

Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas

Importance of *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis: presence of enterotoxins, shock syndrome toxin and relationship with somatic cell count

Marcos Eielson Pinheiro de Sá¹;
Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da CUNHA²;
Acacia Orieth ELIAS³;
Cassiano Victória³;
Helio LANGONI³

1 – Serviço de Vigilância Agropecuária da Delegacia Federal da Agricultura do Paraná - PR

2 – Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu -SP

3 – Núcleo de Pesquisa em Mastites (NUPEMAS) da Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu - SP

Resumo

O *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes das mastites consideradas contagiosas, apresentando elevada incidência na maioria dos rebanhos leiteiros em vários países. Além de perdas econômicas é importante salientar o aspecto de saúde pública para cepas produtoras de enterotoxinas e da toxina do choque tóxico. A enterotoxina A, relacionada com maior ênfase nos casos de toxinfecções alimentares, pode ser veiculada pelo leite cru, pasteurizado e subprodutos lácteos. A síndrome do choque tóxico é determinada mais frequentemente pela toxina do choque tóxico, porém as enterotoxinas do tipo B e C também podem ser implicadas. O objetivo deste estudo foi verificar a ocorrência de *S.aureus* produtores de enterotoxinas e da toxina do choque tóxico em amostras de leite de animais com mastite subclínica, e correlacionar estes resultados com a contagem de células somáticas; utilizando a técnica de “celofane over agar” para detecção da TNAase, kit comercial para identificação das enterotoxinas e contagem eletrônica de células somáticas. Avaliou-se 209 amostras de leite oriundas de vacas com mastite subclínica por *S.aureus*, e dentre estas, 209 (98,86%) produziram TNAase, nove amostras (4,39%) foram produtoras de enterotoxinas, sendo que uma (0,49%) dentre elas foi produtora de EED, três (1,46%) de EEC, e três (1,46%) de EEB. Em uma amostra (0,49%), detectou-se concomitantemente EEA e EEB e em outra EEB e EEC. A toxina do choque tóxico não foi encontrada nas cepas avaliadas neste estudo, assim como não houve aumento estatisticamente significativo, na contagem de células somáticas, das amostras de cepas produtoras de enterotoxinas.

Palavras-chave:

Mastite.
Subclínica.
Bovino.
Staphylococcus aureus.
Enterotoxinas

Correspondência para:

HELIO LANGONI
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade Estadual Paulista
Distrito de Rubião Júnior, s/n
18618-000 – Botucatu – SP
hlangoni@fmvz.unesp.br

Recebido para publicação: 05/11/2003
Aprovado para publicação: 18/05/2004

Introdução

Os estafilococos são importantes agentes causadores de mastites, destacando-se entre eles o *Staphylococcus aureus*, como

patógeno das mastites classificadas como contagiosas. As taxas de isolamento são variáveis de acordo com diferentes autores, entretanto, o mesmo tem sido considerado como de maior significado nas infecções

intramamárias. Quanto a sua participação nas mastites, sejam clínicas ou subclínicas, encontraram-no em 52,1%; 16,9% e 76,5% dos casos, respectivamente.^{1,2,3}

Outros autores obtiveram-no também como microrganismo mais frequente, em 46,2%; 28,9%; e 37,1%, respectivamente.^{4,5,6} Langoni et al.⁷ isolaram o *S.aureus* em 35,53% nas 702 amostras de leite procedentes de vaca com mastite subclínica. Castrejón e Perea⁸ relataram a sua presença em 85% dos 50 casos de mastite clínica, e Obritzhauser, Deutz e Fuks⁹ em 27,3% dos casos.

Mostrando as possíveis variações regionais, Wilson, Gonzales e Das¹⁰ trabalharam com rebanhos nos estados de Nova York e Pensilvânia (EUA) e encontraram 9,1% de casos de mastites por *S.aureus*. No Estado do Paraná foram registrados o envolvimento deste patógeno em 17,97% das amostras examinadas.¹¹

A importância do gênero *Staphylococcus* spp ficou também evidente para Langoni et al.¹² que trabalhando com 7902 e 850 amostras de leite provenientes de casos de mastites subclínicas e clínicas, respectivamente, onde o agente foi encontrado em 32,68% das amostras de casos clínicos e 18,88% dos casos subclínicos, com isolamento de *S.aureus* em 22,48% dos casos clínicos e em 11,38% dos subclínicos.

