolados apresentaram produção da enzima beta lactamase. Dentre os demais SCP, 13 (23%) foram produtores de betalactamase. Maior produção de beta-lactamases foi observada em SCN (58,6%). Em relação a resistência a Meticilina os SCN foram os que apresentaram maior quantidade de resistência (18,5%). Dentre os *S. aureus* 10% apresentaram resistência a meticilina.

No Quadro 4 observa-se a múltipla resistência dos *Stahylococcus* spp. frente a 4, 7 e 10 grupos de antimicrobianos diferentes. Identificou-se que todos as espécies de

Staphylococcus apresentaram cepas com múltipla resistência. Nesse contexto, os SCN foram os que apresentaram o maior número de cepas com essa característica (55). Entre os 55 *S. aureus* isolados 13 (23,6%) foram resistentes a quatro ou mais grupos de antimicrobianos de diferentes classes de antibióticos, destes os que apresentaram maior resistência foram os β -lactâmicos e macrolíticos.

DISCUSSÃO

No presente estudo, os SCN foram os principais agentes isolados no leite caprino. Esses patógenos são comumente relacionados a mastites em caprinos leiteiros, concordando com resultados previamente encontrados que afirmam que os SCN são os principais agentes causadores da mastite caprina na região do nordeste brasileiro (Lyra et al. 2013, Neves et al. 2010, Silva et al. 2004) bem como em outros países (Viridis et al. 2010, Ndegwa et al. 2002, Woods et al. 1994).

Altas taxas de resistência de *Staphylococcus* isolados de caprinos leiteiros com mastite foram observadas no presente estudo. Esse resultado pode estar relacionado ao uso indiscriminado de antimicrobianos pelos produtores sem prévia assistência técnica, ou ainda, pelo uso prolongado dessas drogas uma vez que são as de eleição para o combate da mastite caprina. Os *Staphylococcus spp.* analisados indicaram altos índices de resistência a ampicilina (100%) e penicilina G (42%), ambos pertencentes ao grupo dos β -lactâmicos. Resultados semelhantes foram obtidos por Neves et al. (2010), Garino Júnior et al (2011) que apresentaram taxas de resistências a ampicilina (63,89%, 63,89%) e penicilina G (66,67%, 66,67%) respectivamente em estudos realizados no semiárido Paraibano. No entanto, Viridis et al. (2010) ao identificar isolados de *Staphylococcus spp.* de mastite caprina na Itália observaram baixa resistência a ampicilina (30%), provavelmente por esse antimicrobiano ser usado em pequena escala nessa região.

Das 273 amostras de *Staphylococcus spp.*, 77 (28%) apresentaram múltipla resistência a quatro ou mais grupos de antibióticos, os SCN foram os que apresentaram maior quantidade de cepas multi-resistentes (34%) do seu total, 14 foram resistentes a dez ou mais antimicrobianos. Esse achado caracteriza uma alerta para o perigo vinculado a saúde pública pela possível transmissão de cepas super resistentes através do consumo de produtos lácteos, bem como dificulta o tratamento da mastite nos rebanhos, provocando grandes prejuízos econômicos devido a redução da produção láctea.

Resultados semelhantes foram observados por França et al. (2012) que identificaram 88 das 210 cepas de *Staphylococcus spp.* com resistência a quatro ou mais antibióticos na região do nordeste brasileiro.

Do total de isolados 131 (48%) foram positivos a produção da enzima betalactamase, sendo *S.aures* (23), SCP (13) e SCN (95) (Quadro 3). Esse resultado pode explicar os elevados índices de resistências a ampicilina e penicilina. No entanto as cefalosporinas também são do grupo dos β -lactâmicos e apresentaram níveis baixos de resistência como a ceftriaxone com 13%, 2% e 3% para *S. aureus*, SCP e SCN respectivamente. Dentre os *S. aureus*, 5 (10%) foram meticilina resistente (SAMR). Resultado menor foi encontrado por Normano et al. (2007), ao analisarem cepas oriundas de alimentos de origem animal na Italia identificaram apenas 3,75% de SAMR.

