

## IDENTIFICAÇÃO DE GENES ENTEROTOXIGÊNICOS DE ESTIRPES DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE CASOS DE MASTITE BOVINA

Luciano Menezes Ferreira<sup>1</sup>; Sandra de Oliveira Conde<sup>2</sup>; Luiz Francisco Zafalon<sup>3</sup>; Poliana de Castro Melo<sup>4</sup>; Viviane de Souza<sup>4</sup>; Suzy Sviech<sup>4</sup>; Antonio Nader Filho<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Prof. do Curso de Medicina Veterinária, UNICASTELO, Descalvado-SP; <sup>2</sup>Bióloga, Matão-SP; <sup>3</sup>Pesquisador EMBRAPA–Pecuária Sudeste, São Carlos-SP; <sup>4</sup>Pós-graduanda em Medicina Veterinária Preventiva, FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP; <sup>5</sup>Prof. do Depto. de Medicina Veterinária Preventiva, FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP. E-mail: ferreira\_lm@yahoo.com.br

### INTRODUÇÃO

A mastite bovina por *Staphylococcus aureus* constitui importante problema de Saúde Pública e com grande repercussão econômica (SCHALM et al., 1971). Outro fato importante e que deve ser considerado em relação aos *S. aureus* é quanto à capacidade de produzir enterotoxinas termoestáveis que estes microrganismos apresentam. Podem ser responsáveis pela morte do animal e demonstram, também, importância na microbiologia de alimentos como agente de intoxicações alimentares devido à ingestão de enterotoxinas e servem como indicadores higiênico-sanitários na indústria alimentícia, visto que o manipulador de alimentos é a principal fonte de transmissão. GILETTO & FYFFE (1998) relataram que as intoxicações estafilocócicas afetam 1,2 milhões de pessoas anualmente, o que resulta em perda econômica de 1,5 bilhões de dólares.

Tendo em vista que as toxinas podem ser excretadas no leite e permanecer estáveis nos produtos oferecidos ao consumo humano, as infecções intramamárias causadas por *S. aureus* apresentam implicações importantes em Saúde Pública. O risco é aumentado principalmente ao se considerar que esse patógeno é o que apresenta maior prevalência nos casos de mastite de rebanhos leiteiros e que apresenta estirpes com elevado potencial toxigênico (FAGUNDES & OLIVEIRA, 2004).

Diante do exposto, idealizou-se o presente trabalho com a finalidade de investigar a presença dos genes das enterotoxinas estafilocócicas dos tipos A a D e da toxina da síndrome do choque tóxico (*tst*), por meio da amplificação de suas seqüências codificadoras pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), em estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite bovina.

### MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de agosto de 2005 a dezembro de 2006 todas as vacas lactantes, aparentemente saudáveis, de uma propriedade rural produtora de leite tipo B pertencente ao Centro de Bovinos de Leite do Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, Estado de São Paulo, foram mensalmente submetidas à prova do *California Mastitis Test* (CMT). Foram colhidas, de acordo com os procedimentos recomendados pelo *National Mastitis Council* (HARMON et al., 1990), em tubos de ensaio esterilizados, amostras de leite dos quartos reagentes ao CMT e, também, daqueles que apresentaram mastite clínica.

Para a identificação bioquímica foram seguidos os protocolos de HOLMBERG (1973) e HOLT et al. (1994). Em seguida, a extração do DNA bacteriano foi realizada no Laboratório de Análises Microbiológicas de Alimentos de Origem Animal e Água, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, FCAV, Unesp

– Câmpus de Jaboticabal – SP. Foi utilizado o Kit GFX Genomic Blood®, que contém o protocolo de extração de DNA para bactérias Gram positivas. Posteriormente, a confirmação molecular dos isolados de *S. aureus* foi realizada de acordo com o protocolo descrito por MARTINEAU et al. (1998).

Foram utilizados os DNAs extraídos e armazenados a – 20 °C das estirpes de *S. aureus* isoladas do leite de vacas com mastite para a amplificação dos genes das enterotoxinas dos tipos A a D (*sea*, *seb*, *sec* e *sed*) e da toxina TSST-1 (*tst*), por meio da amplificação de suas seqüências codificadoras pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), segundo o protocolo estabelecido por CUNHA et al. (2007).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas do leite de vacas com mastite 150 estirpes caracterizadas bioquímica e genotipicamente como pertencentes à espécie *S. aureus*. Observa-se na Tabela 1 que foram isoladas 28 (18,7%) estirpes de *S. aureus* que apresentaram amplificação de pelo menos um gene, seja das enterotoxinas dos tipos A a D, ou da Toxina da Síndrome do Choque Tóxico. Dentre essas, verifica-se a prevalência dos genes *sea* de forma particular em 15 (53,6%) estirpes que apresentaram a amplificação de pelo menos um gene, as quais corresponderam a 10,0% do total das estirpes de *S. aureus* isoladas. Nota-se, ainda, que os genes *tst*, *seb* e *sec* aparecem na seqüência da ordem de importância casuística, cujas freqüências de isolamentos foram de 14,3%, 10,7% e 10,7%, respectivamente.