Quanto aos aspectos de saúde pública, relacionados à produção de enterotoxinas pelo *S.aureus*, De Freitas e Magalhães¹³, estudando a enterotoxigenicidade de 93 amostras de *S.aureus* encontraram 1,07% produtoras de enterotoxina biótipo A, reconhecida como a principal implicada em casos de toxinfecções alimentares. Amostras de *S.aureus* enterotoxigênicos têm sido isoladas de leite pasteurizado, iogurte caseiro, leite em pó, achocolatados e sorvetes, bem como de outros subprodutos lácteos. A fonte de contaminação podem ser, tanto o leite oriundo de vacas com mastite como os manipuladores envolvidos¹⁴. Sabe-se que a intoxicação estafilocócica não é de

notificação compulsória e desta forma é impossível precisar a sua real incidência. Mead et al.¹⁵ estimaram nos EUA a ocorrência de 185.060 casos anuais.

As enterotoxinas estafilocócicas são divididas em 11 tipos: A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, TSST-1, G, H e I, e com base nas diferenças sorológicas a enterotoxina C é subdividida em EEC₁, EEC₂ e EEC₃¹⁶.

Araújo et al.¹⁷ encontraram uma (0,5%) amostra de *S.aureus* enterotoxigênica em leite cru, proveniente de tanque de expansão. Orden et al.¹⁸, estudaram 81 amostras, sendo 43 de ovinos, 12 de caprinos e 26 de bovinos, com enterotoxigenicidade em 86%, 67% e 19%, respectivamente. A EEC foi encontrada com maior frequência (57%), seguida pela EEA (12%), EEB e EEC (5%). A TSST-1 foi produzida em 67% das amostras e em 42% daquelas procedentes de bovinos.

Em 57 amostras de *Staphylococcus* spp isolados de casos de mastite, na Espanha, encontraram três (5,26%) produtoras de EEC e uma (1,78%) de EED¹⁹. Consideraram o leite proveniente de vacas mastíticas com baixo potencial de risco para intoxicação alimentar. No Brasil, em 127 amostras de *S.aureus* procedentes de mastite subclínica encontraram seis (4,7%) produtoras de enterotoxinas, sendo uma de EEC, uma de EEA e três de A e C, concomitantemente.²⁰

A síndrome do choque tóxico (TST) é determinada mais frequentemente pela toxina do choque tóxico (TSST-1), entretanto podem estar envolvidas ainda as enterotoxinas dos tipos B e C²¹. A produção de TSST-1 pela primeira vez, e de EEC por *S.aureus* isolados em cultura pura de mastite bovina em um rebanho foi relatada por Jones e Wieneke²². É possível que a TSST-1 represente um fator de virulência importante em casos graves de mastites segundo Cardoso, Carmo e Silva²³ que fizeram a primeira descrição da produção desta toxina por *S.aureus* isolado de mastites no Brasil.

Levando-se em consideração os aspectos de saúde pública este trabalho teve

por objetivos, verificar a ocorrência de *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxinas e de toxina do choque tóxico, de casos de mastite bovina, e correlacionar com os resultados obtidos com a contagem de células somáticas, das respectivas amostras de leite.

Materiais e Métodos

Foram examinadas 1662 vacas primíparas e múltiparas em diferentes fases de lactação, puras e mestiças das raças Holandês Preto e Branco, Gir e Girolando, procedentes de 20 propriedades leiteiras, localizadas nos municípios de Avaré, Botucatu e Pardinho, no Estado de São Paulo.

As amostras foram obtidas após exame clínico do úbere pela inspeção das glândulas mamárias e exame dos três primeiros jatos de leite em caneca de fundo negro, para detecção de mastite clínica, bem como o *California Mastitis Test* (CMT) para a detecção de mastite subclínica.²⁴ Em caso de positividade, foram colhidas amostras de 20 mL em tubos estéreis devidamente identificados, após a lavagem prévia das glândulas com água e sabão, secagem com papel toalha e desinfecção do óstio do teto com álcool etílico a 70° GL. Após condicionamento sob temperatura de refrigeração, foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia e Citologia Láctea do Núcleo de Pesquisa e Mastites (NUPEMAS), do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus Botucatu.