CONCLUSÕES

Os *Staphylococcus spp.* apresentaram altas taxas de resistência principalmente para ampicilina e penicilina e múltipla resistência a diferentes grupos de antibióticos em especial os β -lactâmicos.

REFERÊNCIAS

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Métodos para testes de susceptibilidade aos antimicrobianos de diluição para as bactérias que crescem aerobicamente: normas aprovadas- nona edição. CLSI documento M07-A9. Wayne, Pennsylvania.

França, C.A., Peixoto, M.B., Melo, N. F., Oliveira, C. J. B., Veschi, J. A., Mota, R. A., Costa, M. M., 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus spp.* from small ruminants mastitis in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32 (8), 747-753.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: Censo Agropecuário, 2007. Acesso em 09/07/ 2013.

Garino Júnior, F., Camboim, E. K. A., Neves, P. B., de Sá, A. V. V., Almeida, A. P., 2011. Susceptibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no semiárido paraibano. *Arquivos do*

Instituto de Biologia, 78, n.1, 103-107.

Lyra, D. G., Sousa, F. G. C., Borges, M. F., Giviziez, P. E. N., Queiroga, R. C. R. E., Souza, E. L., Gebreyes, W. A., Oliveira, C. J. B., 2013. Enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus* spp. from bulk goat milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, n.2, 126-130.

Ndegwa E.N, Mulei C.M, Munyua S. J. M. 2002. Prevalence of various microbial organisms isolated from dairy goat Milk samples in central Kenya highlands. *The Kenyan Veterinarian*, 25, 9-11.

Neves, P. B., Medeiros, E. S., Sá, V. V., Camboim, E. K. A., Garino Júnior, F., Mota, R. A., Azevedo, S.S., 2010. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 30(5), 379-384.

Normano, G., Corrente, M., Salandra, G.L., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Parisi, A., Greco, G., Bellacicco, A. L., Virgulino, S., Celano, G. V., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International journal of Food Microbiology*, v.117, 219-222.

Silva, E.R., Siqueira, A. P., Martins, J. C. D., Ferreira, W. P. B., Silva, N., 2004. Identification in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. *Small Ruminant Research*, v. 55, 45-49.

Virdis, S., Scarano, C., Cossu, F., Spanu, V., Spanu, C., Santis, E. P. L., 2010. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative Staphylococci isolated from goat with subclinical mastitis. *Veterinary Medicine International*, v.2010, ID 517060, 1-6.

Woods, G.L, Latemple, D., Cruz, C. 1994. Evaluation of MicroScan Gram-Positive Panels for Detection of Oxacillin-Resistant Staphylococci. *Journal of clinical microbiology*, v.32, n.4, 1058-1059.

1 Quadro 1. Espécies de *Staphylococcus spp.* isolados de mastite caprina na Paraíba

SCN	Quantidade de isolados (%)	SCP	Quantidade de isolados (%)	2
<i>S. epidermidis</i>	48 (17,6%)	<i>S. aureus</i>	55 (20%)	3
<i>S. simulans</i>	43 (15,7%)	<i>S. hycus</i>	23 (8,4%)	
<i>S. haemolyticus</i>	18 (6,6%)	<i>S. intermedius</i>	21 (7,7%)	4
<i>S. sciuri</i>	16 (6%)	<i>S. schleiferi coagulans</i>	12 (4,6%)	
<i>S. xylosus</i>	8 (3%)			5
<i>S. warneri</i>	5 (1,8%)			
<i>S. hominis</i>	5 (1,8%)			6
<i>S. saprophyticus</i>	5 (1,8%)			
<i>S. auricularis</i>	5 (1,8%)			7
<i>S. schleiferi</i>	4 (1,5%)			
<i>S. cohnii</i>	3 (1%)			
<i>S. lugdunensis</i>	2 (0,7%)			

8

9 Quadro 2. Resistência de *Staphylococcus* coagulase negativos e positivos isolados de casos de mastite caprina na Paraíba