Tabela 1 - Distribuição das estirpes de *Staphylococcus aureus* com respectivos sítios de isolamento de acordo com a amplificação de pelo menos um dos genes estudados (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *tst*), Centro de Bovino de Leite do Instituto de Zootecnia, Nova Odessa/SP, Ago/2005 a Dez/2006.

Perfil	Tipos de genes amplificados	Leite	
		n	%
1	<i>sea</i>	15	53,6
2	<i>seb</i>	3	10,7
3	<i>sec</i>	3	10,7
4	<i>sed</i>	1	3,6
5	<i>tst</i>	4	14,3
6	<i>sea</i> + <i>sed</i>	1	3,6
7	<i>seb</i> + <i>tst</i>	1	3,6
Total	-	28	100

Resultado um pouco superior foi encontrado por ZSCHÖCK et al. (2000), em estudo realizado com 94 estirpes de *S. aureus* isoladas de casos de mastite durante dois anos, no qual foi encontrada a presença de pelo menos um gene em 36,2% (34) das estirpes estudadas. No entanto, não foram encontrados dados científicos que apresentassem proximidade de valores referentes ao gene *sea* de origem bovina. Esses mesmos pesquisadores identificaram a presença de apenas 3 (3,2%) estirpes com o gene *sea*. SCHERRER et al. (2004) verificaram, em leite de cabras obtido de tanques de expansão, a presença deste gene em 28 (14,6%) estirpes de *S. aureus*.

Em contrapartida, no que se refere ao gene *sec*, ZSCHÖCK et al. (2000) encontraram 64,7% (22) de presença, seguidos pelos genes *tst*, *sed* e *seb*, com 55,9% (19), 11,7% (4) e 5,9% (2), respectivamente. No entanto, como mostra a Tabela 1, neste trabalho o gene *tst* foi o segundo com maior prevalência (14,3%), seguido pelos genes *seb* e *sec*, ambos com 10,7%.

A simples presença de genes enterotoxigênicos não indica, necessariamente, a capacidade do microrganismo de produzir toxina biologicamente ativa suficiente para

induzir manifestações clínicas (MCLAUHLIN et al., 2000). No entanto, o simples fato de uma estirpe conter um ou mais genes enterotoxigênicos deve ser significativa, pois pode oferecer risco à Saúde Pública caso encontre condições favoráveis à produção de enterotoxinas.

## CONCLUSÃO

Depreende-se que os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram a identificação de genes das enterotoxinas dos tipos A, B, C e D e da toxina da síndrome do choque tóxico nas estirpes de *S. aureus* isoladas do leite, o que evidencia o risco potencial que este produto contaminado pode representar à Saúde Pública. E, ainda, que a ocorrência do gene *sea* representa motivo de enorme preocupação, principalmente se considerado o fato de esta enterotoxina ser a mais freqüentemente envolvida em casos de intoxicações alimentares.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CUNHA, M. L. R. S.; CALSOLARI, R. A. O.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxin and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 genes in *Staphylococcus*, with emphasis on coagulase-negative Staphylococci. *Microbiology Immunology*, Tokyo, v. 51, n. 4, p. 381-390, 2007.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Revista Ciência Rural*, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, jul-ago, 2004.
- GILETTO, A.; FYFFE, J.G. A novel ELISA format for the rapid and sensitive detection of *Staphylococcal* enterotoxin A. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Bunkyo-ku, v. 62, n. 11, p. 2217-2222, 1998.
- HARMON, R. J. et al. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection. National Mastitis Council, Arlington. 34p., 1990.
- HOLMBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 45, p.1-144, 1973 (Supplement).
- HOLT, J. G. et al. Gram-positive cocci. In: BERBEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins, p. 544-551, 1994.
- MARTINEAU, F. et al. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal Clinical Microbiology*, v. 36, p. 618-623, 1998.
- MCLAUHLIN, J.; NARAYANAN, G.L.; MITHANI, V. et al. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J. Food Protection*, Des Moines, v. 63, p. 479-488, 2000.
- SCHALM, O. W., CARROL, E. J., JAIN, N. C. *Bovine Mastitis*. Philadelphia, Lea & Febiger, 360 p, 1971.
- SCHERRER, D., S. et al. Phenotypic and genotypic characteristic of *Staphylococcus aureus* isolated from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. *Veterinary Microbiology*, v. 101, p. 101-107, 2004.
- ZSCHÖCK, M. et al. 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, n. 8, p. 569-574, 2000.