Os exames microbiológicos foram realizados semeando-se 0,1 mL de leite em placas contendo 20 mL de ágar sangue bovino a 10% e de ágar Mac Conkey, incubando-se em condições aeróbicas a 37°C, por até 96 horas, com observação do desenvolvimento microbiano a cada 24 horas. Os agentes isolados foram identificados de acordo com as características

morfológicas das colônias e morfotintoriais, pela técnica de Gram, além de provas bioquímicas e taxonômicas^{25,26}, realizadas a partir de amostras bacterianas obtidas do repique de duas a três colônias do agente em meio de caldo infuso cérebro-coração, como catalase, coagulase em tubo, clumping factor, crescimento e fermentação em manitol salt agar, fermentação da maltose e uréia, resistência à polimixina B (300 UI), sensibilidade à novabiocina (5mg) e produção de desoxirribonuclease. Após classificação, as amostras de *S.aureus* foram estocadas em tubos de ensaio com tampa de rosca contendo 5 mL de ágar nutriente, mantidos a temperatura de refrigeração a 4°C até os procedimentos de detecção de TNAse termoestável e de toxinas, quando foram reisoladas em meio de caldo infuso cérebro coração, incubando-se por 18-20 horas a 37°C. No caso de crescimento negativo foram realizadas subculturas no mesmo meio, para recuperação do agente.

A produção de toxina e TNAse foi pesquisada pela técnica de “celofane over agar”²⁷. Para tanto foram usados círculos de papel celofane de 100 mm de diâmetro, cortados e dispostos intercalados com círculos de papel filtro de mesmo diâmetro, em placas de petri, e umedecidos com água destilada, autoclavando-se a 121°C por 20 minutos. Os círculos de papel celofane foram transferidos asépticamente para placas de petri de 100 mm contendo 15 a 20 mL de ágar infuso cérebro coração (Oxoid) enriquecido com 1% de extrato de levedura (Merck).

Semearam-se 100mL do inóculo sobre o celofane espalhando-se com auxílio de bastão de vidro. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, lavando-se o material do crescimento bacteriano sobre o celofane, com 2,5 mL de uma solução de Na₂HPO₄ a 0,01M. A suspensão celular obtida foi centrifugada a 10000 rpm durante 10 minutos à 4°C, e o sobrenadante foi acondicionado em tubos “eppendorf”, estocados à temperatura de -16°C, até o

momento da sua utilização para a pesquisa de termonuclease e de toxinas. Para a detecção de termonuclease lançou-se mão da técnica metacromática²⁸, utilizando-se 1 mL do sobrenadante, aquecido previamente em banho-maria a 100°C, por dois minutos, resfriando-se novamente a 25°C para obtenção de DNase termoestável.

Foram utilizadas para tanto, placas com 20 mL de agar azul-ortoluidina-DNA, perfurando-se com auxílio de cilindro de metal, obtendo-se assim perfurações com 7 mm de diâmetro por 3 cm de profundidade, onde foram inoculados 80 mL da suspensão resfriada, incubando a seguir, as placas por quatro horas a 50°C. Foram consideradas como positivas as amostras que produziram halo de coloração rosada ao redor do poço, denotando a ação enzimática sobre o DNA.

Para a pesquisa de enterotoxinas, procedeu-se a filtração do fluido sobrenadante de cada amostra, em membranas milipore, com porosidade de 0,2 a 0,45 mm. O filtrado assim obtido foi utilizado para a detecção de enterotoxinas A, B, C e D (EEA, EEB, EEC e EED), a partir do KIT SET RPLA (Denka Seiken Ltda. Oxoid) de acordo com a técnica de aglutinação passiva reversa em látex. O resultado foi considerado positivo quando houve reação de aglutinação, de escores 1+, 2+ e 3+. As amostras que produziram reações inespecíficas foram filtradas novamente, como descrito anteriormente, e retestadas. Na pesquisa da toxina do choque tóxico utilizou-se o KIT TST RPLA (Denka Seiken Ltda. Oxoid), e procedeu-se como descrito anteriormente.