10

Antibiotics	<i>S. aureus</i> (n=55)				SCP (n=56)				SCN (n=162)			
	Resistant	PC	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Resistant	PC	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Resistant	PC	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Ampicilina/sulbactan	5,5%	≥32/16	≤ 8/4	≤ 8/4	20%	≥32/16	≤ 8/4	>16/8	15%	≥32/16	≤ 8/4	>16/8
Ampicilina	100%	≥0,5	≤ 2	>8	100%	≥0,5	≤ 2	8	100%	≥0,5	≤ 2	>8
Oxacillin	18%	≥4	≤ 0.25	>2	11%	≥0,5	≤ 0.25	0.5	27%	≥0,5	≤ 0.25	>2
Penicillin G	35%	≥0,25	≤ 0.03	>8	16%	≥0,25	≤ 0.03	>8	54%	≥0,25	0.25	>8
Clindamycin	22%	≥4	≤ 0.5	>4	14%	≥4	≤ 0.5	2	35%	≥4	≤ 0.5	>4
Erythromycin	42%	≥8	≤ 0.5	>4	18%	≥8	≤ 0.5	>4	43%	≥8	≤ 0.5	>4
Nitrofurantoin	0%	≥128	≤ 32	≤ 32	2%	≥128	≤ 32	≤ 32	6%	≥128	≤ 32	≤ 32
Ceftriaxone	13%	≥64	≤ 8	32	2%	≥64	≤ 8	≤ 8	3%	≥64	≤ 8	≤ 8
Gentamicin	24%	≥16	≤ 4	>8	7%	≥16	≤ 4	≤ 4	10%	≥16	≤ 4	≤ 4
Tetracycline	20%	≥16	≤ 4	>8	13%	≥16	≤ 4	8	34%	≥16	≤ 4	>8
Rifampin	15%	≥4	≤ 1	>2	4%	≥4	≤ 1	≤ 1	15%	≥4	≤ 1	>2
Synercid	16%	≥4	≤ 0.5	>2	4%	≥4	≤ 0.5	≤ 0.5	17%	≥4	≤ 0.5	>2
Trimethopim/sulfametaxazole	4%	≥4/76	≤ 0.5/9.5	≤ 0.5/9.5	9%	≥4/76	≤ 0.5/9.5	≤ 0.5/9.5	11%	≥4/76	≤ 0.5/9.5	>2/38
Vancomycin	11%	≥16	1	4	5%	≥32	1	2	19%	≥32	1	>16

MIC50 e 90: Concentração inibitória mínima de 50% e 90% das amostras;PC: Ponto de Corte;

Quadro 3. Resistência a metilina e produção de betalactamase em *Staphylococcus* causadores e mastite caprina na Paraíba

	<i>S. aureus</i>		SCP		SCN	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Produção de betalactamase	23	42%	13	23%	95	58,6%
Metilina Resistência	5	10%	3	5,4%	30	18,5%

Quadro 4. *Staphylococcus spp.* multi-resistentes isolados de mastite caprina na Paraíba

	<i>S. aureus</i>		SCP		SCN	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
4 antimicrobianos	3	5,5%	5	8,9%	20	12,3%
7 antimicrobianos	6	11%	4	7,1%	21	13%
10 antimicrobianos	4	7,1%	0	0%	14	8,7%
TOTAL	13	23,6%	9	16%	55	34%

CAPÍTULO II

Genes codificadores de enterotoxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite caprino

Genes codificadores de enterotoxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite caprino¹

Daneelly H. Ferreira², Maria J. Nardelli², Francisca G. C. Sousa³ Celso J. B. de Oliveira³ M^a das Graças X. Carvalho^{2*}

ABSTRACT.-Ferreira D.H., Nardelli M.J., Sousa G. C., Oliveira C. J. B., Carvalho M. G.X., 2013.[**Genes encoding enterotoxins in *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk.**] Genes codificadores de enterotoxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite caprino. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal, UFCG, CSTR, Patos, PB, CEP 58700-000. *autor para correspondência: mgxc@bol.com.br.

Staphylococcus aureus and its enterotoxin are the main etiological agents involved in food poisoning worldwide. By PCR (Polymerase Chain Reaction in) in 36 *S.aureus* was possible to identify the presence of enterotoxigenic genes. Strains of *S. aureus* isolated from goat milk, 7 (19.5%) were producing enterotoxin genes. Two different genotypes were observed *sec* (16.7%) and *sei* (2.8%). Genes *sea*, *seb*, *sed*, *see*, *seg* and *seh* were not detected in this study, as well as associations between different genotypes in the same strain.