Para a contagem de células somáticas (CCS) foram coletados 50mL de leite, das respectivas glândulas em frascos contendo 44 mg de dicromato de potássio, e a contagem foi procedida pelo método de citometria de fluxo, utilizando o aparelho SOMACOUNT 300 (Bentley Instruments). Os resultados da CCS foram correlacionados com o exame microbiológico e produção de toxinas, utilizando-se o teste de KW, com $\mu = 0,05$.²⁹

Resultados e Discussão

Das 6648 glândulas mamárias examinadas, 81 (1,22%) estavam afuncionais e 32 (0,48%) apresentavam mastite clínica, revelando alterações variáveis em cada caso, como grumos, coágulos de pus, estrias de sangue e às vezes somente secreção purulenta. Dos 1662 animais examinados, 805 (48,43%) foram positivos ao CMT com diferentes escores de reação, e entre a 6535 amostras de leite examinadas, 1663 (25,58%), foram positivas.

Entre outros microrganismos, *Staphylococcus aureus* foram isolados em 217 amostras (20,66%). De acordo com a literatura assinalada esta frequência pode ser considerada intermediária, pois a mesma mostra resultados variáveis entre 9,1% e 85%. Há de se considerar aqui as diferenças locais dentro de uma mesma região e do estado.^{1,3,4,5,11,13} E entre os diferentes países^{6,8,9,10}, obtiveram também frequências variáveis deste agente.

Embora com diferenças, às vezes marcantes, entre os autores este agente pode ser considerado mundialmente como o de maior significado na etiologia das mastites. Reforça esta afirmação a sua presença em 35,53% e 22,48% nas infecções subclínicas.^{7,12} Ao se analisar estas frequências, elas são também dispareas, mas próximas aos 20,66%, do presente trabalho. Devem ser levantados os aspectos referentes às raças, idade, aos aspectos ambientais e os de manejo na criação, além de que muitos casos tratam de estudos retrospectivos com números de amostras diferentes; o que deve influenciar na variação dos resultados.

Quanto à pesquisa de toxinas estafilocócicas, do total de 209 amostras de *S.aureus*, 205 (98,86%) produziram TNase, resultado similar ao obtido por De Freitas e Magalhaes¹³, que a detectaram em 91,40% das amostras. Não houve detecção da toxina do choque tóxico (TSST-1), no entanto, a produção de enterotoxinas foi detectada em nove (4,39%) amostras, sendo uma (0,49%) EED, três (1,46%) EEC, e três (1,46%) EEB.

Em uma amostra (0,49%), detectou-se concomitantemente EEA e EEB e em outra EEB e EEC. Desta forma, a EEB foi encontrada com maior frequência, em cinco amostras (55,55%), e EEC em quatro (44,44%) e tanto a EEA como a EED em somente uma (11,11%) delas.

Foram obtidos 7% de amostras toxigênicas com 5,25% de EEC, 1,75% de EED¹⁹, enquanto em 8%, com a produção concomitante de EEA e EEE³⁰, e somente 1,07% de EEA¹⁵. Foram detectadas 4,7% de amostras toxigênicas, sendo duas EEC, uma EEA e três produtoras de EEA e EEC, concomitantemente²⁰. Estes resultados diferem no que diz à positividade de EEB, que mostrou-se mais importante no presente estudo. Araújo et al.¹⁷ relataram o encontro de somente uma (0,59%) amostra toxigênica em leite cru e Harvey e Gilmour³¹ de 3,9% e Ombui, Arimi e Kayhura¹⁴ 74,2% com EEC em 95,8%, EEA em 59,7%, EEB em 36,1% e EED em 23,6%.

Orden et al.¹⁸ detectaram apenas EEC em 19,0% entre 26 amostras examinadas, e TSST-1 em 11 (42,3%) e Kenny et al.¹⁶ obtiveram 75 (28,6%) amostras positivas, sendo a EED a mais frequente (77,33%), vindo a seguir EEC (58,66%), EEB (9,33%) e EEA (1,33%). A TSST-1 foi detectada em 66,66% das amostras. Matsunaga et al.³² obtiveram 34,5% de amostras enterotoxigênicas e 27,6% produtoras de TSST-1, isoladas de casos de mastite hiperaguda, no caso da TSST-1.

Os resultados apresentados diferem em sua grande maioria, o que deve refletir a importância da genotipagem de amostras de *S.aureus*, para uma melhor interpretação. Quanto a não produção de TSST-1 pode estar relacionada ao fato de que frequentemente este agente é isolado de casos clínicos e síndrome do choque tóxico, não produtores de TSST-

1, e não são produtores de EEB.

A EEC é normalmente a principal enterotoxina produzida^{22,33,34}, concomitantemente com a TSST-1, em casos clínicos mais severos de mastite por *Staphylococcus aureus*. A toxina EEB foi obtida em 55,5% dos casos, o que pode explicar a não detecção de TSST-1 no presente estudo. Outra justificativa poderia ser o fato da mesma ter sido pesquisada somente em amostras obtidas de afecções subclínicas, pois as provenientes de casos clínicos apresentam maior virulência³³.

A correlação entre a produção de enterotoxinas e a resposta celular verificada pela CCS, revelou que nos casos de detecção de EEC as amostras eram provenientes de quartos mamários com CCS superior a 1000 x 10³ células por mL de leite, o que pode sugerir possível fator de virulência para este agente. Com exceção de um caso, nas amostras de leite de onde se detectou a enterotoxina, a produção de CCS foi superior a 500 x 10³ células por mL de leite, entretanto o valor da mediana da CCS, apesar de numericamente superior, 1419 x 10³ células por mL, não foi estatisticamente significativo (p=0,1629), para sugerir maior patogenicidade ou virulência. Outros fatores de virulência podem ter influenciado a CCS, além de se considerar os aspectos inerentes ao período de lactação, idade do animal, fatores traumáticos, estresse, entre outros.

Conclui-se pela relevância do *S.aureus* como agente das mastites subclínicas, com obtenção de 4,39% de amostras toxigênicas sendo que, das toxinas identificadas, a EEB demonstrou ser a mais importante, estando presente em 55,55% das amostras. Não detectou-se a TSST-1. As amostras de leite provenientes dos quartos mamários infectados por *S.aureus* toxigênicos, não apresentaram aumento significativo quanto à contagem de células somáticas.

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the major agents of contagious mastitis and has high incidence worldwide in most of dairy herds. Besides the economic impact, the public health aspects of the enterotoxins and

Key-words:

Mastitis.
Subclinic.
Bovine.
Staphylococcus aureus.
Enterotoxins

the toxic shock syndrome toxin are very important. The enterotoxin A is frequently correlated with food related illness in man and can be associated with raw, pasteurized and other milk products. The toxic shock syndrome is caused most frequently by toxic shock syndrome toxin, but enterotoxins B and C also can be implicated. The aim of this study was to verify the occurrence of *Staphylococcus aureus* enterotoxins and toxic shock syndrome toxin producers. Milk samples from cows with clinical and subclinical mastitis were collected. The results of toxins research by “celofane over agar” to TNAase and by commercial kit to enterotoxins were associated with the electronic somatic cell count. Total of 209 milk samples from cows with clinical and subclinical mastitis caused by *S.aureus* were verified. A total of 209 (98.86%) were TNAase producers, nine samples (4.39%) were enterotoxin producers, and one of them (0.49%) was EED producer, three (1.46%) EEC producers and three (1.46%) EEB producers. The toxic shock syndrome toxin was not identified in any of the samples assayed on this study. There was no statistical correlation between the somatic cell count results and the samples with toxin production.