INDEX TERMS: enterotoxigenic genes, food poisoning, milk goats, *S. aureus*

RESUMO.- Os *Staphylococcus aureus* e suas enterotoxinas são os principais agentes etiológicos envolvidos nas intoxicações alimentares mundialmente. Através da reação de PCR (Reação de Cadeia em Polimerase) em 36 *S.aureus* foi possível identificar a presença de genes enterotoxigênicos. Das cepas de *S. aureus* isolados de leite caprino, 7 (19,5%) possuíam genes de enterotoxinas. Dois diferentes genótipos foram verificados *sec* (16,7%) e *sei* (2,8%). Os genes *sea*, *seb*, *sed*, *see*, *seg* e *seh* não foram detectados neste estudo, bem como associações entre genótipos diferentes em uma mesma cepa.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: genes enterotoxigênicos, intoxicação alimentar, leite caprino, *S. aureus*

1Recebido em

Aceito para publicação em

2 Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal de Campina Grande, CSTR, Patos, PB, CEP 58700-000.*autor para correspondência: mgxc@bol.com.br

3Universidade Federal da Paraíba, CCA, Areia, PB, CEP:

INTRODUÇÃO

Os alimentos de origem animal, em especial o leite e seus derivados são os maiores responsáveis por intoxicações alimentares. Sabe-se que a incidência das intoxicações variam de acordo com os fatores socioeconômicos e culturais de cada região (Ministério da Saúde, 2010). A região nordeste possui o maior rebanho leiteiro caprino da América do Sul, no entanto ainda não há legislação que regulamente a comercialização do leite caprino, embora sejam usados critérios destinados ao leite bovino existe um grande mercado informal que comercializa leite cru e produtos lácteos sem tratamento térmico expondo a população a riscos eminentes de intoxicações.

Os *Staphylococcus aureus* e suas enterotoxinas são os principais agentes etiológicos envolvidos nas intoxicações alimentares mundialmente. Suas enterotoxinas são termoestáveis e as clássicas (SEA-SEE) são as principais responsáveis por surtos de intoxicações (Jarraud et al., 1990), embora as novas (SEG-SEU) também possam causar (Jarraud et al, 1999).

A maioria das propriedades leiteiras caprinas possui deficiência na sanitização e controle sanitário dos animais contribuindo para a baixa qualidade do leite produzido. Os *Staphylococcus* spp. são os principais causadores da mastite caprina e podem contaminar o leite e produzir suas toxinas. Considerando o potencial risco de contaminação do leite caprino, este estudo objetivou investigar a ocorrência de genes codificadores de enterotoxinas de *S. aureus* em leite caprino produzido na Paraíba.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 2024 amostras de leite de cabras com mastite em 393 propriedades que representam a produção leiteira caprina da Paraíba. As amostras com crescimento bacteriano características do gênero *Staphylococcus* spp foram submetidas à análise de identificação das espécies com o auxílio do equipamento semi automatizado (Autoscan4®, Siemens), baseado na utilização de painéis (Combo PC33; Siemens; Gram Positivo Desidratado) colorimétricos de provas bioquímicas e software (LabPro Connect; Siemens). Conseguiu-se identificar 36 cepas de *Staphylococcus aureus* que foram submetidos a PCR para detecção de genes enterotoxigênicos.

O DNA genômico foi extraído com Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (Fritsch et al, 1989). A qualidade e concentração do DNA foram mensurados através de

biofotômetro (Biophotometer Plus; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Alemanha). Foram realizadas PCR individuais objetivando identificar genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh* e *sei* (Blaiotta et al, 2004). As reações possuíam volume final de 25µL, contendo 0.4mM de cada primer, 200mM de cada DNTP, 2,5mM de MgCl₂, 100ng de DNA molde e 2U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A sequência dos primers e os tamanhos dos produtos da PCR estão evidenciados no Quadro 1. A amplificação foi realizada por termociclador que obedeceu a seguinte programação: um ciclo inicial de 95°C por 3 minutos seguidos por 30 ciclos com etapas de desnaturação a 95°C/30 segundos, anelamento a 55°C/1hora e 15 minutos e uma extensão a 72°C/30 segundos. Uma extensão final a 72°C por 5 minutos foi realizada. Os géis de agarose a 2% foram visualizados em transiluminador após a coloração em solução de Gel Red (Uniscience) realizada em agitação por 30 minutos. A presença ou ausência das bandas foram analisadas em luz ultravioleta. Os controles positivos das reações incluíram *S. aureus* American Type Culture Collection (ATCC) 13565 (*sea*), *S. aureus* ATCC 14458 (*seb*), *S. aureus* ATCC 19095 (*sec*, *seh*, *seg* e *sei*), *S. aureus* ATCC 23235 (*sed*) e *S. aureus* ATCC 27664 (*see*). Foi utilizada análise estatística descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das cepas de *S. aureus* isolados de leite caprino, 7 (19,5%) possuíam genes de enterotoxinas. A frequência dos genes foi baixa quando comparada aos 65,2% encontrado por Scherrer et al. (2004), discrepância é ainda maior quando comparado com leite bovino 89,5% - Rosec e Gigaud (2002), 91,7% - Nader Filho et al. (2007), 68,4% - Rall et al. (2008). Entretanto resultados semelhante foram relatados recentemente por Lyra et al. (2013) que encontrou 23,3% de *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) enterotoxigênico em leite caprino no semiárido paraibano.

Apenas dois diferentes genótipos foram verificados, Quadro 2, entre os genes codificadores de enterotoxinas clássicas, *sec* foi detectada com maior frequência (16,7%). Esse achado corrobora com Scherrer et al. (2004) e Lyra et al. (2013) que verificaram que a *sec* foi encontrada em maior frequência 42% e 55,6% respectivamente. Esses achados confirmam que *sec* é o principal gene encontrado em cepas de *Staphylococcus* em leite caprino (Silva et al. 2005). Os genes *sea*, *seb*, *sed*, *see*, *seg* e *seh* não foram detectados neste estudo. Resultados bastante semelhante foram encontrados por Lyra et al. (2013) ao analisarem cepas de *Staphylococcus* spp. de leite

caprino não identificaram genes de *seb*, *sed*, *see* e *seh*. No Brasil, o gene *sea* é o mais freqüentemente encontrado em isolados de leite bovino (Rall et al. 2008), porém na Alemanha Akineden et al. (2001) avaliando cepas de *S. aureus* oriundas de leite bovino observaram baixa freqüência (5,9%) para *sea*.

Foi identificado o gene *sei* em 2,8% das amostras. Similarmente, na Suíça foi identificada baixa incidência de *sei* (8,2%) em isolados de leite caprino e ovino (Scherrer et al. 2004). Na França Rosec e Gigaud (2002) ao analisarem cepas de *S. aureus* de diferentes produtos de origem animal não observaram alta incidência de *sei*.

Identificação de combinação entre genes codificadores de enterotoxinas isoladas de cepas de *Staphylococcus* spp. são facilmente encontrados no leite caprino e bovino, no entanto no presente estudo não foram encontradas associações. Associação entre os genes *seg/sei* e *sealsej* foram frequentes em isolados de leite caprino e ovino na Suíça (Scherrer et al. 2004). No Semiárido da Paraíba, Brasil, associações foram encontradas entre *seclseg*, *seg/sei*, *sealsej/sei* e *seclseg/sei* (Lyra et al. 2013). Em leite bovino as associações entre os genes *sei/seg*, *sed/sej*, *sealsej/seh* também são freqüentemente observadas em cepas de *S. aureus* (Rall et al. 2008).

CONCLUSÕES

Foi identificado *S. aureus* enterotoxigênico nos isolados de mastite caprina na Paraíba, sendo *sec* a enterotoxina com maior freqüência.