Referências

1. NADER FILHO, A. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 5, p. 53-56, 1985.
2. FERREIRO, L. Mastite bovina na Grande Porto Alegre, RS, Brasil. I. Agentes etiológicos isolados durante o período de 1982-1985. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 13, p. 81-88, 1985.
3. LANGENEGGER, J.; FIGUEIREDO, M. P.; REZENDE, E. F. Eficácia terapêutica do cefacetile frente aos microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* isolados de mastites subclínicas. **Hora Veterinária**, v. 30, p. 24-27, 1986.
4. COSTA, E. O. Etiologia bacteriana da mastite bovina no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Microbiologia**, v. 17, p. 107-112, 1986.
5. VIANNI, M. C. E., NADER FILHO, A. Determinação do número de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* em amostras de leite de vacas com mastite subclínica. **Ciência Veterinária Jaboticabal**, v. 3, p. 5-6, 1989.
6. TRINIDAD, P., NICKERSON, S. C., ALLEY, T. K. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 107-114, 1990a.
7. LANGONI, H. et al. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, p. 507-515, 1991.
8. CASTREJÓN, M. E.; PEREA, C. R. Estudio de la resistencia a antimicrobianos que presentan los microorganismos productores de mastitis en vacas Holstein. In: CONGRESO PANAMERICANO DE CIENCIAS VETERINARIAS, 14. 1994, Acapulco. **Proceedings...** Acapulco, 1994. p. 45.
9. OBRITZHAUSER, W.; DEUTZ, A.; FUCHS, K. Vergleich von Klinischer und Bakteriologischer Untersuchung bei Akutmastiten von Milchkühen. **Tierärztl. Umsch.**, v. 50, p. 31-41, 1995.
10. WILSON, D. J., GONZALES, R. N., DAS, H. H. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2592-2598, 1997.
11. BELOTI, V. et al. Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. **Semina**, v. 18, p. 45-53, 1997.
12. LANGONI, H. et al. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 20, p. 204-209, 1998.
13. DE FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**, v. 21, p. 315-319, 1990.
14. OMBUI, J. N.; ARIMI, S. M.; KAYHURA, M. Raw milk as a source of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and enterotoxins in consumer milk. **East African Me. J.**, v. 69, p. 123-125, 1992.
15. MEAD, P. S. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Disease**, v. 5, p. 607-625, 1999.
16. KENNY, K. et al. Production of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin by bovine mammary isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 706-707, 1993.
17. ARAÚJO, W. P. et al. *Staphylococcus aureus* em leite cru. I. Contagem, verificação da enterotoxigenicidade e fagotipagem das cepas isoladas. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 26, p. 187-198, 1989.
19. GARCIA, M. L.; MORENO, B.; BERGDOLL, M. S. Characterization of staphylococci isolated from mastitis cows in Spain. **Applied and Environmental**

- Microbiology**, v. 39, p. 584-553, 1980.
20. LOPES, C. A. M. et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Brazil. **Brazilian Veterinary Journal**, v. 146, p. 443-448, 1990.
 21. SCHMITZ, F. J. et al. 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.
 22. JONES, T. O.; WIENEKE, A.A. Staphylococcal toxic shock syndrome. **Veterinary Record**, v. 25, p. 435-436, 1988.
 23. 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, p. 7-10, 2000.
 24. SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 130, p. 199-204, 1957.
 25. CARTER, G. R.; COLE JÚNIOR, J. R., **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. 5ª ed. San Diego, California: Academic Press, 1990. p. 201-209.
 26. QUINN, P. J. et al. **Clinical Veterinary microbiology**. London: Wolfe Publishing, 1994. 648 p.
 27. HALLANDER, H. Production of large quantities of enterotoxin B and other staphylococcal toxins on solid media. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 63, p. 299-305, 1965.
 28. LACHICA, R. V. F.; GENIGEORGIS, C.; HOEPRICH, P. D. Metachromatic agar-difusion microslide technique for detecting staphylococcal nuclease in foods. **Applied Microbiology**, v. 23, p. 168-169, 1971.
 29. CURI, P. R. **Metodologia e análise da pesquisa em Ciências Biológicas**. Botucatu: Tiponic. 1997. 263 p.
 30. FURLANETTO, S. P. M. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados a partir de leite de vacas mastíticas. **Revista de Microbiologia**, v. 18, p. 138-143, 1987.
 31. HARVEY, J.; GILMOUR, A. Application of current methods for isolation and identification of staphylococci in raw bovine milk. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 59, p. 207-221, 1985.
 32. MATSUNAGA, T. et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 55, p. 297-300, 1993.
 33. BEZEK, D. M.; HULL, B. L. Peracute gangrenous mastitis and cheilitis associated with enterotoxin-secreting *Staphylococcus aureus* in a goat. **Canadian Veterinary Journal**, v. 36, p. 106-107, 1995.
 34. MORGAN, K. L. et al. Staphylococcal toxic shock syndrome. **Veterinary Record**, v. 19, p. 559, 1986.