REFERÊNCIAS

- Akineden C.Ö, Annemuller C., Hassan A. A., Lämmli C., Wolter W., Zschöck M. 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v.8,n.5, 959-964.
- Fritsch E. F., Maniatis T., Sambrook J. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 235 p.
- Jarraud S., Cozon G., Vandenesch F., Etienne M. B., Lina G. 1999. Involvement of Enterotoxins G and I in Staphylococcal Toxic Shock Syndrome and Staphylococcal Scarlet Fever. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.2446–2449.

- Johnson W. M., Tyler S. D., Ewa E. P., Ashton F. E., Pollard D. R., Rozze K. R. 1991. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. v.29, n.3, 426-430.
- Lyra D.G et al. 2013. Enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus* spp. From bulk goat milk. Foodborne pathogens and disease. v.10, n.2, 126-130.
- Ministério da Saúde, Brasil. 2010. Secretaria de vigilância epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>
- Nader Filho A., Ferreira L. M., Amaral L. A., Rossi Júnior O. D., Oliveira R. P. 2007. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isolados na mastite bovina. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.59, n.5, 1316-1218.
- Rall V. L. M et al. 2008. PCR detection of Staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strain isolated from raw and pasteurized milk. Veterinary microbiology. V.132, 408-413.
- Rosec J. P. e Gigaud O. 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. International journal of food microbiology. v.77, 61-70.
- Scherrer D., Corti S., Muehlher J. E., Zweifel C., Stephan R. 2004. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank samples of goat and sheep. Veterinary microbiology. v.101, 101-107.
- Silva E. R., Carmo L. S., Silva N. 2005. 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, 103-107.

Quadro 1. Sequência de primers e tamanho dos amplificadores da reação de PCR uniplex para os genes *sea-see* e *seg-sei* em *S. aureus* isolados de leite caprino na Paraíba em 2013

Primer	Sequência (5' 3')	Tamanho do fragmento	Referencia
<i>sea-1</i>	TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA	120	Johnson et al. (1991)
<i>sea-2</i>	GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA		
<i>seb-1</i>	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	478	Johnson et al. (1991)
<i>seb-2</i>	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC		
<i>sec-1</i>	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	257	Johnson et al. (1991)
<i>sec-2</i>	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC		
<i>sed-1</i>	GTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	317	Johnson et al. (1991)
<i>sed-2</i>	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG		
<i>see-1</i>	CAA AGA AAT GCT TTA AGC AAT CTT AGG CCAC	482	Jarraud et al. (1999)
<i>see-2</i>	CTT ACC GCC AAA GCTG		
<i>seg-1</i>	AAT TAT GTG AAT GCT CAA CCC GATC	642	Jarraud et al. (1999)
<i>seg-2</i>	AAA CTT ATA TGG AAC AAA AGG TAC TAG TTC		
<i>seh-1</i>	CAA TCA CAT CAT ATG CGA AAG CAG	376	Jarraud et al. (1999)
<i>seh-2</i>	CAT CTA CCC AAA CAT TAG CACC		
<i>sei-1</i>	CTC AAG GTG ATA TTG GTG TAGG	577	Jarraud et al. (1999)
<i>sei-2</i>	AAA AAA CTT ACA GGC AGT CCA TCTC		

Quadro 2. Frequência de genes de enterotoxinas encontrados em *S. aureus* isolados de leite caprino na Paraíba

Genes codificadores de enterotoxinas	Quantidade	Porcentagem
<i>sea</i>	0	-
<i>seb</i>	0	-
<i>sec</i>	6	16,7%
<i>sed</i>	0	-
<i>see</i>	0	-
<i>seg</i>	0	-
<i>seh</i>	0	-
<i>sei</i>	1	2,8%

CONCLUSÕES

Os *Staphylococcus spp.* isolados de mastite caprina em propriedades leiteiras da Paraíba apresentaram altas taxas de resistência principalmente para ampicilina e penicilina e múltipla resistência a diferentes grupos de antibióticos em especial os β -lactâmicos.

Foi identificado *S. aureus* enterotoxigênico nos isolados de mastite caprina na Paraíba, sendo *sec* a enterotoxina com maior frequência.

ANEXO I
NORMAS DA REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). **Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.**

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto

significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

- a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;
- b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.
- c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso)**;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do trabalho que serviu de fonte, será **incluída na lista uma só vez**. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse **caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas , com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.